Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Melina Guerreiro Rodrigues

Em busca da etiologia das displasias frontonasais

In search of the etiology of frontonasal dysplasias

São Paulo

2013

Melina Guerreiro Rodrigues

Em busca da etiologia das displasias frontonasais

In search of the etiology of frontonasal dysplasias

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador: Prof. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Rodrigues, Melina

Em busca da etiologia das displasias frontonasais

70 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Displasia frontonasal
2. CNV
3. Genes candidatos

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof. Dr(a). Prof. Dr(a).

_____

Prof. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

Orientadora

Dedicatória

Aos meus pais, base e exemplos maiores de minha vida,

por toda dedicação e amor.

Ao André Luiz Cechini, meu grande companheiro, pela

amizade, amor, paciência e apoio incondicionais durante

os anos de realização deste trabalho.

“The greater our knowledge increases the more our ignorance unfolds.”

- John F. Kennedy

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Elaine e Gilberto, por todo carinho, amor e dedicação. Obrigada por terem ensinado a mim e minhas irmãs a valorizar cada oportunidade que a vida nos dá, e por nos mostrarem que entre todos os bens existentes, o conhecimento é o maior. Agradeço a Deus por ter me permitido nascer, crescer e poder contar sempre com os grandes exemplos que vocês são.

Agradeço às minhas irmãs, Talita e Aline, por todo apoio, torcida e força que sempre me passaram. Obrigada pelo carinho, amor e amizade de vocês, que mesmo à distância se fazem tão presentes em minha vida.

Agradeço ao André, amigo e companheiro de tantos anos, pelo carinho, atenção, amor, paciência e apoio que sempre me dedicou. Você fez meus dias mais felizes e leves, e me mostrou que mesmo em dias conturbados temos muitas razões para sorrir. Obrigada por tudo!

Agradeço ao Paulo e à Vera pelo carinho com que sempre me trataram. Obrigada por terem me acolhido tão bem e por todo apoio que deram a mim e ao André.

Família, Amo Vocês!!!

Agradeço à prof. Maria Rita pela oportunidade de aprender com ela e seu grupo. Obrigada pela paciência e dedicação de sua orientação, sem as quais esse e tantos outros trabalhos não existiriam.

Agradeço aos queridos amigos do laboratório por todo auxílio em experimentos, pelas discussões de artigos e principalmente pelas risadas. De forma especial, agradeço às amigas e irmãs de coração: Cintia, Francine, Andressa, Larissa, Simone, Ana e Joana. Obrigada por estarem sempre disponíveis e por tornarem os momentos mais simples em especiais!!! Cintia, obrigada por estar

todos os dias ao meu lado... e não estou me referindo apenas aos nossos lugares na bancada! rsrsrs... Amigas, amo vocês!!!

Agradeço às amigas de muitos anos, Thaisa e Patrícia, por serem prova de que amizade verdadeira transcende as fronteiras geográficas. Obrigada por serem tão especiais! Amo vocês!!!

Agradeço a todos os colaboradores que tornaram este estudo possível: Dra. Roseli Maria Zechi Ceide, Dra. Débora Romeo Bertola, Dra. Maria Leine Guion de Almeida, Dr. Antônio Richieri Costa, Dra. Josiane de Souza, Dr. Renato da Silva Freitas, Dra. Carla Rosenberg, Dra. Angela Maria Vianna Morgante, MSc. Ana Carolina Fonseca.

Agradeço com carinho aos pacientes e seus familiares pela participação tão especial.

Agradeço os apoios financeiros: CEPID/FAPESP, CAPES e CNPq.

Notas

Esta dissertação compreende um trabalho desenvolvido durante os anos de 2010 a 2013 no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (CEGH/IB-USP).

As referências citadas nos artigos (capítulos 3 a 6) encontram-se ao final de cada um. As referências bibliográficas dos capítulos 1, 2 e 7 (Introdução, Casuística e Métodos e Discussão Geral e Conclusões, respectivamente) estão relacionadas ao final da dissertação.

Os artigos estão redigidos em inglês, por motivos referentes à publicação.

Índice

I. Introdução 1

1.1 Aspectos Gerais das Displasias Frontonasais 1

1.1.1 Desenvolvimento embriológico 2

1.1.2 Etiologia 3

1.2 Justificativa 6

1.3 Objetivo 8

II. Casuística e Métodos 9

2.1 Casuística 9

2.2 Métodos 10

2.2.1 Amostras de DNA 10

2.2.2 Triagem dos Genes *EFNB1, ALX1, ALX3* e *ALX4* 10

2.2.3 Análise de CNVs 11

2.2.4 Mapeamento do ponto de quebra 12

III. Transmissão Vertical de um Fenótipo Frontonasal Causado por uma Nova Mutação em *ALX4* 15

IV. Nova Mutação em Homozigose Causando Fenótipo de Displasia Frontonasal Relacionada a *ALX1* 21

V. Caso de Displasia Frontonasal e Outras Anomalias em um Menino com ins(12;4) *De Novo* Aparentemente Balanceada 30

VI. Análise de Variações de Número de Cópias em Pacientes com Displasia Frontonasal e Atraso de Desenvolvimento 45

VII. Discussão Geral e Conclusões 58

Resumo 62

Abstract 64

Referências Bibliográficas 66

I. Introdução

1.1 Aspectos Gerais das Displasias Frontonasais

Anomalias craniofaciais respondem por aproximadamente um terço de todas as anomalias congênitas humanas (Trainor e Krumlauf, 2000). Dentre elas estão os defeitos de linha média craniofacial, que compreendem alterações do sistema nervoso central (SNC), decorrentes de falha na clivagem do prosencéfalo, e alterações faciais, decorrentes de falha no desenvolvimento do processo frontonasal. Considerada um plano sagital imaginário, a linha média se refere a um campo especial de desenvolvimento que determina tanto a posição das vísceras nos embriões como o plano de clivagem de gêmeos monozigóticos (Opitz, 1993 revisado por Guion-Almeida, 2000). Defeitos no desenvolvimento da linha média craniofacial levam a diferentes fenótipos faciais, tanto quando há redução do espaço interorbitário, tendendo para a holoprosencefalia (HPE) e até ciclopia, como quando há uma expansão, sendo a duplicação facial ou *diprosopus* seu estágio mais grave (Brugmann et al., 2010).

Dentro do espectro de expansão de linha média, a displasia frontonasal (DFN) compreende quadros de aparência facial variável, sendo clinicamente caracterizada por dois ou mais dos seguintes sinais: hipertelorismo com consequente alargamento da base nasal; fissura facial mediana afetando o nariz ou o nariz e lábio superior e, por vezes, o palato; fissura alar (uni ou bilateral); ponta nasal ausente; crânio anterior bífido, e implantação em "V" dos cabelos na fronte (Sedano e Gorlin, 1988 revisado por Guion-Almeida, 2000). A DFN pode ser vista como um defeito de desenvolvimento que pode ocorrer por si só ou como parte do quadro clínico de várias síndromes, a grande maioria de etiologia e padrão de herança desconhecidos (Guion-Almeida, 2000; Guion-Almeida et al., 1996, 2007; Guion-Almeida e Richieri-Costa, 2001, 2003, 2009; Wu, Vargevik e Slavotinek, 2007). Há

trabalhos que sugerem uma maior ocorrência de DFN em meninos, mas estes resultados são ainda controversos (Guion-Almeida et al., 1996; Rizvi et al., 2010; Antoneli, 2011).

1.1.1 Desenvolvimento embriológico

A face dos vertebrados é uma estrutura complexa que consiste de uma grande variedade de tecidos com arranjo precisamente definido. Durante a embriogênese, a face desenvolve-se a partir de 4 primórdios faciais, os quais envolvem a boca primitiva e os placódios nasais. A proeminência frontonasal, o processo nasal lateral e o processo maxilar expandem-se e fundem-se parcialmente para formar o maxilar superior e a região nasal, enquanto o primórdio mandibular dá origem à mandíbula. Inicialmente, todos os primórdios faciais consistem de um centro mesenquimal indiferenciado revestido por ectoderme. O mesênquima contém células da crista neural e do mesoderma cranial. As células derivadas da crista neural dão origem ao esqueleto facial, enquanto as células mesodermais dão origem, principalmente, aos músculos faciais (Nie et al., 2006). O processo de desenvolvimento craniofacial é controlado por uma complexa rede de genes que inclui genes que codificam uma variedade de moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição e fatores e receptores de crescimento. A ruptura dessa regulação molecular resulta em diversos defeitos craniofaciais (Francis-West et al., 1998; Wilkie e Morris-Kay et al., 2001; Jiang et al., 2006; Nie et al., 2006; Handrigan et al., 2007).

O espectro fenotípico da DFN é resultante de uma interrupção no desenvolvimento normal do processo frontonasal como uma forma de defeito de campo e o aspecto facial é mais grave quanto mais precocemente ocorrer essa alteração (Sedano e Gorlin, 1988 revisado por Guion-Almeida, 2000). Do ponto de vista embriológico, o desenvolvimento inadequado do placódio nasal, impedindo a formação da cápsula nasal, ou um defeito intrínseco da cápsula nasal, podem levar ao

fenótipo facial de DFN. Anomalias de linha média craniofacial podem, ainda, resultar de anomalias do processo sutural dos ossos da abóbada craniana com os ossos da base do crânio (fronto-etmoidal) ou resultar da alteração na harmonia do fechamento das suturas da base do crânio, principalmente da sutura esfeno-etmoidal. Nessas circunstâncias, é comum ocorrer encefalocele frontonasal, fronto-etmoidal, etmoidal e esfeno-etmoidal. A presença de encefaloceles nessas linhas de sutura, usualmente determinam hipertelorismo de graus variáveis e fenótipo facial de DFN. O envolvimento do processo frontonasal, nessas situações, seria secundário. Diferenciação prematura e rápida dos ossos do neurocrânio levando à fusão precoce das suturas afetando, secundariamente, o desenvolvimento do cérebro, pode resultar também numa face semelhante à DFN. Sedano e Gorlin (1988 revisado por Guion-Almeida, 2000) comentam, ainda, que a ação de um agente em período embrionário precoce que implique no desenvolvimento anormal do primeiro arco branquial pode levar a um consequente prejuízo no desenvolvimento do processo frontonasal. Sendo assim, o processo embriogênico que induz a formação da face observada na DFN e nas condições que incluem este fenótipo facial é variável.

1.1.2 Etiologia

A maioria dos casos de DFN é esporádica. Das síndromes que ocorrem com DFN, até pouco tempo apenas a displasia craniofrontonasal (DCFN) apresentava etiologia genética definida, sendo mutações no gene *EFNB1* responsáveis pelo quadro clínico de grande parte dos afetados. A DCFN se caracteriza por anomalias estruturais do SNC, craniossinostose coronal, hipertelorismo ocular, nariz bífido, fissura de lábio e palato e anomalias esqueléticas. A grande maioria das mutações do gene *EFNB1* ocorrem em seus éxons 2 e 3 (Twigg et al., 2004; Wieland et al., 2004; Twigg et al., 2006; Wallis et al., 2008), e a natureza variável dessas mutações sugere que o fenótipo resulta de perda de função da proteína efhrin-B1 (Twigg et al., 2004; Wieland et al., 2004; Twigg et al., 2006). Embora a

DCFN apresente herança dominante ligada ao X, a gravidade do fenótipo nas mulheres afetadas é maior do que nos homens. O mecanismo de interferência celular, que tem sido apontado como a explicação mais adequada para tal paradoxo (Compagni et al., 2003; Twigg et al., 2004; Wieland et al., 2004; Wieacker e Wieland, 2005; Wieland et al., 2008; Evers et al., 2013), seria resultado da combinação de: (1) inativação randômica do X nas mulheres, (2) funções específicas do gene *EFNB1* (que é sujeito a essa inativação) nas propriedades das superfícies celulares, levando a interações anormais entre células no estado mosaico, e (3) provável redundância funcional do gene em homens hemizigotos não mosaicos (Twigg et al., 2013). Estudos com camundongos (Compagni et al., 2003; Wieland et al.,2008) e a detecção de mosaicismo somático em todos os indivíduos do sexo masculino com quadro de DCFN grave (semelhante ao que ocorre nas mulheres) investigados por Twigg et al. (2013) corroboram esta hipótese.

Três recentes estudos atraíram atenção aos fatores de transcrição *Homeobox aristaless-related*, relacionando-os à patogênese molecular de algumas das síndromes com DFN (Twigg et al., 2009; Kayserili et al., 2009; Uz et al., 2010). Acredita-se que, nos vertebrados, os genes *Aristaless-like homeobox Alx1 (Cart1), Alx3 e Alx4* codifiquem proteínas que exercem papéis críticos durante o desenvolvimento de estruturas derivadas do mesênquima craniofacial, do primeiro arco branquial e dos brotos de membros (revisto em Uz et al., 2010). Embora camundongos com deleções tanto hetero quanto homozigotas do *Alx3* não exibam fenótipo óbvio de expansão de linha média, mutações em homozigose no *ALX3* em seres humanos causam a frontorrinia, uma síndrome descrita por Twigg et al. (2009). A frontorrinia se caracteriza por hipertelorismo, ponte nasal larga, crista nasal curta, ossos nasais afunilados com a ponta nasal bífida, columela ampla unida à face acima da asa nasal, narinas em fenda amplamente separadas, filtro longo, cume do filtro proeminente, ocasionalmente com edema bilateral adicional em direção às narinas, e entalhe medial no lábio superior e alvéolos. Aparentemente a expressividade dessa síndrome não é muito variável e não há correlação genótipo-fenótipo; até o momento 14 casos foram reportados na literatura (Twigg et al.,

2009; Pham et al., 2011). Kayserili et al. (2009), por sua vez, demonstraram que mutações em homozigose no gene *ALX4* respondem pelo fenótipo de dois pacientes com hipertelorismo, ponta nasal bífida, grave defeito de crânio, craniossinostose coronal, agenesia de corpo caloso, criptorquidismo, alopecia total e retardo mental. Segundo revisão dos próprios autores, camundongos homozigoto-mutantes para *Alx4* compartilham diversas das características faciais apresentadas pelos pacientes. Kayserili et al. (2012) encontraram uma mutação em homozigose no *ALX4* causando também um fenótipo mais leve de DFN em um menino com hipertelorismo, base e ponte nasais largas, ponta nasal bífida, fissura alar, columela ampla, apêndice pré-auricular unilateral, sulco lábio-gengival alargado e forame parietal bilateral alargado. Esta última característica já foi descrita ocorrendo isoladamente em indivíduos com mutação em heterozigose no *ALX4* (Mavrogiannis et al., 2006). Já Uz et al. (2010) encontraram mutações em homozigose no gene *ALX1* em dois pacientes com microftalmia bilateral grave, fissura facial oblíqua bilateral, palato completamente fissurado, hipertelorismo, ponte nasal larga com hipoplasia de narinas, e orelhas com baixa implantação e posteriormente rodadas. Camundongos com *knockout* homozigoto para o *Alx1* apresentam, além da cartilagem nasal gravemente afetada, defeitos de fechamento do tubo neural que levam a anencefalia e grandes defeitos cranianos (revisto em Uz et al., 2010). Não foi encontrada anomalia de fechamento de tubo neural nos pacientes por eles estudados. Em todos os casos de DFN relacionada a genes *ALX* descritos até então o padrão de herança é autossômico recessivo.

Em raras circunstâncias foram observadas alterações cromossômicas em indivíduos com DFN, tais como: trisomia 2q31-2qter e monossomia do 7q36-7qter em uma menina com DFN e arrinencefalia; translocação equilibrada entre os cromossomos 15 (15q22) e 22 (22q13) em uma criança com DFN; rearranjo cromossômico complexo envolvendo os cromossomos 3 (3q23 e 3q27), 7 (7q21.3) e 11 (11q21), em um menino com DFN (Wu et al., 2007); deleção parcial do 2q36 em uma menina com DFN, dolicocefalia, hipertricose, alterações esqueléticas, deficiência intelectual leve, hipotonia, entre outros achados, e em estado mosaico em sua mãe, que apresentou quadro mais

leve (Freitas et al., 2012); deleção parcial do 21q22.3 em uma menina com DFN, agenesia de corpo caloso, encefalocele e anomalias oculares (Guion-Almeida et al., 2012). Esses achados sugeriram que tais regiões cromossômicas podem conter genes associados à etiologia da DFN.

A descrição de raros casos de DFN com recorrência familial, a observação de alterações cromossômicas em determinados pacientes com DFN e a identificação de mutações em *EFNB1, ALX1, ALX3* e *ALX4* como causativas de quadros que cursam com DFN mostram a influência de fatores genéticos em sua etiologia. Embora a discordância de DFN entre gêmeos monozigóticos a princípio sugira a ação de fatores ambientais no fenótipo, vale notar que ela pode ser também explicada por mecanismos genéticos e epigenéticos (Guion-Almeida, 2000; Wu, Vargevik e Slavotinek, 2007), tais como mosaicismo cromossômico, mutações pós-zigóticas, metilação diferencial de DNA, entre outros (Silva et al., 2011).

1.2 Justificativa

Embora seja claro que haja heterogeneidade etiológica na DFN e quatro genes já tenham sido descritos como responsáveis por quadros com este fenótipo, a maioria dos casos continua sem identificação causal. Dessa forma, estudos envolvendo diferentes estratégias metodológicas em indivíduos com DFN podem auxiliar na compreensão de sua etiologia, a qual é ainda muito pouco conhecida. O melhor entendimento das causas da DFN poderão também auxiliar na realização de um aconselhamento genético mais preciso aos pacientes e seus familiares.

Uma estratégia que pode ser bem sucedida para a identificação de genes associados a doenças é a clonagem de pontos de quebra de rearranjos cromossômicos balanceados em indivíduos com um dado fenótipo, uma vez que tais pontos de quebra podem romper um ou mais genes ou regiões regulatórias importantes (Petek et al., 2001; Kim et al., 2008; Poot et al., 2010).

Nos últimos anos, tem-se demonstrado que variações de número de cópias (*copy number variations* – CNVs) podem estar relacionadas com a etiologia de diferentes entidades clínicas, a maioria com padrão de herança complexa tais como autismo e esquizofrenia (Sebat et al., 2007; Marshall et al., 2008; Sutrala et al., 2008; Xu et al., 2009). No entanto, CNVs também tem sido identificadas como mecanismo genético causativo de malformações congênitas, particularmente quando associadas a alterações de desenvolvimento (Krepischi-Santos et al., 2006; Shinawi e Cheung, 2008; Jehee et al., 2009; Sun et al., 2009; Rossi et al., 2009; Zhang et al., 2009). Estudo de CNVs seria, portanto, uma abordagem promissora para triagem genética em indivíduos com DFN e alterações de desenvolvimento. O uso de hibridização genômica comparativa por microarranjo (*microarray comparative genomic hybridization* – array-CGH) e de micrroarranjo de polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphism microarray* - SNP-arrays) são técnicas com eficiência comprovada para análise de CNVs nas diferentes plataformas disponíveis (Hester et al., 2009).

Embora a análise de CNVs seja uma boa abordagem para triagem em pacientes com malformações congênitas, ela não é capaz de identificar certos tipos de alterações genômicas plausíveis de explicar tais fenótipos, como mutações de ponto, pequenas deleções e inserções, entre outras. Para os genes nos quais mutações já foram efetivamente encontradas em pacientes com algum fenótipo que inclui DFN (*EFNB1, ALX1, ALX3* e *ALX4*), uma abordagem relativamente simples capaz investigar tais tipos de alterações é o sequenciamento dos genes.

1.3 Objetivo

O objetivo geral deste trabalho é identificar possíveis causas genéticas da DFN.

Os objetivos específicos, por sua vez, são:

- Verificar a presença de mutações nos genes *EFNB1, ALX1, ALX3* e *ALX4* em casos de DFN com ou sem atraso de desenvolvimento.

- Verificar se um rearranjo cromossômico previamente identificado em um caso de DFN, atraso de desenvolvimento e outras anomalias rompe um ou mais genes que possam estar relacionados ao quadro clínico do paciente.

- Verificar se CNVs podem estar relacionadas ao mecanismo etiopatológico de DFN associada a atraso de desenvolvimento.

II. Casuística e Métodos

2.1 Casuística

Ao todo foram incluídos neste estudo 10 pacientes:

- Um indivíduo com fenótipo brando de DFN cuja mãe apresenta quadro bastante semelhante, atendido no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP – **Capítulo 3**.

- Um indivíduo com fenótipo grave de DFN indicativo de mutação em *ALX1*, atendido no CEGH – **Capítulo 4**.

- Um indivíduo com DFN associada a outras anomalias que possui um rearranjo cromossômico detectável via cariótipo, avaliado pela Seção de Genética Clínica do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC) da Universidade de São Paulo, Bauru/SP – **Capítulo 5**.

- Sete indivíduos com DFN associada a alterações de desenvolvimento com ou sem outras anomalias, dos quais quatro são pacientes do HRAC e três do Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio-palatal (CAIF), Curitiba/PA – **Capítulo 6**.

Em todos os casos, os indivíduos somente foram incluídos no estudo mediante autorização expressa do paciente ou responsável através da concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética do HRAC (19/2011-SVAPEPE-CEP). Os pacientes atendidos no CEGH foram avaliados pela geneticista clínica Dra. Débora Romeo Bertola, do Instituto de Biociências, Departamento de Genética. Os pacientes atendidos no HRAC foram avaliados no Setor de Genética Clínica pela geneticista Dra. Roseli Maria Zechi Ceide, e pelos geneticistas clínicos

Dra. Maria Leine Guion de Almeida e Dr. Antônio Richieri Costa. Os pacientes atendidos no CAIF foram avaliados pela geneticista clínica Dra. Josiane de Souza e pelo cirurgião plástico e craniofacial Dr. Renato da Silva Freitas.

2.2 Métodos

Inicialmente foi realizada triagem de mutação nos genes *EFNB1, ALX1, ALX3* e *ALX4* em todos os pacientes. Para aqueles que mostraram resultados normais nos sequenciamentos desses genes, foi realizada análise de CNVs. Para o paciente com rearranjo cromossômico foi realizado também o mapeamento dos pontos de quebra.

2.2.1 Amostras de DNA

As amostras de DNAs utilizadas neste projeto tiveram sua concentração e a qualidade verificadas no aparelho *NanoDrop ND 1000* (espectrofotômetro da *Peqlab Biotechnologie™*) e em gel de agarose 1,0%.

2.2.2 Triagem dos Genes *EFNB1, ALX1, ALX3* e *ALX4*

Para todos os pacientes incluídos no estudo foi realizada triagem de mutação por sequenciamento Sanger nos genes já descritos como relacionados a fenótipos com DFN: *EFNB1, ALX1, ALX3* e *ALX4*. Os *primers* e as condições de reação (concentrações e temperaturas) utilizados para amplificação da região codificante dos genes foram descritos por Twigg et al. (2004; 2009). Para a análise dos cromatogramas foi utilizado o *software Sequencher 4.9 Demo*, da *Gene Codes Corporation.*

2.2.3 Análise de CNVs

Para a análise de CNVs optamos por realizar a técnica de *SNP-array*, que apresenta alta resolução na detecção de ganhos e perdas de material genético por apresentar sondas em diversos *loci* distribuídos por todo o genoma. Utilizamos para tanto a plataforma *GeneChip® Human Mapping 500K Array Set, Affymetrix®* (Santa Clara, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Esta plataforma compreende dois *arrays*, cada um capaz de genotipar em media 250 mil polimorfismos de base única (SNPs) – aproximadamente 262 mil para a enzima de restrição Nsp e 238 mil para a Sty. A distribuição resultante das sondas considerando os 500 mil SNPs não é uniforme nas lâminas, tendo distância física mediana entre eles de 2,5kb e média de 5,8kb.

Após a hibridação, lavagem e marcação, as lâminas foram escaneadas no *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix® - Santa Clara, CA, EUA). Os dados de intensidade foram gerados pelo programa *GeneChip Command Console Software* (Affymetrix® - Santa Clara, CA, EUA). A qualidade da hibridização das amostras foi avaliada pelo índice de *QC Call Rate*; o limite mínimo escolhido para este índice foi 90,0. Os dados gerados nos arrays foram analisados através dos softwares *Genotyping Console, Affymetrix* (Santa Clara, CA, EUA), *PennCNV* (Wang et al., 2007; Wang e Bucan, 2008), e *dChip* (Li and Wong 2001; Lin et al. 2004). Segundo Kim et al. (2012), ao se combinar múltiplos algoritmos de definição de regiões de CNV a partir de SNP-arrays, aumenta-se a segurança e confiabilidade da análise. Assim, definimos como critério mínimo de confiança para a existência de determinada CNV o fato de ela estar presente nos resultados gerados por pelo menos dois *software* distintos.

As variações encontradas segundo este critério foram comparadas às dos bancos de dados *Database of Genomic Variants* (DGV - http://projects.tcag.ca/variation/), que contém informações sobre CNVs observadas em indivíduos controles, e *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER - http://decipher.sanger.ac.uk/), que compila dados de alterações encontradas em indivíduos com fenótipos alterados. Para investigação

de genes localizados em tais regiões foram realizadas análises *in silico* nos bancos de dados do *UCSC Genome Browser* (UCSC - http://genome.ucsc.edu/), *Ensembl Genome Browser* (Ensembl - http://www.ensembl.org/) e do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

2.2.4 Mapeamento do ponto de quebra

O mapeamento do ponto de quebra foi realizado através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescense In Situ Hybridization* – FISH). Para tanto contamos com infra-estrutura, materiais e protocolos do laboratório da Drª. Angela Maria Vianna Morgante, colaboradora deste projeto, e com o auxílio de sua aluna de doutorado, Ana Carolina Fonseca (Processo FAPESP 2011/14293-4).

Recebemos 5ml de sangue periférico do paciente em tubo com heparina. Estabelecemos cultura temporária de linfócitos adicionando 0,5 mL de plasma sanguíneo em 4,5 mL de meio de cultura TC 199 (Invitrogen, Carlsbad, EUA), complementado com soro fetal bovino 15% (Invitrogen), L-glutamina 1% (Sigma, Saint Louis, EUA) e fitohemaglutinina 1% (Invitrogen), por 72 h, a 37°C. O tratamento com colchicina (Sigma) na concentração final de 0,0016% foi realizado nos 40 min finais do cultivo. Para a hipotonização, utilizamos solução de KCl (0,075 M) por 12 min a 37°C e para a fixação, metanol:ácido acético, 3:1. Parte do material foi conservada a 20°C no fixador e parte foi utilizada na preparação de lâminas, que foram mantidas em estufa a 37°C, por sete a quinze dias e, então, utilizadas para a aplicação da técnica de bandamento cromossômico GTG ou congeladas a –20°C, para utilização posterior em experimentos de FISH.

Para a identificação do rearranjo cromossômico foi utilizada a técnica de bandamento GTG descrita por Seabright (1971), com modificações. As lâminas foram tratadas com 2xSSC (cloreto de sódio 0,03 M e citrato trissódico 0,03 M, pH 7,0) por 15 minutos, a 60°C. Em seguida, foram lavadas

em água destilada e tratadas com solução de tripsina (1:250; Invitrogen) 0,025% em tampão fosfato Sörensen (fosfato dissódico 0,03 M e fosfato monopotássico 0,03 M), pH 6,8, a 37°C por tempo aproximado de 15 s. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas por 3 a 6 min com solução a 2% do corante de Giemsa (Merck), em tampão fosfato, pH 6,8. Após serem coradas, foram mais uma vez lavadas em água destilada; secaram ao ar e posteriormente foram analisadas ao microscópio óptico para realização do cariótipo.

Para a técnica de FISH, utilizamos como sondas os segmentos cromossômicos clonados em cromossomos artificiais de bactérias (BACs) que fazem parte da biblioteca utilizada para a confecção de *1Mb-array* produzido pela Dra. Carla Rosenberg, no Leiden University Medical Centre. Tais clones foram cedidos pelo *Wellcome Trust Sanger Institute*, UK; maiores informações sobre o conjunto estão disponíveis no site do banco de dados do Sanger Institute, Ensembl, sob a denominação *1Mb clone set*.

De acordo com os pontos de quebra mapeados por bandamento G, a seleção de sondas para este experimento foi feita com base nos mapas obtidos no Ensembl. As bactérias com os clones escolhidos foram cultivadas em meio LB (1% bactotriptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; pH 7,5) acrescido do antibiótico para seleção de bactérias resistentes com os segmentos de interesse. Para a extração dos clones, utilizamos o kit Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare, New Jersey, EUA). As sondas foram marcadas por *nick translation* com biotina ou digoxigenina por meio, respectivamente, da incorporação dos nucleotídeos Bio-16-dUTP ou Dig-11-dUTP, utilizando os kits de marcação Biotin-Nick Translation Mix ou Dig-Nick Translation (ambos da Roche Applied Science, Manheim, Alemanha), conforme instruções do fabricante. As sondas foram desnaturadas a 95°C em meio de hibridação (50% formamida, e 10% dextran sulfato, em 2xSSC). A supressão de sequências repetitivas foi feita com DNA humano Cot-1 (Invitrogen).

O DNA dos cromossomos das lâminas foi desnaturado em 70% formamida/2xSSC a 72°C. A hibridação, por sua vez, foi realizada em câmara úmida por 48 a 72 horas a 37°C. Para a detecção das

sondas marcadas com biotina, utilizamos avidina conjugada a FITC e para a detecção de sondas marcadas com digoxigenina, anti-digoxigenina conjugada a rodamina. As lâminas foram montadas em Vectashield Mouting Medium (Vector Laboratories, Califórnia, EUA) contendo o corante DAPI (0,8 µg/mL) (Sigma, Saint Louis, EUA). A análise foi realizada no microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Carl Zeiss, Alemanha). Para a documentação, as imagens foram capturadas por câmara de CCD e processadas utilizando-se o software ISIS (MetaSystem, Alemanha).

A partir do resultado final do FISH, realizamos análises *in silico* nos bancos de dados do UCSC, Ensembl e NCBI, para investigar possíveis genes candidatos.

VII. Discussão Geral e Conclusões

Este trabalho visa à investigação de possíveis causas genéticas relacionadas à DFN. Embora mutações nos genes *EFNB1, ALX1, ALX3* e *ALX4* já tenham sido associadas a quadros com DFN, o fato de a maioria dos casos ser esporádica e não ter etiologia definida dificulta o aconselhamento genético às famílias com indivíduos afetados, assim como inferências sobre o prognóstico desses pacientes. Uma melhor compreensão da etiologia da DFN pode também contribuir para a identificação de vias de sinalização importantes para o desenvolvimento craniofacial humano.

A observação neste estudo de uma mutação em heterozigose no gene *ALX4* co-segregando com um fenótipo em um caso familial de DFN leve representa a primeira descrição de mutação neste gene causando uma forma de DFN com herança dominante. Mutações em homozigose em *ALX4* foram associadas tanto a quadros mais graves como a um caso mais leve de DFN; embora não haja estudos funcionais, essa diferença fenotípica aparentemente depende do tipo de consequência da mutação na atividade da proteína. Por outro lado, mutações em heterozigose no *ALX4* haviam sido relacionadas até então apenas a forame parietal alargado. O fenótipo apresentado pelo paciente e sua mãe é, portanto, intermediário neste espectro de variabilidade clínica relacionada a *ALX4.* Enquanto as mutações de mudança de fase de leitura levando a códon de parada prematuro descritas até o momento nos casos com apenas forame parietal alargado ocorrem antes do último *intron* do gene, a mutação encontrada neste estudo se localiza em seu último *exon*. Este fato faz com que o alelo alterado do paciente e sua mãe escape ao mecanismo de degradação de mRNA com códons de parada prematuro, denominado *non-sense mediated mRNA decay* (NMD), o que a princípio não ocorre nos casos sem DFN. Sendo assim, acreditamos que a maior gravidade do quadro estudado em relação aos demais casos de mutação em heterozigose no *ALX4* possa ser explicada por um mecanismo de dominância negativa, havendo uma provável interação entre os alelos selvagem e alterado, mas com manutenção parcial das funções do gene.

O fato de termos identificado mutação em homozigose no gene *ALX1* num quadro de DFN grave com microftalmia corrobora os achados de Uz et al. (2010). O paciente com mutação em *ALX1* do presente estudo não apresenta, contudo, nenhum tipo de atraso de desenvolvimento e nenhuma outra anomalia associada, o que corrobora ainda a importância e especificidade da função do gene *ALX1* para o correto desenvolvimento craniofacial no início do desenvolvimento embriológico humano. Neste contexto, nosso estudo, que consiste do 3º caso da literatura mundial, contribuiu para uma melhor definição do espectro clinico da DFN relacionada a *ALX1*.

Como é bem estabelecido na literatura, estudos de rearranjos cromossômicos equilibrados e de CNVs podem contribuir para a identificação de genes associados a um determinado fenótipo, uma vez que os pontos de quebra do rearranjo ou que delimitam a região de CNV podem romper um ou mais genes ou regiões regulatórias, além de CNVs poderem englobar genes cujas funções sejam sensíveis à dosagem gênica. Foi identificado um paciente com DFN, atraso de desenvolvimento e outras anomalias que apresenta rearranjo aparentemente balanceado envolvendo os cromossomos 4 e 12. O fato de seu rearranjo cromossômico ser *de novo,* ou seja, não estar presente em seus pais, favorece a hipótese de que possa estar envolvido com a etiologia do fenótipo do indivíduo. Os estudos citogenéticos e moleculares dos pontos de quebra do rearranjo sugeriram os genes *ARAP2* e *CAND1* como possíveis responsáveis pelo quadro clínico do paciente, uma vez que o primeiro parece ter importante papel no desenvolvimento embriológico e o segundo tem função no processo de ubiquitinação, um processo celular que quando comprometido pode levar a alterações fenotípicas, como é o caso das mutações no gene *MID1* associadas à síndrome Optiz GBBB de herança ligada ao X, com a qual o paciente compartilha determinadas características. Por sua vez, o estudo de CNVs em sete indivíduos com DFN associada a atraso de desenvolvimento apontou os genes *DNAJB12* e em especial *ENOX2* como possíveis candidatos para explicar o fenótipo de dois dos pacientes. Enquanto o primeiro está envolvido no processo de degradação de proteínas alteradas, o segundo está relacionado aos processos de crescimento, migração e sobrevivência celulares. No entanto, uma vez que não foi possível mapear precisamente o ponto de quebra do paciente com o rearranjo nem

comparar a expressão dos genes identificados nos indivíduos afetados com controles, é preciso que novos estudos sejam realizados a fim de melhor compreender o significado de tais achados e a real contribuição de cada gene para o desenvolvimento craniofacial humano. Pelo limite de resolução imposto pelas técnicas realizadas, não descartamos a existência de CNVs patogênicas influenciando o fenótipo dos pacientes que não tenham sido detectadas neste estudo. Embora todos os casos deste estudo com DFN e atraso de desenvolvimento sejam do sexo masculino, o baixo tamanho amostral decorrente da raridade do fenótipo e um viés de seleção da amostra, onde inicialmente priorizou-se o grupo de meninos publicados por Guion-Almeida e Richieri-Costa (2009), não permitem inferências quanto à proporção de ocorrência desta condição entre os sexos.

Um recente modelo animal para DFN foi proposto por Brugmann et al. (2010) em virtude do quadro clínico de camundongos com deleção em homozigose do gene *Kif3a* (que codifica uma proteína de transporte intraflagelar) especificamente em células da crista neural. Uma vez que camundongos com deficiência total deste gene em homozigose são inviáveis, e considerando ainda os achados de Twigg et al. (2013) de mosaicismo somático em todos os casos estudados de DCFN grave em meninos, acreditamos que ao menos uma parcela dos pacientes com DFN pode apresentar mutações também somente em determinadas linhagens celulares, ou seja, que representem casos de mosaicismo somático. Sendo assim, consideramos importante que no futuro sejam realizados estudos para investigar também esta hipótese, que explicaria ainda parte dos resultados de discordância entre gêmeos monozigóticos.

Embora causas ambientais possam também estar envolvidas na etiologia da DFN, a existência de mutações de ponto, indels e vários outros fatores genéticos e epigenéticos não detectáveis pelas metodologias utilizadas no presente estudo precisa também ser investigada, uma vez que podem ser responsáveis pelo quadro clínico desses indivíduos.

Com este trabalho podemos concluir que:

- Mutações em heterozigose no gene *ALX4* podem também levar a quadros com DFN.

- O gene *ALX1* parece ter função bastante importante e específica para o correto desenvolvimento craniofacial em humanos, uma vez que o quadro clínico consequente de mutações em homozigose neste gene é bastante grave e restrito à região da face. Mutações neste gene não levam necessariamente a alteração de desenvolvimento congnitivo.

- Alteração na função dos genes *ARAP2*, *CAND1, DNAJB12* e *ENOX2* são possíveis candidatas para quadros com DFN.

Resumo

A displasia frontonasal (DFN) compreende quadros de aparência facial variável, sendo clinicamente caracterizada por dois ou mais dos seguintes sinais: hipertelorismo ocular com consequente alargamento da base nasal; fissura facial mediana afetando o nariz ou o nariz e lábio superior e, por vezes, o palato; fissura alar (uni ou bilateral); ponta nasal ausente; crânio anterior bífido oculto, e implantação em "V" dos cabelos na fronte. A DFN pode ser vista como um defeito de desenvolvimento que pode ocorrer por si só ou como parte do quadro clínico de várias síndromes. A maioria dos casos de DFN é esporádica, e em raras circunstâncias foram observadas alterações cromossômicas em alguns indivíduos. Até o momento, quatro genes foram relacionados à patogênese molecular de algumas das síndromes com DFN, *EFNB1*, associado a uma forma de DFN ligada ao X e os genes *ALX1*, *ALX3* e *ALX4*, todos associados a formas de DFN com herança autossômica recessiva. Embora esteja claro haver heterogeneidade etiológica, na maioria dos casos de DFN a causa não é conhecida, dificultando o adequado aconselhamento genético aos pacientes e seus familiares. Sendo assim, realizamos estudos com diferentes estratégias metodológicas buscando melhor compreender as possíveis causas genéticas da DFN. Ao todo foram analisados 10 pacientes: um caso familial de DFN leve com herança aparentemente autossômica dominante, um caso clinicamente sugestivo de mutação em *ALX1*, e oito casos de DFN associada a atraso de desenvolvimento com ou sem outras anomalias, dos quais um apresentava um rearranjo *de novo* aparentemente balanceado entre os cromossomos 4 e 12. Optamos por realizar sequenciamento dos genes previamente relacionados a fenótipos com DFN em todos os casos; para aqueles em que não foram detectadas mutações patogênicas, realizamos análise de variações de número de cópias (CNV) por *microarray* de polimorfismos de base única e, para o paciente com rearranjo cromossômico, realizamos o mapeamento do ponto de quebra por hibridação *in situ* fluorescente. Constatamos uma mutação em heterozigose no gene *ALX4* co-segregando com o fenótipo do caso familial, sendo esta a primeira descrição de alteração em tal gene causando uma forma de DFN com herança dominante, e sugerimos pela primeira vez um mecanismo de dominância negativa. No caso sugestivo de mutação em *ALX1*, o diagnóstico foi confirmado através da identificação de uma mutação em homozigose neste gene do paciente; este caso consiste no 3º da literatura mundial e evidencia pela primeira vez que mutações em *ALX1* não necessariamente levam a atraso de desenvolvimento ou deficiência intelectual. Os estudos citogenéticos e moleculares dos pontos de quebra do paciente com rearranjo cromossômico sugeriram os genes *ARAP2* e *CAND1* como possíveis responsáveis por seu quadro clínico, enquanto o estudo de CNVs nos indivíduos com DFN associada a atraso de

desenvolvimento apontou os genes *DNAJB12* e *ENOX2* como possíveis candidatos para explicar o fenótipo de dois dos pacientes. É preciso que novos estudos sejam realizados a fim de melhor compreender o significado de tais achados e a real contribuição de cada gene para o desenvolvimento craniofacial humano e para a etiologia da DFN. Para os casos em que não foram identificadas alterações conclusivas no presente estudo, embora causas ambientais não possam ser descartadas, é preciso que seja investigada também a existência de fatores genéticos e epigenéticos não detectáveis pelas metodologias utilizadas, bem como a hipótese de mosaicismo somático. Nossos resultados, além de corroborarem o envolvimento dos genes *ALX1* e *ALX4* em fenótipos com DFN, sugerem também novos genes candidatos: *ARAP2*, *CAND1, DNAJB12* e *ENOX2.*

Palavras-chave: displasia frontonasal; CNV; genes candidatos; rearranjos cromossômicos estruturais; *ALX1; ALX4*.

Abstract

Frontonasal dysplasia (FND) is a rare group of disorders that comprises cases with a variety of facial appearances, and is clinically characterized by two or more of the following signs: ocular hypertelorism with consequent broadening of the nasal root; median facial cleft affecting the nose and/or upper lip and palate; clefting of the alae nasi (uni or bilateral); lack of formation of the nasal tip; anterior cranium bifidum occultum; and a V-shaped frontal hairline. FND is a developmental defect that can occur alone or as part of several syndromes. Most cases of FND are sporadic, and in rare circumstances chromosomal alterations were observed in affected individuals. To date, four genes have been related to the molecular pathogenesis of some syndromes with DFN, one (*EFNB1*) is associated with an X-linked form while the 3 others (*ALX1, ALX3 and ALX4*) are associated with autosomal recessive forms. Although it is clear that FND is etiologic heterogeneous, the causative mechanism is unknown in most cases which makes it hard to give proper genetic counseling to patients and their families. In order to get new insights into the genetic mechanisms leading to FND, we performed studies with different methodologies. Altogether, 10 patients were analyzed: a familial case of a mild form of FND with an apparently autosomal dominant inheritance pattern, a case clinically suggestive of mutation in *ALX1*, and eight cases of FND associated with developmental delay with or without other anomalies, one of which with an apparently balanced *de novo* rearrangement between chromosomes 4 and 12. We chose to sequence the genes previously associated with FND phenotypes in all cases; for those in which pathogenic mutations were not detected, we conducted an analysis of copy number variations (CNV) by single nucleotide polymorphisms microarrays; for the patient with chromosomal rearrangement, we also mapped the breakpoints by using fluorescence in situ hybridization. We found a heterozygous mutation in *ALX4* co-segregating with the phenotype of the familial case; this is the first description of mutation in this gene causing a form of FND with dominant inheritance pattern, and we suggested for the first time a dominant negative mechanism. In the case suggestive of mutation in *ALX1*, the diagnosis was confirmed by the identification of a homozygous mutation in this gene; this is the third case of the literature and shows for the first time that mutations in *ALX1* are not necessarily related to developmental delay or intellectual disability. Breakpoints cytogenetic and molecular studies done with the patient with chromosomal rearrangement suggested *ARAP2* and *CAND1* genes as causative candidates for his condition, while the study of CNVs in individuals with FND associated with developmental delay pointed *DNAJB12* and *ENOX2* genes as possible candidates to explain the phenotypes of two of the patients. Further studies are necessary to better understand the significance of such findings and the actual

contribution of each of these genes to human craniofacial development and the etiology of FND. Although environmental causes cannot be ruled out, it should also be investigated the existence of genetic and epigenetic factors as well as the possibility of somatic mosaicism, among the cases negative for the molecular approaches used in our study. Our results corroborate the involvement of *ALX1* and *ALX4* in FND phenotypes, and suggest new candidate genes: *ARAP2*, *CAND1*, *DNAJB12* and *ENOX2*.

Keywords: frontonasal dysplasia; CNV; candidate genes; structural chromosomal rearrangements; *ALX1; ALX4*.

Referências Bibliográficas

Antoneli MZ, Giacheti CM, Genaro KF, Zorzetto NL, Richieri-Costa A. Frontonasal dysplasia: clinical evaluation on audiological and brainstem electrophysiological profiles. Braz J Otorhinolaryngol. 2011 Sep-Oct;77(5):611-5.

Brugmann SA, Allen NC, James AW, Mekonnen Z, Madan E, Helms JA. A primary cilia-dependent etiology for midline facial disorders. Hum Mol Genet. 2010 Apr; 19(8):1577-92.

Compagni A, Logan M, Klein R, Adams RH. Control of skeletal patterning by ephrinB1-EphB interactions. Dev Cell. 2003 Aug;5(2):217-30.

Evers C, Jungwirth M, Morgenthaler J, Hinderhofer K, Maas B, Janssen J, Jauch A, Hehr U, Steinbeisser H, Moog U. Craniofrontonasal syndrome in a male due to chromosomal mosaicism involving EFNB1: further insights into a genetic paradox. Clin Genet. 2013 Apr 24. doi: 10.1111/cge.12171. [Epub ahead of print]

Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A. Signalling interactions during facial development. Mech Dev. 1998 Jul;75(1-2):3-28.

Freitas ÉL, Gribble SM, Simioni M, Vieira TP, Prigmore E, Krepischi AC, Rosenberg C, Pearson PL, Melo DG, Gil-da-Silva-Lopes VL. A familial case with interstitial 2q36 deletion: variable phenotypic expression in full and mosaic state. Eur J Med Genet. 2012 Nov;55(11):660-5.

Guion-Almeida ML. Hipertelorismo e defeitos de linha média facial. Estudo genético clínico de uma amostra de pacientes. [tese] Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. 2000.

Guion-Almeida ML, Mellado C, Beltrán C, Richieri-Costa A. Pai Syndrome: Report of Seven South American Patients. Am J Med Genet. 2007 Dec; 143A: 3273–9.

Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A. Acrofrontofacionasal dysostosis: report of the third Brazilian family. Am J Med Genet. 2003 Jun; 119A: 238-41.

Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A. Frontonasal dysplasia, macroblepharon, eyelid colobomas, ear anomalies, macrostomia, mental retardation and CNS structural anomalies: defining the phenotype. Clin. Dysmorphol. 2001 Apr; 10(2): 79-80.

Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A. Frontonasal dysplasia, severe neuropsychological delay, and midline central nervous system anomalies: Report of 10 Brazilian male patients. Am J Med Genet. 2009 May; 149A(5): 1006-11.

Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Zechi-Ceide RM. Frontonasal dysplasia, callosal agenesis, basal encephalocele, and eye anomalies syndrome with a partial 21q22.3 deletion. Am J Med Genet A. 2012 Jul;158A(7):1676-9.

Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A, Saavedra D, Cohen MM Jr. Frontonasal dysplasia: analysis of 21 cases and literature review. Int. J. Oral. Maxillofac. Surg. 1996 Apr; 25(2): 91-7.

Handrigan GR, Buchtová M, Richman JM. Gene discovery in craniofacial development and disease - cashing in your chips. Clin Genet. 2007 Feb;71(2):109-19.

Hester SD, Reid L, Nowak N, Jones WD, Parker JS, Knudtson K, Ward W, Tiesman J, Denslow ND. Comparison of comparative genomic hybridization technologies across microarray platforms. J Biomol Tech. 2009 Apr;20(2):135-51.

Jehee FS, Burin BA, Rocha KM, Zechi-Ceide R, Bueno DF, Brito L, Souza J, Leal GF, Richieri-Costa A, Alonso N, Otto PA, Passos-Bueno MR. Novel mutations in IRF6 in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should IRF6 mutational screening be done? Am J Med Genet. 2009 Jun; 149A(6):1319-22.

Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. Dev Dyn. 2006 May;235(5):1152-66.

Kayserili H, Altunoglu U, Ozgur H, Basaran S, Uyguner ZO. Mild nasal malformations and parietal foramina caused by homozygous ALX4 mutations. Am J Med Genet A. 2012 Jan;158A(1):236-44.

Kayserili H, Uz E, Niessen C, Vargel I, Alanay Y, Tuncbilek G, Yigit G, Uyguner O, Candan S, Okur H, Kaygin S, Balci S, Mavili E, Alikasifoglu M, Haase I, Wollnik B, Akarsu NA. ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development. Hum Mol Genet. 2009 Nov; 18(22):4357–66.

Krepischi-Santos ACV, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, Szuhai K, Sloos W, Mazzeu JF, Kok F, Cheroki C, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Varela M, Koiffmann C, Kim CA, Bertola DR, Pearson PL, Rosenberg C. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. Cytogenet Genome Res. 2006; 115:254–61.

Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, Weiss LA, Najm J, Kutsche K, Descartes M, Holt L, Braddock S, Troxell R, Kaplan L, Volkmar F, Klin A, Tsatsanis K, Harris DJ, Noens I, Pauls DL, Daly MJ, MacDonald ME, Morton CC, Quade BJ, Gusella JF. Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. Am J Hum Genet. 2008 Jan;82(1):199-207.

Kim SY, Kim JH, Chung YJ. Effect of Combining Multiple CNV Defining Algorithms on the Reliability of CNV Calls from SNP Genotyping Data. Genomics Inform. 2012 Sep;10(3):194-9.

Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection, Proc. Natl. Acad. Sci. 2001.98:a31-36.

Lin M, Wei LJ, Sellers WR, Lieberfarb M, Wong WH, Li C. dChipSNP: Significance Curve and Clustering of SNP-Array-Based Loss-of-Heterozygosity Data. Bioinformatics. 2004. 20: 1233-1240.

Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars, CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. Am. J. Hum. Genet. 2008 Feb; 82:477– 88.

Mavrogiannis LA, Taylor IB, Davies SJ, Ramos FJ, Olivares JL,Wilkie AO. Enlarged parietal foramina caused by mutations in the homeobox genes ALX4 andMS X2: from genotype to phenotype. Eur J Hum Genet. 2006 14:151–158.

Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. Int J Dev Biol. 2006; 50(6):511-21.

Petek E, Windpassinger C, Vincent JB, Cheung J, Boright AP, Scherer SW, Kroisel PM, Wagner K. Disruption of a novel gene (IMMP2L) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome. Am J Hum Genet. 2001 Apr;68(4):848-58.

Pham NS, Rafii A, Liu J, Boyadjiev SA, Tollefson TT. Clinical and genetic characterization of frontorhiny: report of 3 novel cases and discussion of the surgical management. Arch Facial Plast Surg. 2011 Nov-Dec;13(6):415-20.

Poot M, Beyer V, Schwaab I, Damatova N, Van't Slot R, Prothero J, Holder SE, Haaf T. Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder. Neurogenetics. 2010 Feb;11(1):81-9.

Rizvi M, Lypka MA, Kovacev T, Agris J. Median facial cleft dysmorphism in three siblings: case report and review of the literature. Cleft Palate Craniof J. 2010;47(1):104-6.

Rossi MR, DiMaio MS, Xiang B, Lu K, Kaymakcalan H, Seashore M, Mahoney MJ, Li P. Clinical and Genomic Characterization of Distal Duplications and Deletions of Chromosome 4q: Study of Two Cases and Review of the Literature. Am J Med Genet. 2009 Dec; 149(A):2788–94.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet. 1971 Oct 30;2(7731):971-2.

Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Wigler M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. Science. 2007 Apr; 316:445–9.

Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. Drug Discovery Today. 2008 Sep; 13(17-18):760-70.

Silva S, Martins Y, Matias A, Blickstein I. Why are monozygotic twins different? J Perinat Med. 2011 Mar;39(2):195-202.

Sun M, Li N, Dong W, Chen Z, Liu Q, Xu Y, He G, Shi Y, Li X, Hao J, Luo Y, Shang D, Lv D, Ma F, Zhang D, Hua R, Lu C, Wen Y, Cao L, Irvine AD, McLean WHI, Dong Q, Wang MR, Yu J, He L, Lo WHY, Zhang X. Copy-Number Mutations on Chromosome 17q24.2-q24.3 in Congenital Generalized Hypertrichosis Terminalis with or without Gingival Hyperplasia. Am J Hum Genet. 2009 Jun; 84(6):807–13.

Sutrala SR, Norton N, Williams NM, Buckland PR. Gene Copy Number Variation in Schizophrenia. Am J Med Genet. 2008 Jul; 147B(5):606–11.

Trainor PA, Krumlauf R. Patterning the cranial neural crest: Hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. Nat Rev Neurosci. 2000; 1:116-24.

Twigg SR, Babbs C, van den Elzen ME, Goriely A, Taylor S, McGowan SJ, Giannoulatou E, Lonie L, Ragoussis J, Sadighi Akha E, Knight SJ, Zechi-Ceide RM, Hoogeboom JA, Pober BR, Toriello HV, Wall SA, Rita Passos-Bueno M, Brunner HG, Mathijssen IM, Wilkie AO. Cellular interference in craniofrontonasal syndrome: males mosaic for mutations in the X-linked EFNB1 gene are more severely affected than true hemizygotes. Hum Mol Genet. 2013 Apr 15;22(8):1654-62.

Twigg SR, Kan R, Babbs C, Bochukova EG, Robertson SP, Wall SA, Morriss-Kay GM, Wilkie AO. Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 8;101(23):8652-7.

Twigg SR, Matsumoto K, Kidd AM, Goriely A, Taylor IB, Fisher RB, Hoogeboom AJ, Mathijssen IM, Lourenco MT, Morton JE, Sweeney E, Wilson LC, Brunner HG, Mulliken JB, Wall SA, Wilkie AO. The origin of EFNB1 mutations in craniofrontonasal syndrome: frequent somatic mosaicism and explanation of the paucity of carrier males. Am J Hum Genet. 2006 Jun; 78(6):999-1010.

Twigg SRF, Versnel SL, Nürnberg G, Lees MM, Bhat M, Hammond P, Hennekam RCM, Hoogeboom AJM, Hurst JA, Johnson D, Robinson AA, Scambler PJ, Gerrelli D, Nürnberg P, Mathijssen IMJ, Wilkie AOM. Frontorhiny, a Distinctive Presentation of Frontonasal Dysplasia Caused by Recessive Mutations in the ALX3 Homeobox Gene. The American Journal of Human Genetics. 2009 May; 84:698–705.

Uz E, Alanay Y, Aktas D, Vargel I, Gucer S, Tuncbilek G, Eggeling FV, Yilmaz E, Deren O, Posorski N, Ozdag H, Liehr T, Balci S, Alikasifoglu M, Wollnik B, Akarsu NA. Disruption of ALX1 Causes Extreme Microphthalmia and Severe Facial Clefting: Expanding the Spectrum of Autosomal-Recessive ALX-Related Frontonasal Dysplasia. AmJ Hum Genet. 2010 May; 86:789–96.

Wallis D, Lacbawan F, Jain M, Der Kaloustian VM, Steiner CE, Moeschler JB, Losken HW, Kaitila II, Cantrell S, Proud VK, Carey JC, Day DW, Lev D, Teebi AS, Robinson LK, Hoyme HE, Al-Torki N, Siegel-Bartelt J, Mulliken JB, Robin NH, Saavedra D, Zackai EH, Muenke M. Additional EFNB1 mutations in craniofrontonasal syndrome. Am J Med Genet. 2008 Aug; 146A(15):2008-12.

Wang K, Bucan M. Copy Number Variation Detection via High-Density SNP Genotyping. Cold Spring Harb. Protoc. 2008; doi: 10.1101/pdb.top46.

Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SFA, Hakonarson H, Bucan M. PennCNV: An integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. Genome Res. 2007 Nov; 17(11):1665-74.

Wieacker P, Wieland I. Clinical and genetic aspects of craniofrontonasal syndrome: towards resolving a genetic paradox. Mol Genet Metab. 2005 Sep-Oct;86(1-2):110-6.

Wieland I, Jakubiczka S, Muschke P, Cohen M, Thiele H, Gerlach KL, Adams RH, Wieacker P. Mutations of the ephrin-B1 gene cause craniofrontonasal syndrome. Am J Hum Genet. 2004 Jun; 74(6):1209-15.

Wieland I, Makarov R, Reardon W, Tinschert S, Goldenberg A, Thierry P, Wieacker P. Dissecting the molecular mechanisms in craniofrontonasal syndrome: differential mRNA expression of mutant EFNB1 and the cellular mosaic. Eur J Hum Genet. 2008 Feb;16(2):184-91.

Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. Nat Rev Genet. 2001 Jun;2(6):458-68.

Wu E, Vargevik K, Slavotinek AM. Subtypes of frontonasal dysplasia are useful in determining clinical prognosis. Am J Med Genet Part A. 2007. 143A:3069–3078.

Xu B, Woodroffec A, Rodriguez-Murilloa L, Roosd JL, Rensburge EJV, Abecasisf GR, Gogosb JA, Karayiorgoua M. Elucidating the genetic architecture of familial schizophrenia using rare copy number variant and linkage scans. Proc Natl Acad Sci USA. 2009 Sep; 106(39):16746–51.

Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2009; 10:451–81.