Vanessa Luiza Romanelli Tavares

Identificação de novas variantes causativas e
investigação da heterogeneidade clínica da
Síndrome Aurículo-Condilar

*Identification of novel causative variants and
investigation of clinical heterogeneity of
Auriculocondylar Syndrome*

São Paulo
2016

Vanessa Luiza Romanelli Tavares

Identificação de novas variantes causativas e
investigação da heterogeneidade clínica da
Síndrome Aurículo-Condilar

*Identification of novel causative variants and
investigation of clinical heterogeneity of
Auriculocondylar Syndrome*

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do
Título de Doutora em Ciências,
na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria
Rita dos Santos e Passos-Bueno

São Paulo
2016

RESUMO

Considerada uma doença de primeiro e segundo arcos faríngeos (FaSPAD), a Síndrome Aurículo-Condilar (ACS) apresenta como principais características micrognatia, malformação auricular típica chamada de *question mark ear* (QME) e hipoplasia do côndilo mandibular. Variabilidade clínica inter e intrafamiliar, bem como heterogeneidade genética são observadas na ACS. A doença segrega tanto de maneira autossômica dominante quanto recessiva. Variantes patogênicas tem sido identificadas em *GNAI3*, *PLCB4* e *EDN1* como responsáveis pela maioria dos casos investigados. Ainda, estudos não publicados do nosso grupo sugerem a ocorrência de um quarto *locus* causativo de ACS. No presente trabalho tivemos por objetivo identificar as variantes causativas de ACS em casos anteriormente descritos e casos ainda não reportados e nos propusemos a investigar a heterogeneidade clínica da ACS. Identificamos variantes patogênicas nos genes *PLCB4* e *GNAI3* em 5 de 6 casos de ACS. No caso restante (1/6), restringimos o quarto *locus* candidato a conter variante causativa de ACS. Estudos adicionais estão sendo realizados afim de identificá-la. Sugerimos também que todas as variantes em *GNAI3*, aqui e anteriormente descritas, interfiram direta ou indiretamente com a ligação GDP/GTP, agindo com um mecanismo dominante negativo. Além disso, encontramos achados clínicos adicionais em pacientes com ACS e variantes em *PLCB4*.

ABSTRACT

Considered as a first and second pharyngeal arch disease (FaSPAD), the Auriculocondylar Syndrome (ACS) presents with micrognathia, a typical ear malformation called question mark ear (QME), and mandibular condyle hypoplasia as main features. Intra and inter-familial clinical variability as well as genetic heterogeneity are observed in ACS. The disease segregates in both autosomal dominant and recessive manner. Pathogenic variants have been identified in *GNAI3*, *PLCB4*, and *EDN1* in the majority of the investigated cases. Furthermore, non-published studies of our group indicate a fourth *locus* associated with ACS. In the present study, our aim was to identify the causative variants of ACS in previously and not reported cases and also to investigate the clinical heterogeneity of ACS. We identified pathogenic variants in *PLCB4* and *GNAI3* in 5 out of 6 ACS cases. In the remaining case (1/6), we narrow down the fourth candidate region to contain causative variant of ACS. Additional studies are being conducted to identify it. We also hypothesized that all *GNAI3* variants, herein and previously described, interfere with the GDP/GTP binding, acting through a dominant negative mechanism. Furthermore, we found additional clinical findings in patients with ACS and *PLCB4* variants.

INTRODUÇÃO GERAL

A Síndrome Aurículo-Condilar (ACS, MIM 602483, 614669, 615706) é uma doença rara que possui diferentes modos de herança dependendo da variante patogênica encontrada: a maioria dos casos apresenta herança autossômica dominante com penetrância incompleta; enquanto uma minoria apresenta padrão de herança autossômico recessivo (revisto em Clouthier *et al.*, 2013). Ao longo desse capítulo apresentaremos o fenótipo de ACS, seguindo para uma breve descrição de estruturas embrionárias importantes para a compreensão da via molecular envolvida com a doença. Apresentaremos também as variantes causais e respectivos mecanismos de ação recentemente relacionados com a síndrome.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SÍNDROME AURICULO-CONDILAR

A ACS apresenta como principais características fenotípicas a micrognatia, hipoplasia do côndilo mandibular e uma malformação auricular típica, chamada de *question mark ear* (QME). A QME é definida por uma fenda total ou parcial entre o lóbulo e a hélice da orelha, conferindo a aparência de um ponto de interrogação a esta estrutura e pode ser observada como característica isolada nos pacientes – chamada de QME isolada (IQME, MIM 612798) (Gerkes *et al.*, 2008; Guion-almeida *et al.*, 1999; Guion-Almeida *et al.*, 2002; Jampol *et al.*, 1998; Masotti *et al.*, 2008; Shkalim *et al.*, 2008; Storm *et al.*, 2005, Cosman *et al.*, 1970; Al-Qattan, 1998; Uuspaa, 1978; Priolo *et al.*, 2000). Ainda, as malformações mandibulares de alguns pacientes levaram Rieder *et al.* (2012) à hipótese de que uma transformação homeótica estaria ocorrendo nos

pacientes com a ACS, onde a mandíbula assumiria um padrão fenotípico semelhante à maxila (tópico reinterado adiante).

Outros achados frequentemente encontrados na ACS são microstomia, maloclusão, bochechas salientes, glossoptose, agenesia ou hipoplasia do côndilo mandibular e alterações da articulação temporomandibular (ATM) (Figura 1). Esta última característica pode remeter a uma redução na mobilidade da mandíbula à apenas alguns milímetros de abertura da boca (Gerkes *et al.*, 2008; Guion-almeida *et al.*, 1999; Guion-Almeida *et al.*, 2002; Jampol *et al.*, 1998; Masotti *et al.*, 2008; Storm *et al.*, 2005; Priolo *et al.*, 2000).

Figura 1. Variabilidade fenotípica vista em casos distintos de pacientes com a ACS. (A) paciente com micrognatia grave levando à necessidade de traqueostomia e bochechas proeminentes. (B) Projeção lateral de tecido mole na base da língua; (C) Paciente com micrognatia e malformação auricular. (D) Variabilidade intra-familiar da ACS, com ênfase na malformação auricular; note na figura da direita a constrição auricular resultante na *question mark ear* (QME). (E) Paciente com microstomia, bochechas proeminentes, micrognatia; a seta indica uma proeminência na região posterior da orelha (*post-auricular tag*). Figuras retiradas e modificadas de (A) Storm *et al.*, (2005); (B) Rieder *et al.*, (2012); (C) Guion-Almeida *et al.*, (2002); (D) Masotti *et al.*, (2008); e (E) Gordon *et al.*, (2013a).

A ACS manifesta-se com grande variabilidade clínica inter e intrafamiliar. Nos casos mais graves as alterações podem estar associadas à dificuldades respiratórias, com necessidade de traqueostomia. Outras características vistas com menos frequência incluem assimetria facial, fenda palatina, diminuição da audição, apêndice na região posterior da orelha (*post-auricular tags*) (Guion-Almeida *et al.*, 2002; Masotti *et al.*, 2008; Storm *et al.*, 2005), apneia obstrutiva e central, projeção de tecidos moles lateralmente na base da língua, alterações gastrointestinais e macropênis. Às alterações extra-craniofaciais cabe ressaltar que foram somente vistas em casos onde a doença se apresenta de maneira recessiva e com variantes patogênicas em *PLCB4* (Gordon *et al.*, 2013a; Kido *et al.*, 2013; Rieder *et al.*, 2012).

Observa-se que alguns sinais clínicos da ACS, tais como malformações auriculares e micrognatia, se sobrepõem ao de outras síndromes craniofaciais de primeiro e segundo arcos faríngeos, como síndrome de Treacher Collins (TCS; MIM 154500), espectro Óculo-Aurículo Vertebral (OAVS; MIM 164210) e sequência de Pierre Robin (PRS, MIM 261800). Contudo, as malformações de orelha presentes no OAVS e na TCS são diferentes das vistas na ACS, que parecem bem específicas em relação à constrição auricular. A TCS também apresenta hipoplasia dos arcos zigomáticos e coloboma palpebral, que a diferencia de ACS, enquanto que na OAVS podem ocorrer alterações cardíacas, renais e do sistema nervoso central (Gorlin, 2001; Gordon *et al.*, 2013a).

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

As principais estruturas acometidas na ACS são originadas do primeiro e segundo arcos faríngeos (também chamados de arcos branquiais), que por sua vez são compostos por células da crista neural (NCC), com um centro de células de origem

mesodérmica. Assim, classifica-se esta malformação como uma doença de primeiro e segundo arcos faríngeos embrionários (Graham *et al.*, 2004; Passos-Bueno *et al.*, 2009; Sadler, 1995).

As NCC tem origem na borda entre a ectoderme neural e não-neural e uma complexa via de sinalização coordena sua indução, migração e proliferação (Figura 2) (Crane & Trainor, 2006; Knecht & Bronner-Fraser, 2002; Ruffins & Bronner-Fraser, 2000). Migrando em direção aos arcos faríngeos, elas irão contribuir para um conjunto específico de elementos (Larsen, 1997; Carlson, 2005). O primeiro arco faríngeo apresenta dois domínios: a proeminência ou processo maxilar, que dará origem à maxila, osso zigomático e parte do osso temporal; e a proeminência ou processo mandibular. O primeiro arco faríngeo também dará origem a estruturas como os músculos da mastigação, parte da bigorna (ou *incus*) e martelo (ou *malleus*), parte da orelha externa e da língua. Já o segundo arco faríngeo origina, dentre outros, parte da orelha externa, o estribo, processo estilóide e o menor corno do osso hióide, enquanto o corno maior do hióide é derivado do terceiro arco faríngeo (Figura 3) (revisto em Johnson, 2010; Minoux & Rijli, 2010).

O primeiro arco faríngeo e o processo frontonasal estão envolvidos na formação facial que tem início no decorrer da quarta semana do desenvolvimento embrionário humano. Na quarta semana ocorre a fusão dos dois processos mandibulares, derivados do primeiro arco branquial, na linha média. Enquanto que, na quinta e sexta semanas de gestação, os processos maxilares crescem em direção à linha média resultando em sua fusão entre a sexta e sétima semanas (revisto em Johnson *et al.*, 2010; Garcia & Fernández, 2001).

Figura 2. A borda da placa neural (verde) é induzida pela sinalização entre a neuroectoderme (roxo) e a ectoderme não neural (azul) e do mesoderma paraxial abaixo (amarelo). Durante a neurulação, as bordas da placa neural (dobramento neural) se elevam, ocasionando a formação do tubo neural. Células da crista neural (verde) se delaminam das pregas neurais e migram (modificada de Gammil & Bronner-Fraser, 2003).

A partir do quinto mês fetal o centro de crescimento do côndilo mandibular será responsável pelo alongamento da mandíbula durante os primeiros 10 anos de vida pós-natal (Garcia & Fernández, 2001 e revisto em Serrano *et al.*, 2011). A importância do côndilo nesse período é reforçada pela observação de lesões no côndilo em camundongos com 3 semanas de idade, as quais resultam na redução do crescimento condilar e mandibular, levando à assimetria da mandíbula e deslocamento lateral (Nakano *et al.*, 2009).

Figura 3. Na imagem do embrião, migração das células da crista neural partindo dos rombômeros para os arcos faríngeos. Ao lado (humano), principais estruturas faciais formadas a partir de populações de células da crista neural. AS, osso alisfenóide; BA1-BA3, arcos faríngeos 1-3; DE, osso dentário; di, diencefalo; FNP, processo frontonasal; FR osso frontal; HY, osso hióide; IN, bigorna (*incus*); MA, martelo (ou *malleus*); mês, mesencéfalo; MX, osso maxilar; NA, osso nasal; PA osso parietal; R1-R7 rombômeros 1-7; SQ, osso esquelomoso; ST, estribo; ZY, osso zigomático (modificado de Santagati & Rijli, 2003).

Já a formação da orelha externa começa com massas auriculares advindas do mesênquima do primeiro e segundo arcos, as quais, com 41 dias de desenvolvimento embrionário, apresentam-se em número de seis (Figura 4). A fusão dessas massas auriculares formará a orelha externa e diversos autores tem tentado correlacionar qual das seis massas auriculares é responsável pela formação de cada parte da orelha externa, entretanto, sem terem chegado à um consenso. À medida que os arcos mandibulares crescem, as orelhas são puxadas para a região respectiva da face, onde tomam posição definitiva na 12ª semana (revisto em Park, 1999; e O’Rahilly & Muller, 1992; Garcia & Fernández, 2001; Carlson, 2005).

Figura 4. Interação entre os primeiro (verde) e segundo (vermelho) arcos faríngeos para a formação da orelha externa. Abaixo, microscopia eletrônica de um embrião com cinco semanas de gestação. Massas nodulares de mesênquima se organizam e se fundem para a formação da orelha externa.

ASPECTOS GENÉTICOS DA ACS

A ACS é uma doença que segrega majoritariamente com padrão de herança autossômico dominante, mas que pode também apresentar-se com herança autossômica recessiva. Estima-se que a prevalência seja $<1/1.000.000$ (Orphanet, coordenado pelo *French INSERM team*; <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>).

O primeiro estudo genético sobre a ACS foi conduzido por nosso grupo em duas famílias com fenótipo segregando de maneira autossômica dominante, no qual definimos, por meio de análise de ligação, o primeiro *locus* candidato mapeado na região 1p21.1-q23.3. Observamos ligação destes marcadores e a ACS somente em uma das duas famílias estudadas, indicando a ocorrência de heterogeneidade genética (Masotti *et al.*, 2008). A família para a qual não houve evidência de ligação na região do

cromossomo 1 (família que chamaremos de F1 no presente trabalho) foi investigada durante meu projeto de mestrado e identificamos um quarto *locus* candidato a conter a variante causativa de ACS (dados não publicados; Romanelli Tavares, 2011).

Recentemente, variantes patogênicas foram descritas em três genes, confirmando a ocorrência de heterogeneidade genética para a doença:

- *guanine nucleotide-binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3 (GNAI3, MIM 139370)*, localizado dentro da região candidata 1p21.1-q23.3 e confirmando, portanto, o estudo de ligação de Masotti *et al.* (2008) (Gordon *et al.*, 2013a; Rieder *et al.*, 2012);
- *phospholipase C, beta 4 (PLCB4, MIM 600810)*, localizado em 20p12.2 (Gordon *et al.*, 2013a; Kido *et al.*, 2013; Rieder *et al.*, 2012);
- *endothelin 1 (EDN1, MIM 131240)*, localizado em 6p24.1 (Gordon *et al.*, 2013b).

O número total de casos da ACS molecularmente investigados ainda é pequeno - apenas 21 casos, dentre os aproximadamente 50 descritos (incluindo IQME) (revisto em Gordon *et al.*, 2013a). Dentre estes, 95,2% (20/21) dos pacientes estudados tiveram variantes identificadas em um dos três genes descritos: 80% segregam com padrão autossômico dominante, tendo mostrado alterações em qualquer um dos três genes identificados; e 20% segregam de maneira autossômica recessiva, onde somente variantes patogênicas em *PLCB4* e *EDN1* foram encontradas (Figura 5) (Gordon *et al.*, 2013b; Gordon *et al.*, 2013a; Kido *et al.*, 2013; Rieder *et al.*, 2012). O único caso publicado, investigado e ainda não solucionado refere-se ao paciente A001 descrito em Rieder *et al.* (2012), para o qual não foram encontradas variantes patogênicas em *GNAI3* e *PLCB4*. Dados dos autores, de variantes selecionadas por sequenciamento completo de exoma, não mostram evidências de alterações no gene *EDN1* (relacionado

à ACS posteriormente à publicação). Além da família F1 (acima referida), que possui evidência de ligação para um quarto *locus* causativo de ACS, temos conhecimento de um terceiro caso para o qual não foram encontradas variantes em *GNAI3*, *PLCB4* e *EDN1* (comunicação pessoal Christopher T. Gordon, Abril, 2014).

Dentre os casos autossômico dominantes, observa-se penetrância incompleta (estimativa ainda desconhecida) somente em famílias com variantes patogênicas em *PLCB4* ou *GNAI3*; enquanto que, casos de alterações *de novo* só foram reportados para pacientes com variantes causais em *PLCB4* (Gordon *et al.*, 2013a; Rieder *et al.*, 2012).

Figura 5. Porcentagem de casos da ACS investigados molecularmente. Ao centro: gráfico contendo a porcentagem de variantes em *GNAI3*, *PLCB4* e *EDN1* e casos não elucidados (somente os publicados). À esquerda (gráfico em verde): casos com variantes patogênicas em *EDN1*. À direita (gráfico em azul): casos com variantes causativas de ACS no gene *PLCB4*. Para *GNAI3*, todas as variantes encontradas estão em heterozigose.

GNAI3

Proteínas G são ativadas por receptores transmembrana e são compostas por 3 (três) subunidades: alfa (α), beta (β) e gama (γ). O gene *GNAI3* codifica a subunidade alfa da proteína a qual, quando ativada por guanosina trifosfato (GTP), regula efetores intracelulares (Gene ID 2773; revisto em Sprang *et al.*, 1997). Até recentemente, foram encontradas duas variantes em heterozigose presentes em *GNAI3*, preditas missense, em três casos distintos de ACS: p.(Gly40Arg) e p.(Ser47Asn) (Gordon *et al.*, 2013a; Rieder *et al.*, 2012). Todas foram herdadas e se localizam no domínio G1 box da proteína, um dos cinco motivos (G1-G5) altamente conservados e envolvidos na ligação de guanosina difosfato (GDP)/GTP à subunidade alfa da proteína G (Wennerberg *et al.*, 2005) (Figura 6A). Através da modelagem estrutural *in silico* da proteína, foi sugerido que a variante p.(Gly40Arg) atue por mecanismo de ganho de função (Rieder *et al.*, 2012). Contudo, Gordon *et al.* (2013a) sugerem que a variante que modifica o resíduo Ser47 atue com um mecanismo dominante negativo e propõe que o mesmo ocorra com a outra alteração identificada. Esta última hipótese é baseada em estudos *in vitro* que mostram que uma variante equivalente à p.(Ser47Asn), presente no domínio G1 de HRAS (p.Ser17Asn), tem como consequência efeito dominante negativo com propriedades inibitórias de crescimento (revisto em Barren & Artemyev, 2007; Feig 1999). Devido à tal divergência de mecanismos de ação das variantes em *GNAI3*, estudos adicionais precisam ser realizados para elucidar esta questão.

PLCB4

Enzimas fosfolipase C (PLC) fazem a transdução de sinais intracelulares através da produção de inositoltrifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), oriundos da catálise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). Atualmente 11 isoformas de PLC foram descritas

e classificadas entre as subfamílias beta (β), gama (γ), delta (δ) e epsilon (ϵ). O gene *PLCB4* pertence a subfamília β que contém quatro membros (*PLCB1-4*). As PLCB são proteínas que contém um domínio N-terminal PH (*pleckstrin homology*), domínio EF (*EF hand-like*), domínios catalíticos X e Y e um domínio C2 de ligação ao cálcio (revisto em Rhee, 2001; Gene ID 5332).

Variantes em *PLCB4* correspondem à maioria das alterações identificadas em pacientes com ACS, segregando com padrão de herança autossômico dominante e também recessivo:

- 2/13 das variantes patogênicas em *PLCB4* ocorrem em homozigose e levam à perda de função da proteína, sendo: 1 caso com deleção intragênica que ocasiona troca do quadro de leitura (*frameshift*), resultando em códon de parada prematuro; e 1 caso de heterozigoto composto predito por romper sítio de *splice* (Figura 6C). Estas variantes resultam no aparecimento de alterações extra-craniofaciais, como distúrbios gastrointestinais e macropênis mencionados anteriormente (Gordon *et al.*, 2013a; Kido *et al.*, 2013).
- 11/13 das variantes patogênicas em *PLCB4* ocorrem em heterozigose, são preditas *missense* e se localizam dentro dos domínios catalíticos X e Y da proteína (Figura 6B) (Gordon *et al.*, 2013a; Rieder *et al.*, 2012), domínios estes presentes em todas as 11 isoformas de PLC (revisto em Rhee, 2001); Essas alterações são preditas por afetarem pontes de hidrogênio e iônicas essenciais para a ação de *PLCB4* na catálise de PIP2 em IP3 e DAG, agindo com um mecanismo funcional dominante negativo (Gordon *et al.*, 2013a; Kido *et al.*, 2013; Rieder *et al.*, 2012). Essa hipótese é baseada na presença de variantes *missense* nos domínios catalíticos X e Y do gene *schmerle* (*she*) de *zebrafish* (*Danio rerio*), que codifica uma proteína ortóloga de *Plc β 3*

(homóloga à PLC β 4) e ocasionam um efeito dominante negativo com redução de elementos faciais cartilaginosos (Walker, *et al.*, 2007 e Gordon *et al.*, 2013a).

EDN1

A EDN1 é uma proteína primeiro traduzida como pre-proendotelina com 212 aminoácidos, posteriormente quebrada pela furina em 2 sítios específicos de reconhecimento (na região C-terminal da sequência consenso Arg-Ser-Lys-Arg) para gerar a *big-endothelin*, então com 38 aminoácidos; e a seguir, a *endothelin converting enzyme* (ECE) faz a quebra da *big-endothelin* em EDN1 madura e ativa, com 21 aminoácidos (revisto em Clouthier *et al.*, 2013; Gordon *et al.*, 2013b).

Variantes em *EDN1* foram observadas segregando de forma autossômica dominante e também recessiva, observadas em casos distintos de ACS e com grande variabilidade fenotípica.

Uma das variantes patogênicas encontradas em EDN1, a p.(Lys91Glu), é predita por alterar o sítio de reconhecimento da furina, enquanto que a variante p.(Pro77His) se localiza dentro da *bigEDN1* e é predita por desestabilizar a proteína. Ambas foram vistas em homozigose e em pacientes com o fenótipo da ACS. Sugere-se que as variantes atuem de maneira hipomórfica, uma vez que camundongos *Edn1* homozigotos nulos desenvolvem um fenótipo mais grave do que o encontrado nos pacientes com estas alterações. Variantes em heterozigose, p.(Val64Asp) (localizada na EDN1 madura) e p.(Tyr83*) (localizada na *bigEDN1*), também foram encontradas e preditas por diminuir a capacidade de ligação do peptídeo e levar a um alelo nulo via decaimento mediado por alteração *nonsense*, respectivamente (Figura 6D). Quando presentes, as variantes em heterozigose causam somente IQME nos pacientes. Assim, é proposto que

as diferenças fenotípicas encontradas em casos de variantes em homozigose e heterozigose em *EDN1* estariam relacionadas com a quantidade de proteína residual funcional (Gordon *et al.*, 2013b).

Figura 6. Esquema das proteínas GNAI3, PLCB4 (gene representado abaixo) e EDN1 e as respectivas variantes patogênicas encontradas em casos da ACS (indicadas abaixo de cada esquema). Os domínios conservados de GNAI3 e PLCB4 foram reportados como vistos no *Conserved Domain Database* (CDD). EDN1 foi modificado de Gordon *et al.*, 2013b. (A) GNAI3 mostrando os domínios G1-G5 box em cinza; (B) PLCB4 mostrando os domínios em cinza: PH (*pleckstrin homology*), EF (*EF hand-like*), domínios catalíticos X e Y e C2 (domínio de ligação ao cálcio); (C) região parcial do *PLCB4* mostrando intron 12 ao intron 25; exons representados como barras verticais pretas ao longo da barra horizontal; regiões entre exons representam os introns; alelos que compõem o heterozigoto composto estão em regiões acceptora e doadora de *splicing*, respectivamente na imagem. (D) EDN1: bigEDN1 mostrada em duas escalas de cinza; EDN1 madura mostrada em cor cinza escuro; cabeças de setas vazias indicam o sítio de clivagem da furina; cabeça de seta cheia (preto) indica o sítio de clivagem de ECE; SP região de sinal de peptídeo.

VIA EDN1-EDNRA-DLX5/6 DE SINALIZAÇÃO

As proteínas PLCB4 e GNAI3 são preditas por atuarem como mediadores intracelulares na via da endotelina-receptor de endotelina tipo A (EDN1-EDNRA) (Rieder *et al.*, 2012) como discutido adiante. Por sua vez, as variantes patogênicas encontradas em *EDN1*, em pacientes com ACS, confirmam o envolvimento da via com a doença.

A ACS é causada por alterações em domínios faciais específicos derivados das NCC que migram para os arcos faríngeos. A sinalização através do *Ednra*, um receptor transmembrana acoplado à proteína G, é fundamental para o estabelecimento da identidade das NCC no domínio mandibular do primeiro arco faríngeo (Kurihara *et al.*, 1994; Clouthier *et al.*, 1998; Clouthier *et al.*, 2010). Camundongos com perda de *Edn1*, *Ece1* ou *Ednra* apresentam graves alterações de estruturas derivadas da proeminência mandibular do primeiro arco e dos arcos 2-4, como: malformações da mandíbula, *malleus*, *incus* e estruturas da traqueia; além de uma transformação homeótica da mandíbula em estrutura semelhante à maxila (duplicação da maxila) (Clouthier *et al.*, 1998; Yanagisawa *et al.*, 1998; Kurihara *et al.*, 1994). Para entender um pouco mais sobre o papel da endotelina é importante saber que os arcos faríngeos podem ser divididos em três domínios (Tavares *et al.*, 2012 revisto em Clouthier *et al.*, 2013): (1) domínio distal, que dá origem a cartilagem de Meckel, osso mandibular e parte do *malleus* em camundongo (Ruest *et al.*, 2003); (2) domínio intermediário, que em camundongos dá origem a uma porção da mandíbula proximal, parte do *incus* e o tecido fibroso ao redor da junção entre o *malleus* e o *incus* (Ruest *et al.*, 2003; Tavares *et al.*, 2012; Tucker *et al.*, 2004); (3) e o domínio proximal, ainda não bem definido em

camundongo, mas que provavelmente dá origem à estruturas mais proximais da mandíbula (Depew *et al.*, 2005; Ruest *et al.*, 2004).

Nos domínios distal e intermediário, a ativação de Ednra leva a expressão de *Dlx5/Dlx6* (Ozeki *et al.*, 2004; Ruest *et al.*, 2004; Charité *et al.*, 2001). É proposto que os genes *Dlx* estabeleçam a segmentação dorso-ventral dentro dos arcos faríngeos com um padrão combinatório, semelhante ao que acontece com os genes *Hox* na segmentação antero-posterior dos arcos (Clouthier *et al.*, 2013). Camundongos *Dlx5*^{-/-} *Dlx6*^{-/-} mostram uma transformação homeótica da mandíbula em maxila, perdendo domínios de expressão de genes que atuam no desenvolvimento mandibular no primeiro arco faríngeo (*Alx4*, *dHAND*, *Dlx3*, *Dlx5/6*, *Bmp7* e *Pitx1*) enquanto que a expressão de genes que participam do desenvolvimento na proeminência maxilar (*Dlx1*, *Dlx2*, *Msx1*, *Msx2* e *Prx1*) se mantém (Beverdam *et al.*, 2002; Depew *et al.*, 2002). Também no domínio distal do arco faríngeo, *Dlx5/Dlx6* induzem a expressão de *basic helix-loop-helix transcription factor Hand2* onde, por sua vez, *Hand2* inibe *Dlx5* e *Dlx6*. Esse mecanismo de regulação negativa é fundamental para estabelecer a identidade proximo-distal do arco mandibular durante o desenvolvimento embrionário uma vez que a inativação de *Hand2* nas NCC, em camundongos, resulta em alterações no desenvolvimento mandibular e, principalmente, aglossia (Barron *et al.*, 2011) (Figura 7). Contudo, a indução de *Hand2* por *Dlx5/Dlx6* ocorre, provavelmente, de maneira alternada e compensatória, uma vez que embriões de camundongo *Dlx5*^{-/-} ou *Dlx6*^{-/-} não apresentam diminuição da expressão de *Hand2* (Jeong *et al.*, 2008). Já dentro do domínio intermediário, a sinalização de Ednra regula a expressão de *Dlx3* e *Nkx3.2* (Clouthier *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2003).

Figura 7. Camundongos mutantes para genes ativados na via Edn1-Ednra. À direita de cada imagem marcação para osso (vermelho – coloração de vermelho de alizarina) e cartilagem (azul – coloração de azul de alcian). (A) Camundongo com fenótipo selvagem (wt); (B) Camundongo mutante *Ednra*^{-/-}; observe nas duas imagens a mandíbula menor em comparação com a mostrada na figura A. (C) Camundongo selvagem (wt) e mutante *Dlx5/6*^{-/-}; cabeça de seta branca indica tecido mole atípico; vb e vbf: folículo de vibrissa. À direita da imagem: cabeça de seta verde indica perda de estruturas nasais; UI: incisivos superiores hipoplásticos; mx*: transformação do osso dentário em maxila (mx); LI: incisivos inferiores rudimentares. (D) Camundongo selvagem (wt) e mutante *Hand2*^{cko}; note a ausência da língua [(t), em wt; (*) em *Hand2*^{cko}]; md: mandíbula; in: incisivos; mv: vibrissas. À direita da imagem: retrognatia; md: mandíbula. Figuras retiradas e modificadas de: (A,B) Clouthier *et al.*, 2013 (veja também Ruest *et al.*, 2004 para mais detalhes; (C) Depew *et al.*, 2002; e (D) Barron *et al.*, 2011.

Com isso vemos a importância do papel da EDN1-DLX5/6 durante o desenvolvimento mandibular e fica evidente que as alterações na via EDN1-EDNRA em modelos animais levam à malformações muito parecidas às ocorridas em pacientes com ACS. Alterações similares também foram observadas em camundongos $G\alpha_q^{(-/-)}G\alpha_{11}^{(+/-)}$ que possuem malformações em estruturas craniofaciais como mandíbula e anel timpânico semelhantes, embora menos graves, às alterações presentes em camundongos com deficiência de *Edn1* (Kurihara *et al.*, 1994) e *Ednra* (Clouthier *et al.*, 1998). Os estudos indicam que $G\alpha_q$ e $G\alpha_{11}$ sejam mediadoras da sinalização de *Edn1* nos arcos faríngeos, uma vez que uma única cópia de *G\alpha_{11}* resulta na diminuição da expressão de *Dlx3* e *Dlx6* e mostra que níveis mínimos de expressão e atividade de $G\alpha_q$ e $G\alpha_{11}$ são necessárias para a expressão de alguns alvos da via da endotelina-1 (Ivey *et al.*, 2003).

Ainda, a literatura mostra que o gene *she* (*schlerme*) em *zebrafish*, que codifica um ortólogo a *Plcb3* (homólogo de *PLCB4*) age abaixo do receptor de endotelina, uma vez que mutações nesse gene resultam na redução da expressão de *dlx5a*, *dlx6a* e *dlx3b* e em alterações de estruturas derivadas dos arcos faríngeos: como hipoplasia e fusão dos arcos faríngeos. As alterações craniofaciais assemelham-se às ocorridas quando a via da *Edn1* é comprometida, no entanto sendo menos graves (Walker *et al.*, 2007).

Baseado nestes estudos de $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ e *Plcb3*, bem como nos achados clínicos dos pacientes com ACS origina-se a hipótese de que *PLCB4* e *GNAI3* atuem na via EDN1-EDNRA (Figura 8). Além desses, o trabalho de Rieder *et al.* (2012) mostra a redução de genes alvos de EDN1-EDNRA, *DLX5* e *DLX6*, em osteoblastos mandibulares de quatro pacientes com mutações em *PLCB4* ou *GNAI3* não aparentados e um caso molecularmente não resolvido de ACS.

Figura 8. Via proposta da sinalização intracelular induzida por Edn1-Ednra. Azul: camundongo e *zebrafish*. Verde: humanos. Rosa: camundongos. Vide texto para maiores detalhes. Retirado e modificado de Clouthier *et al.* (2013).

Diante da introdução acerca do tema, podemos concluir que a ACS é uma doença altamente heterogênea tanto no que diz respeito às variantes causativas, quanto ao espectro de variabilidade clínica ainda pouco caracterizado. Também, o mecanismo de ação das variantes patogênicas encontradas em *GNAI3* precisa ser elucidado, uma vez que os estudos recentes são controversos em propor ganho de função ou dominante negativo. Ainda, embora a identificação de *loci* e variantes causativas da ACS tenham ocorrido de forma crescente nos últimos três anos, nem todos os mecanismos genéticos relacionados com a síndrome são conhecidos. Além de uma quantidade significativa de casos ainda não investigados molecularmente e casos sem alterações nos três *loci* já relacionados com a doença, estudos anteriores do nosso grupo, realizados em pacientes da família F1, apresentam fortes evidências para a ocorrência de um quarto *locus* relacionado com a síndrome.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Identificamos três variantes em *GNAI3*, assim determinando a causa da ACS na família originalmente ligada a região 1p21.1-q23.3 e as primeiras variantes *de novo* em dois casos de ACS esporádicos;
2. Propomos que todas as variantes em *GNAI3*, até o momento descritas, interfiram direta ou indiretamente na ligação GDP/GTP, levando a um efeito dominante negativo;
3. Identificamos duas variantes em *PLCB4*, ainda não descritas, que corroboram o efeito dominante negativo;
4. Confirmamos e restringimos o quarto *locus* candidato a conter variante causativa de ACS;
5. Encontramos achados clínicos, ainda não descritos, em pacientes com ACS e variantes em *PLCB4*;
6. Pacientes com variantes em *GNAI3* podem apresentar perda auditiva sensorineural e/ou condutiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referente à introdução:

Websites:

Orphanet, coordenado pelo *French INSERM team*, <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

CDD – *Conserved Domain Database*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>

Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

Al-Qattan, M. M. (1998). Cosman (question mark) ear: congenital auricular cleft between the fifth and sixth hillocks. *Plastic and reconstructive surgery* 102(2): 439-441.

Barren, B., & Artemyev, N. O. (2007). Review Mechanisms of Dominant Negative G-Protein α Subunits, 3514(December 2006), 3505–3514.

Barron, F., Woods, C., Kuhn, K., Bishop, J., Howard, M. J., & Clouthier, D. E. (2011). Downregulation of *Dlx5* and *Dlx6* expression by *Hand2* is essential for initiation of tongue morphogenesis. *Development*, 138(11), 2249–2259.

Beverdam, A., Merlo, G. R., Paleari, L., Mantero, S., Genova, F., Barbieri, O., ... Levi, G. (2002). Jaw transformation with gain of symmetry after *Dlx5/Dlx6* inactivation: mirror of the past? *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 34(4), 221–7.

Carlson, B.M.. *Human Embryology and Developmental Biology*. 3rd Ed. Elsevier: Philadelphia, PA, USA. 2005. Gammil & Bronner-Fraser, 2003

Charité, J., McFadden, D. G., Merlo, G., Levi, G., Clouthier, D. E., Yanagisawa, M., ... Olson, E. N. (2001). Role of *Dlx6* in regulation of an endothelin-1-dependent, dHAND branchial arch enhancer. *Genes & Development*, 15(22), 3039–49.

Clouthier, D. E., Garcia, E., & Schilling, T. F. (2010). Regulation of facial morphogenesis by endothelin signaling: insights from mice and fish. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 152A(12), 2962–73.

Clouthier, D. E., Hosoda, K., Richardson, J. a, Williams, S. C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., ... Yanagisawa, M. (1998). Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development (Cambridge, England)*, 125(5), 813–824.

Clouthier, D. E., Passos-Bueno, M. R., Tavares, A. L. P., Lyonnet, S., Amiel, J., & Gordon, C. T. (2013). Understanding the basis of auriculocondylar syndrome: Insights from human, mouse and zebrafish genetic studies. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 163(4), 306–317.

Clouthier, D. E., Williams, S. C., Yanagisawa, H., Wieduwilt, M., Richardson, J. A., & Yanagisawa, M. (2000). Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. *Developmental Biology*, 217(1), 10–24.

Cosman, B., H. Bellin, *et al.* (1970). The Question Mark ear. *Plastic and reconstructive surgery* 46(5): 454-457.

- Crane, J., & Trainor, P. A. (2006). Neural crest stem and progenitor cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 267–286.
- Depew, M. J., Lufkin, T., & Rubenstein, J. L. R. (2002). Specification of jaw subdivisions by Dlx genes. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5592), 381–5.
- Depew, M. J., Simpson, C. a, Morasso, M., & Rubenstein, J. L. R. (2005). Reassessing the Dlx code: the genetic regulation of branchial arch skeletal pattern and development. *Journal of Anatomy*, 207(5), 501–561.
- Feig, L. a. (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nature Cell Biology*, 1(2), E25–E27.
- Garcia, S.M.L., Fernández C.G.. Embriologia. 2ª Ed. Editora Artmed: Porto Alegre. 2001.
- Gerkes, E. H., van Ravenswaaij, C. M. a, & van Essen, A. J. (2008). Question mark ears and post-auricular tags. *European Journal of Medical Genetics*, 51(3), 264–7.
- Gordon, C. T., Petit, F., Kroisel, P. M., Jakobsen, L., Zechi-Ceide, R. M., Oufadem, M., ... Amiel, J. (2013b). Mutations in endothelin 1 cause recessive auriculocondylar syndrome and dominant isolated question-mark ears. *American Journal of Human Genetics*, 93(6), 1118–25.
- Gordon, C. T., Vuillot, A., Marlin, S., Gerkes, E., Henderson, A., AlKindy, A., ... Amiel, J. (2013a). Heterogeneity of mutational mechanisms and modes of inheritance in auriculocondylar syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 50(3), 174–86.
- Gorlin, R.J.; Cohen, M.M.; Levin, L.S. (1990) Syndromes of the head and neck. Oxford University Press 3rd Ed. Oxford, UK
- Graham, A., Begbie, J., & McGonnell, I. (2004). Significance of the cranial neural crest. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 229(1), 5–13.
- Guion-almeida, M. L., Kokitsu-nakata, N. M., & Zechi-ceide, R. M. (1999). Auriculo-Condylar Syndrome : Further Evidence for a New Disorder, 133(April), 130–133.
- Guion-Almeida, M. L., Zechi-Ceide, R. M., Vendramini, S., & Kokitsu-Nakata, N. M. (2002). Auriculo-condylar syndrome: additional patients. *American Journal of Medical Genetics*, 112(2), 209–14.
- Ivey, K., Tyson, B., Ukidwe, P., McFadden, D. G., Levi, G., Olson, E. N., ... Wilkie, T. M. (2003). Galphaq and Galpha11 proteins mediate endothelin-1 signaling in neural crest-derived pharyngeal arch mesenchyme. *Developmental Biology*, 255(2), 230–237.
- Jampol, M., Repetto, G., Keith, D. a, Curtin, H., Remensnyder, J., & Holmes, L. B. (1998). New syndrome? Prominent, constricted ears with malformed condyle of the mandible. *American Journal of Medical Genetics*, 75(5), 449–52.
- Jeong, J., Li, X., McEvelly, R. J., Rosenfeld, M. G., Lufkin, T., & Rubenstein, J. L. R. (2008). Dlx genes pattern mammalian jaw primordium by regulating both lower jaw-specific and upper jaw-specific genetic programs. *Development (Cambridge, England)*, 135(17), 2905–2916.
- Johnson, J. M., Moonis, G., Green, G. E., Carmody, R., & Burbank, H. N. (2010). Syndromes of the First and Second Branchial Arches, Part 1: Embryology and Characteristic Defects. *American Journal of Neuroradiology*, 14–19.
- Kido, Y., Gordon, C. T., Sakazume, S., Ben Bdira, E., Dattani, M., Wilson, L. C., ... Nagai, T. (2013). Further characterization of atypical features in auriculocondylar syndrome caused by recessive PLCB4 mutations. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 161(9), 2339–46.
- Knecht, A. K., & Bronner-Fraser, M. (2002). Induction of the neural crest: a multigene process.

Nature Reviews. Genetics, 3(6), 453–461.

- Kurihara Y., Kurihara H., Suzuki H., Kodama T., Maemura K., Nagai R., Oda H., Kuwaki T., Cao W.-H., Kamada N., Jishage K., Ouchi Y., Azuma S., Toyoda Y., Ishikawa T., Kumada M., Yazaki Y. (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*, 368, 703–710.
- Larsen, W.J.. Human embryology. 2nd Edition. Ed. New York: Churchill Livingstone. 1997.
- Masotti, C., Oliveira, K. G., Poerner, F., Splendore, A., Souza, J., Freitas, R. D. S., ... Passos-Bueno, M. R. (2008). Auriculo-condylar syndrome: mapping of a first locus and evidence for genetic heterogeneity. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 16(2), 145–52.
- Miller, C. T., Yelon, D., Stainier, D., & Kimmel, C. B. (2003). Two endothelin 1 effectors, *hand2* and *bapx1*, pattern ventral pharyngeal cartilage and the jaw joint. *Development (Cambridge, England)*, 130(7), 1353–65.
- Minoux, M., & Rijli, F. M. (2010). Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development (Cambridge, England)*, 137(16), 2605–21.
- Nakano, M., Fujita, T., Ohtani, J., Kawata, T., Kaku, M., Motokawa, M., ... Tanne, K. (2009). Effects of mandibular advancement on growth after condylectomy. *Journal of Dental Research*, 88(3), 261–5.
- Ozeki, H., Kurihara, Y., Tonami, K., Watatani, S., & Kurihara, H. (2004). Endothelin-1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mechanisms of Development*, 121(4), 387–395.
- O’Rahilly, R., Müller, F. Human embryology and teratology. New York: Wiley-Liss. 1992.
- Park, C. (1999). Lower auricular malformations: their representation, correction, and embryologic correlation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 104(1), 29–40.
- Passos-Bueno, M. R., Ornelas, C. C., & Fanganiello, R. D. (2009). Syndromes of the first and second pharyngeal arches: A review. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 149A(8), 1853–9.
- Priolo, M., M. Lerone, *et al.* (2000). Question mark ears, temporomandibular joint malformation and hypotonia: auriculo-condylar syndrome or a distinct entity? *Clinical dysmorphology* 9(4): 277-280.
- Rhee, S. G. (2001). Regulation of Phosphoinositide-specific Phospholipase C. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 281–312.
- Rieder, M. J., Green, G. E., Park, S. S., Stamper, B. D., Gordon, C. T., Johnson, J. M., ... Cunningham, M. L. (2012). A human homeotic transformation resulting from mutations in *PLCB4* and *GNAI3* causes auriculocondylar syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 90(5), 907–14.
- Romanelli Tavares, V.L. Identificação de mutações associadas à Síndrome Aurículo-Condilar. Julho de 2011. 96 páginas. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.
- Ruest, L. B., Dager, M., Yanagisawa, H., Charité, J., Hammer, R. E., Olson, E. N., ... Clouthier, D. E. (2003). dHAND-Cre transgenic mice reveal specific potential functions of dHAND during craniofacial development. *Developmental Biology*, 257(2), 263–277.
- Ruest, L.-B., Xiang, X., Lim, K.-C., Levi, G., & Clouthier, D. E. (2004). Endothelin-A receptor-dependent and -independent signaling pathways in establishing mandibular identity. *Development (Cambridge, England)*, 131(18), 4413–23.
- Ruffins, S., & Bronner-Fraser, M. (2000). A critical period for conversion of ectodermal cells to

- a neural crest fate. *Developmental Biology*, 218(1), 13–20.
- Sadler, T.W.. Langman's Medical Embryology. 7th Ed. Williams & Wilkins: Baltimore, Maryland, USA. 1995.
- Santagati, F., & Rijli, F. M. (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(10), 806–18.
- Serrano, M. J., So, S., Svoboda, K. K. H., & Hinton, R. J. (2011). Cell fate mediators Notch and Twist in mouse mandibular condylar cartilage. *Archives of Oral Biology*, 56(6), 607–613.
- Shkalim, V., Eliaz, N., Linder, N., Merlob, P., & Basel-Vanagaite, L. (2008). Autosomal dominant isolated question mark ear. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 146A(17), 2280–3.
- Sprang, S. R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 639–78.
- Storm, A. L., Johnson, J. M., Lammer, E., Green, G. E., & Cunniff, C. (2005). Auriculo-condylar syndrome is associated with highly variable ear and mandibular defects in multiple kindreds. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 138A(2), 141–5.
- Tavares, A. L. P., Garcia, E. L., Kuhn, K., Woods, C. M., Williams, T., & Clouthier, D. E. (2012). Ectodermal-derived Endothelin1 is required for patterning the distal and intermediate domains of the mouse mandibular arch. *Developmental Biology*, 371(1), 47–56.
- Tucker, A. S., Watson, R. P., Lettice, L. a, Yamada, G., & Hill, R. E. (2004). Bapx1 regulates patterning in the middle ear: altered regulatory role in the transition from the proximal jaw during vertebrate evolution. *Development (Cambridge, England)*, 131(6), 1235–1245.
- Uuspaa, V. (1978). Combined bilateral external ear deformity and hypoplastic mandible. Case report. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery* 12(2): 165-167.
- Walker, M. B., Miller, C. T., Swartz, M. E., Eberhart, J. K., & Kimmel, C. B. (2007). phospholipase C, beta 3 is required for Endothelin1 regulation of pharyngeal arch patterning in zebrafish. *Developmental Biology*, 304(1), 194–207.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 5), 843–6.
- Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R. P., Richardson, J. a, Williams, S. C., Clouthier, D. E., ... Hammer, R. E. (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development (Cambridge, England)*, 125(5), 825–836.