**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

MARIA CRISTINA CRÊS

**Fenótipo de Holoprosencefalia *minor*:
investigação por imagem do Sistema Nervoso Central**

**BAURU
2018**

MARIA CRISTINA CRÊS

**Fenótipo de Holoprosencefalia *minor*:
investigação por imagem do Sistema Nervoso Central**

Tese apresentado ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Richieri da Costa
Coorientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

**BAURU
2018**

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

Rua Sílvio Marchione, 3-20

Caixa Postal: 1501

17012-900 - Bauru - SP, Brasil

Telefone: (14) 3235-8000

Prof. Dr. Vahan Agopyan – Reitor da USP

Prof. Dr. José Sebastião dos Santos – Superintendente do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - Universidade de São Paulo

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Tese.

Maria Cristina Crês

Bauru, ____ de _____ de 2018

Crês, Maria Cristina
C863F Fenótipo de Holoprosencefalia *minor*: investigação por imagem do Sistema Nervoso Central / Maria Cristina Crês. Bauru, 2018.
126 p.; il.; 30 cm.

Tese (Doutorado – Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas) – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Richieri da Costa
Coorientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

1. Holoprosencefalia. 2. Prosencéfalo. 3. Encéfalo.
4. Hipófise. 5. Neuroimagem.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Cristina Crês

Tese apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Profa. Dra. Ana Paula Fukushiro

Presidente da Comissão de Pós-Graduação HRAC-USP

Data de depósito da tese junto à SPG: ____/____/____

DEDICATÓRIA

À **Consciência Cósmica**,
que tudo permeia.
A todos os meus **mestres** de vida.
Aos meus **pacientes**.
A **Olympio Pinheiro**,
meu marido, companheiro de todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Antônio Richieri-Costa**, que não só me concedeu a oportunidade como também a confiança, mas, sobretudo, o seguro apoio científico para a realização deste estudo.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Célia Regina Nogueira** que, além do apoio no Laboratório de Genética (UNIPEX) da Faculdade de Medicina da UNESP (Campus de Botucatu), e da bolsa para pesquisa na Universidade de Lisboa (IMM-UL), sempre se manifestou solidária em todos os momentos de dificuldades, incentivando-me ao longo de toda esta difícil jornada.

À **Profa. Dra. Maria Carmo-Fonseca**, Presidente do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Universidade de Lisboa (UL), instituição que me concedeu um estágio de complementação na pesquisa inicial.

Aos médicos **Dr. Marcelo Guedes Jannini** e **Dr. Sílvio Garcia Meira Junior** pela avaliação das neuroimagens, permitindo a confiabilidade da análise para a realização deste estudo, e sempre solícitos no esclarecimento das minhas dúvidas.

À **Dra. Roseli M. Zechi-Ceide** pelo acompanhamento, esclarecimentos em genética e estímulo à minha pesquisa inicial.

À direção do Hospital Estadual Bauru (HEB), nomeadamente à Diretora Executiva, **Dra. Deborah Maciel Cavalcanti Rosa**, por ter permitido a flexibilização do horário de atendimento no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica, imprescindível para o acompanhamento das atividades didáticas do Programa de Pós-Graduação.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação do HRAC-USP, na pessoa da **Profa. Dra. Ana Paula Fukushiro**, pelo empenho em oferecer um programa de qualidade.

Aos **funcionários da Pós-Graduação do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP)**, pelo atendimento sempre atencioso na indicação das trilhas acadêmicas do Programa de Pós-Graduação.

À funcionária **Maria Aparecida Arazaboni**, da Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular (SGCBM) do HRAC-USP, que, com muita paciência e carinho, me auxiliou na agilização da coleta de dados.

Aos 203, particularmente ao pesquisador **Igor C. Deprá**, que auxiliou nas análises genéticas na pesquisa inicial.

A **todos os indivíduos** que aceitaram participar desta pesquisa, permitindo a exposição de suas imagens.

À minha **avó Maria** (*in memoriam*), à minha **mãe Inês** (*in memoriam*) e ao meu **pai Guido** (*in memoriam*), que muito se empenharam para me dar a oportunidade de estudar.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao meu marido, **Olympio Pinheiro**, que esteve presente ao meu lado, me apoiando, em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, priorizando as minhas demandas e não medindo esforços para que eu pudesse realizar a minha pesquisa.

*“Ela canta, pobre ceifeira,
Julgando-se feliz talvez;
Canta, e ceifa, e a sua voz, cheia
De alegre e anónima viuvez,*

*Ondula como um canto de ave
No ar limpo como um limiar,
E há curvas no enredo suave
Do som que ela tem a cantar.*

*Ouvi-la alegre e entristece,
Na sua voz há o campo e a lida,
E canta como se tivesse
Mais razões para cantar que a vida.*

*Ah, canta, canta sem razão!
O que em mim sente está
pensando.
Derrama no meu coração
A tua incerta voz ondeando!*

*Ah, poder ser tu, sendo eu!
Ter a tua alegre inconsciência,
E a consciência disso! Ó céu!
Ó campo! Ó canção! A ciência*

*Pesa tanto e a vida é tão breve!
Entra por mim dentro! Tornai
Minha alma a vossa sombra leve!
Depois, levando-me, passai!”*

Fernando Pessoa*

* Fernando Pessoa. Poesias. Lisboa: Ática, 1942 (15ª ed. 1995), p. 108.
1ª publ. in Athena, nº 3. Lisboa: Dez. 1924.
(Nota explicativa de João Gaspar Simões e Luiz de Montalvor)

RESUMO

Crês MC. Fenótipo de Holoprosencefalia *minor*: investigação por imagem do Sistema Nervoso Central (tese). Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2018.

Neste estudo, foram reavaliados exames de neuroimagens de indivíduos com fenótipo de Holoprosencefalia (HPE) *minor*, buscando identificar alterações no desenvolvimento embriológico do prosencéfalo. Os achados fenotípicos e as análises genéticas previamente realizadas foram obtidas das anotações em prontuários. Foram selecionados 31 indivíduos, atendidos no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), Bauru / SP, Brasil, com fenótipo de HPE *minor*, diagnosticados por geneticistas clínicos, e sem as alterações clássicas da HPE em exames de ressonância magnética do encéfalo. As neuroimagens foram avaliadas por dois experientes radiologistas, seguindo um protocolo previamente estabelecido. A concordância entre os avaliadores foi verificada pelo Coeficiente Kappa (significância $p < 0,05$). As alterações nos exames de neuroimagens, os achados clínicos e as alterações genéticas foram correlacionados e representados por meio de seus percentuais. Este estudo sugere que indivíduos com características faciais de HPE *minor* podem apresentar pequenas alterações encefálicas, com maior comprometimento nas estruturas originárias do telencéfalo e do diencéfalo. As alterações hipofisárias foram as mais frequentes e, em alguns casos, foram as únicas malformações presentes. O Corpo Caloso, o Septo Pelúcido, os Núcleos da Base e os Ventrículos Laterais, também podem estar acometidos. A hipoplasia da face média, a fissura labiopalatina, a microcefalia e as alterações da Hipófise podem ser resultantes de defeitos na migração e/ou diferenciação de células oriundas da crista neural, que dão origem ao Processo Frontonasal e/ou aos Processos Maxilares, sem alterarem a padronização do prosencéfalo. A variedade na expressão clínica sugere que a interação de fatores, ainda não identificados, contribua para o fenótipo final.

Palavras-chave: Holoprosencefalia. Prosencéfalo. Encéfalo. Hipófise. Neuroimagem.

ABSTRACT

Crês MC. Holoprosencephaly-minor phenotype: investigation by Central Nervous System (thesis). Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2018.

In this study, a retrospective review of the neuroimaging records of individuals with Holoprosencephaly (HPE) minor phenotype was performed, looking for changes in the embryological development of the forebrain. The phenotypic findings and genetic analyzes, previously performed, were obtained from the annotations in medical records. Thirty-one individuals were selected from Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRAC-USP), Bauru, São Paulo, Brazil, with HPE minor phenotype, diagnosed by clinical geneticists, without typical characteristic malformations of HPE in magnetic resonance imaging of the brain. The neuroimaging was analyzed by two experienced radiologists, following a previously established protocol. The agreement between the two analyses was determined by Kappa coefficient (significance $p < 0.05$). The abnormalities in the neuroimaging, the clinical findings and the genetic alterations were correlated with abnormalities found in the neuroimaging, and they were represented by their percentages. This study suggests that individuals with facial features of HPE minor may present small encephalic abnormalities, with a greater compromise in the structures originating from the telencephalon and diencephalon. Pituitary abnormalities were the most frequent and, in some cases, they were the only malformations present. The Corpus Callosum, the Septum Pellucidum, the Basal Ganglia and the Lateral Ventricles may also be affected. Midfacial Hypoplasia, cleft lip end/or palate, microcephaly and abnormalities of the pituitary may result from defects in the migration and/or differentiation of neural crest cells, which they give rise to the Frontonasal and/or Maxillary Prominence, without alteration in the patterning of the forebrain. The variety in clinical expression suggests that the interaction of factors, still not identified, contribute to the final phenotype.

Keywords: Holoprosencephaly. Prosencephalon. Brain. Pituitary. Neuroimaging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 -	Achados faciais em HPE	26
Figura 2 -	Formação do tubo neural e crista neural	36
Figura 3 -	Representação esquemática da divisão das vesículas encefálicas e as estruturas resultantes	37
Figura 4 -	Estágios sucessivos de desenvolvimento da Hipófise	39
Figura 5 -	Ilustrações das fases progressivas do desenvolvimento da face humana	40
Figura 6 -	Genes envolvidos no desenvolvimento de telencéfalo em condições normais e HPE	44
Figura 7 -	Imagem de RM em corte axial mostrando as Linhas Silvianas tangenciando as FS ao nível do gânglio basal	48
Figura 8 -	HPE Alobar. RM de recém-nascido com 5 dias	51
Figura 9 -	HPE Semilobar. RM de criança com 7 meses	51
Figura 10 -	HPE Lobar. RM de criança com 19 meses	52
Figura 11 -	HPE IHM. RM de menina com 2 anos	53
Figura 12 -	Diagrama da vista sagital mediana do encéfalo mostra a localização das regiões septal e pré-óptica	54

- QUADROS

Quadro 1 -	Classificação anatômica das formas clássicas de HPE	24
Quadro 2 -	Correlações entre alterações faciais e severidade da HPE	26
Quadro 3 -	Genes associados à HPE, sua localização cromossômica e sua função relacionada ao desenvolvimento do encéfalo	32
Quadro 4 -	Alterações de neuroimagens dos diferentes tipos de HPE	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> , segundo as incidências (sagital, axial ou coronal) dos exames de RM do encéfalo.....	71
Tabela 2 -	Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> , segundo a idade em que foi realizado o exame de RM do encéfalo.....	71
Tabela 3 -	Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> , segundo o resultado dos exames de cariótipo.....	72
Tabela 4 -	Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> , segundo a análise molecular por sequenciamento direto	72
Tabela 5 -	Achados clínicos dos indivíduos 1 a 11, com fenótipo de HPE <i>minor</i>	75
Tabela 6 -	Achados clínicos dos indivíduos 12 a 21, com fenótipo de HPE <i>minor</i>	76
Tabela 7 -	Achados clínicos dos indivíduos 22 a 31, com fenótipo de HPE <i>minor</i>	77
Tabela 8 -	Concordância entre os avaliadores 1 e 2, com relação às alterações encontradas nas diferentes estruturas encefálicas, em indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> , segundo o percentual de concordância e o coeficiente Kappa	78
Tabela 9 -	Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> , segundo o valor do Ângulo Silviano.....	78
Tabela 10 -	Valor do Ângulo Silviano dos indivíduos 1 a 16, com fenótipo de HPE <i>minor</i>	79
Tabela 11 -	Valor do Ângulo Silviano dos indivíduos 17 a 31, com fenótipo de HPE <i>minor</i>	79
Tabela 12 -	Indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> com alterações nas diferentes estruturas encefálicas, segundo a análise de cada avaliador.....	80

Tabela 13 - Indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> e presença de malformações nas estruturas encefálicas de acordo com o Ângulo Silviano apresentado, segundo o avaliador 1.....	81
--	-----------

Tabela 14 - Indivíduos com fenótipo de HPE <i>minor</i> e presença de malformações nas estruturas encefálicas, de acordo com o Ângulo Silviano apresentado, segundo o avaliador 2.....	81
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DI	Diabetes Insípidos
DICI	distância interocular interna
DM	Diabetes Mellitus
DNPM	desenvolvimento neuropsicomotor
DP	desvio padrão
FL	fissura labial
FL/P M	fissura de lábio com ou sem fissura palatina mediana
FL/P	fissura de lábio com ou sem fissura palatina
FLP	fissura labiopalatina
FP	fissura palatina
FS	fissura Silviana
HPE	Holoprosencefalia
HRAC-USP	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo
ICSU	incisivo central superior único
IHM	Interhemisférica Média
P	percentil
PC	perímetro cefálico
RM	ressonância magnética
SGCBM	Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular
SNC	Sistema Nervoso Central
SNG	Sequenciamento de Nova Geração
SPO	Septopreóptica
TC	tomografia computadorizada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CLASSIFICAÇÃO E QUADRO CLÍNICO	23
2.2	ETIOLOGIA.....	29
2.3	EMBRIOLOGIA DO ENCÉFALO.....	35
2.4	EMBRIOLOGIA DA FACE.....	39
2.5	ALTERAÇÕES EMBRIOLÓGICAS NA HOLOPROSENCEFALIA	41
2.6	NEUROIMAGENS EM HOLOPROSENCEFALIA	45
3	OBJETIVOS.....	57
3.1	OBJETIVO GERAL	59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	61
5	RESULTADOS	69
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICES	109
	ANEXO	121

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Holoprosencefalia (HPE) constitui uma malformação congênita complexa, decorrente da falha na clivagem do primórdio embrionário do cérebro anterior. É o defeito mais comum de desenvolvimento do prosencéfalo e da porção média da face em seres humanos, com etiologia marcadamente heterogênea (MATSUNAGA; SHIOTA, 1977; ORIOLI; CASTILLA, 2010; DUBOURG et al., 2011). A incidência é estimada em 1 para cada 250 gravidezes, mas resulta numa prevalência que varia entre 1:10000 a 1:16000 nascidos vivos (MATSUNAGA; SHIOTA, 1977; CROEN; SHAW; LAMMER, 1996).

Além do comprometimento variável do prosencéfalo, envolve também defeitos referentes ao desenvolvimento da face, principalmente na linha média. As alterações faciais podem variar desde quadros leves, com hipotelorismo, incisivo central superior único (ICSU) e/ou fissura labiopalatina (FLP), até quadros muito graves, com ciclopia e probócide (COHEN, 2006; HAHN; BARNES, 2010).

A etiologia da HPE é heterogênea e complexa, uma vez que inclui desde agentes ambientais (álcool, diabetes materno, ação da vitamina A e seus análogos, alterações do metabolismo do colesterol), até causas genéticas variáveis (mutações gênicas e alterações cromossômicas) (COHEN; SHIOTA, 2002; MING; MUENKE, 2002; COHEN, 2006; JOHNSON; RASMUSSEN, 2010; MILLER et al., 2010; ORIOLI; CASTILLA, 2010; BILLINGTON et al., 2015; DUBOURG et al., 2016; MOUDEN et al., 2016).

De acordo com a gravidade das alterações anatômicas presente, as Holoprosencefalias se classificam em: Alobar, Semilobar, Lobar (DEMYER; ZEMAN, 1963; GOLDEN, 1999), Interhemisférica Média (IHM) ou Sintelencefalia (BARKOVICH; QUINT, 1993; SIMON et al., 2002) e a Septopreóptica (SPO) (HAHN et al., 2010). Além destes subtipos de HPE, devemos ainda considerar como quadro clínico, pertencente ao espectro holoprosencefálico, uma forma mais leve, denominada de HPE *minor* ou Microforma, a princípio descrita com a denominação de Holoprosencefalia-Like (ROESSLER et al., 2003; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006, 2010).

A descrição deste último fenótipo tornou-se mais consistente com o auxílio dos exames por imagem. No entanto, ainda existem controvérsias e variações significantes, quando comparamos as manifestações fenotípicas entre pares. Tal fato se deve a variabilidade etiológica e, principalmente, por tratar-se da análise de um espectro fenotípico e não de um fenótipo definitivo, como no caso das Holoprosencefalias clássicas (COHEN, 2006; DELLA GIUSTINA et al., 2017).

Esse espectro define um conjunto de anomalias da linha média da face, que compreendem pequenos achados, como hipotelorismo isolado, dente ICSU, FLP unilaterais, bilaterais ou medianas, e anomalias do Septo Nasal (aplasia ou hipoplasia do Septo Nasal, narina única, perfil facial plano). O perímetro cefálico (PC) pode apresentar-se no limite inferior de normalidade ou microcefalia. Estes achados clínicos conferem à face um aspecto típico, no entanto, sem as malformações cerebrais clássicas da HPE (ROESSLER et al., 2003; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006, ROESSLER et al., 2009; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2010).

Não obstante, os subtipos clássicos da HPE serem bem definidos, muitos pacientes apresentam exames de neuroimagens com alterações que os situam em zonas limítrofes, sugerindo um contínuo de não separação na linha média neocortical. No extremo do espectro holoprosencefálico estão as Microformas, as formas mais leves dessas alterações, cuja definição nem sempre é consenso entre os pesquisadores, porém cada vez mais tem demandado atenção, tanto nos achados clínicos, quanto na etiologia envolvida (DELLA GIUSTINA et al., 2017).

Discutindo as dificuldades na definição das Microformas de HPE, Cohen (2001) sugere que esse conceito depende mais do contexto em que se apresentam os indivíduos investigados, do que das anomalias cerebrais encontradas. Nesses indivíduos, com pequenas anomalias da linha média da face, os hemisférios cerebrais mostram uma completa separação. Contudo, podem apresentar alterações em outras estruturas cerebrais da linha média, tais como Corpo Caloso, Tálamo, Hipotálamo, Hipófise e/ou estruturas do Rinencéfalo (COHEN, 2001, 2006; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006; TATSI et al., 2013).

Todavia, esta definição não é consensual. Há outros autores que definem, como Microformas de HPE, alterações faciais menores, sem alterações cerebrais e, como Formas Mínimas de HPE, casos em que estão presentes alguma anomalia cerebral não clássica (DUBOURG et al., 2007, HAHN; BARNES, 2010).

Quando os indivíduos com Microforma apresentam FLP na composição do seu fenótipo, podem, por vezes, serem diagnosticados como portadores de FLP isolada (não sindrômica), o que pode implicar em graves consequências, no que diz respeito ao seu diagnóstico, prognóstico e conduta. Nestes casos, em boa parte das vezes, as deficiências no desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) podem ser leves, sem que acarretem graves restrições aos seus portadores, complicando ainda mais o diagnóstico diferencial (SANTIAGO et al., 2006).

Os avanços em genética molecular, com o desenvolvimento de Sequenciamento de Nova Geração (SNG), como o Sequenciamento do Exoma, têm possibilitado a identificação de novas variantes gênicas envolvidas na patogenia da HPE (BIESECKER; GREEN, 2014; RICHARDS et al., 2015; MOUDEN et al., 2016). Este fato, associado à melhora na qualidade dos exames de imagens, têm auxiliado no diagnóstico, prognóstico e classificação da HPE e de outras anomalias relacionadas do Sistema Nervoso Central (SNC) (HAHN; BARNES, 2010; YANG; CHU; LEE, 2017).

Avanços recentes em exames de neuroimagem tornam cada vez mais evidentes nuances anteriormente não descritas, que têm orientado novos estudos genéticos, auxiliado na correlação entre fenótipo e genótipo, na proposição de possíveis diagnósticos diferenciais, na orientação clínica e no aconselhamento genético (SOLOMON; GROPMAN; MUENKE, 2000; YANG; CHU; LEE, 2017).

A complexidade dos mecanismos envolvidos na HPE *minor* foi recentemente observada em um indivíduo com discretas anomalias faciais, típicas desta forma *minor*, mas com uma pequena fusão muito bem localizada dos hemisférios frontais. Este indivíduo apresentava uma mutação heterozigota composta do gene *DISP1*, detectada através de Sequenciamento do Exoma (MOUDEN et al., 2016).

Durante algumas décadas, antes do advento das imagens refinadas e dos avanços da genética molecular, nos textos relacionados a HPE, era comum o uso do axioma cunhado por DeMyer, no início da década de 60, de que “*a face prediz o cérebro*” (DEMYER; ZEMAN; PALMER, 1964). Nas décadas seguintes, o espectro até então rígido que caracterizava a HPE em três tipos clássicos, passou a abrigar outra forma, a forma IHM e a forma da HPE *minor*. Além disso, diversas síndromes que cursam com HPE dentro do seu espectro fenotípico, foram melhor delineadas: Hartsfield (HONG et al., 2016), Steinfeld (JONES et al., 2016), Kallmann

(VAARALAHTI et al., 2012), entre outras. Estas condições estão classificadas dentro do grupo das Holoprosencefalias Sindrômicas e, em algumas situações, abrigam o espectro de fenótipos da HPE *minor*.

Diante do exposto, é possível que indivíduos com fenótipo de HPE *minor* ou Microformas, com alterações cerebrais mínimas, não sejam detectados em exames de rotina, e que a análise minuciosa e esquematizada, em busca de alterações cerebrais mais sutis, possa revelar essas alterações que, se encontradas, auxiliariam no entendimento do seu fenótipo.

Dentro deste contexto e dos novos achados em neuroimagens, constantes na literatura referida, neste nosso estudo, analisamos mais profundamente, uma amostra de 31 exames de neuroimagens do arquivo da Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular (SGCBM), do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), de indivíduos diagnosticados com fenótipo da HPE *minor* ou Microforma, a fim de rever anomalias cerebrais menores que possam não ter sido detectadas, correlacionando-as com os achados clínicos e estudos genéticos já realizados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A HPE foi inicialmente denominada por Hans Kundrat (1882) de Arrinencefalia, referindo-se a uma malformação do rinencéfalo, caracterizada pela ausência de Bulbos e Trato Olfativo (GOLDEN, 1999). No entanto, registros de sua ocorrência são encontrados em textos históricos, mitológicos ou adereços que remontam à antiga Grécia e à Babilônia (COHEN, 2010).

A HPE apresenta distribuição mundial, prevalência semelhante nas diferentes populações e variações quanto à etnia, com tendência a prevalência aumentada em grupos sociais menos favorecidos. Estes últimos podem decorrer de um viés, pois estas populações podem ter menor acesso a exames de pré-natal, resultando em um número menor de diagnósticos intrauterino e, conseqüentemente, um número menor de abortos eletivos (LEONCINI et al., 2008; ORIOLI; CASTILLA, 2010).

Alguns estudos mostram predominância pouco aumentada no sexo feminino (CROEN; SHAW; LAMMER, 1996; ORIOLI; CASTILLA, 2007), mas estas taxas poderiam ser explicadas pela diferença nas amostras estudadas (ORIOLI; CASTILLA, 2010). Estudos que avaliaram embriões e fetos com HPE encontraram taxas semelhantes entre os gêneros, ou até uma predominância masculina (MATSUNAGA; SHIOTA, 1977; BLAAS et al., 2002).

2.1 CLASSIFICAÇÃO E QUADRO CLÍNICO

A constatação de que todo telencéfalo estaria acometido, com formação de um ventrículo único chamado de Holosfera, levou a denominação de Holoprosencefalia para este conjunto de malformações cerebrais (YAKOVLEV, 1959). Demyer e Zeman (1963) ampliaram a definição de HPE, reconhecendo que, o Tálamo e outras estruturas do diencéfalo, também poderiam estar envolvidas, e deste modo, todo o prosencéfalo poderia ser acometido. Com base neste conceito, os autores classificaram a HPE, de acordo com a gravidade das alterações cerebrais encontradas, em três formas clássicas: Alobar, Semilobar e Lobar.

Na HPE Alobar, não há divisão do cérebro em hemisfério direito e esquerdo, com formação de um ventrículo único; na Semilobar, a fissura interhemisférica é incompleta, ficando os hemisférios posteriores parcialmente separados; e na forma Lobar ocorre a separação dos hemisférios, mas com alguma continuidade entre o córtex frontal (Quadro 1) (DEMYER; ZEMAN, 1963; DEMYER; ZEMAN; PALMER, 1964).

Forma de Holoprosencefalia	Descrição
Alobar	Hemisfério cerebral único (holosfera). Ventrículo único (monoverrículo). Ausência de divisão interhemisférica. Ausência do Trato e Bulbo Olfatório. Corpo Caloso Ausente. Não separação dos núcleos talâmicos.
Semilobar	Ventrículos rudimentares. Hemisférios cerebrais rudimentares. Incompleta divisão interhemisférica. Ausência ou hipoplasia do Trato e Bulbo Olfatório. Corpo Caloso ausente. Variável não separação dos núcleos talâmicos.
Lobar	Lobos cerebrais bem desenvolvidos. Fissura interhemisférica presente. Terceiro Ventrículo bem formado, e Ventrículos Laterais mais rudimentares. Neocórtex frontal contínuo na linha média. Ausência ou hipoplasia do Trato e Bulbo Olfatório. Corpo Caloso Ausente, hipoplásico ou normal. Núcleos da talâmicos separados.

Fonte: Modificado a partir de Dubourg et al. (2007).

Quadro 1 - Classificação anatômica das formas clássicas de HPE

Somente no fim da década de 80, com o aprimoramento dos exames por imagem, que as anomalias do SNC passam a ser mais bem delineadas, permitindo o reconhecimento das estruturas e dos sistemas envolvidos, possibilitando classificações mais pertinentes (BARKOVICH; NORMAN, 1989).

A condição denominada de HPE pode ocorrer por si só ou como parte do espectro de inúmeras síndromes genéticas ou de associações (FITZ, 1994). A princípio, a HPE era considerada um “continuum” dividido em três formas principais: Alobar, Semilobar e Lobar, cada qual com suas características clínicas e radiológicas (FITZ, 1983). Somente uma década após, é que novos tipos foram descritos, a forma IHM ou Sintelencefalia e a SPO (BARKOVICH; QUINT, 1993; LEWIS et al., 2002; HAHN et al., 2010).

A HPE Alobar é o subtipo mais frequente, variando de 40 a 78% dos casos, seguido, na maioria dos estudos, pela HPE Semilobar e depois pela Lobar (ROACH et al., 1975; BULLEN; RANKIN; ROBSON, 2001; ORIOLI; CASTILLA, 2007). Para a variante da HPE denominada de IHM ou Sintelencefalia não existem porcentagens referentes a incidência ou prevalência, mas números verificados em estudos, em séries de pacientes, sugerem que é baixa e por inferência não ultrapassa 4% (KO; KIM, 2010). Para a SPO, o mais recente subtipo, ainda não existem estudos sobre sua incidência.

Na variante da IHM, descrita pela primeira vez em 1993 (BARKOVICH; QUINT, 1993), a porção parietal e frontal posterior do cérebro ficam unidas na linha média, com separação dos lobos frontais anteriores e dos lobos occipitais (BARKOVICH; QUINT, 1993; SIMON et al., 2002). Na SPO, a fusão da linha média se restringe as regiões septal e pré-óptica, sem fusão neocortical significativa dos lobos frontais (HAHN; PINTER, 2002; HAHN et al., 2010).

Embora estes subtipos de HPE já estejam bem descritos, nem sempre a classificação anatômica é tão precisa, sendo que alguns indivíduos apresentam alterações anatômicas limítrofes, sugerindo um contínuo da não separação dos hemisférios cerebrais (HAHN; BARNES, 2010). Além das alterações descritas acima, a HPE pode estar associada a alterações da Hipófise, anormalidades do cérebro posterior e a outros defeitos do tubo neural, como encefalocele, meningomielocele e espinha bífida (COHEN, 2006).

As alterações faciais também variam em gravidade, podendo ser distribuídas dentro de um largo espectro, que vai desde sinais menores até grave dimorfismo facial. Os indivíduos com sinais menores, tais como variações para mais ou para menos da distância interocular (SIMON et al., 2002; HAHN; BARNES, 2010), base e pontes nasais achatadas, hipoplasia de face média, apresentam um perfil plano. Além disso, é frequente a ocorrência de FLP, unilateral, bilateral ou mediana, assim como dente incisivo central superior único (ICSU) e micrognatia (COHEN, 2006; DUBOURG et al., 2007; PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015) (Figura 1).

Fonte: SOLOMON; GROPMAN; MUENKE, 2000; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006.

Nota: (A) ciclopia e probólide; (B) Holoprosencefalia, cebocefalia e hipotelorismo; (C) microcefalia, hipotelorismo, agenesia da premaxila e FLP; (D) hipertelorismo e dimorfismo leve; (E) perfil plano.

Figura 1 - Achados faciais em HPE

As alterações anatômicas da HPE geralmente se acompanham de alterações faciais (Quadro 2), no entanto, novos casos foram descritos, demonstrando que essa correlação nem sempre está presente (GOLDEN, 1999). Foram identificados indivíduos que apresentavam alterações faciais descritas na HPE, mas com cérebros relativamente normais ou com alterações que não caracterizam a HPE (BEN-HUR; ASHUR; MURRERI, 1978; FRYNS; VAN DEN BERGHE, 1988; GOLDEN; HOLMES, 1994) e outros indivíduos com formas graves de HPE que não apresentam alterações faciais significantes (VAN GOOL et al., 1990).

Tipo de Face	Características Faciais	Crânio e Cérebro
I. Ciclopia	Olho único ou olho parcialmente dividido em uma órbita única. Arrinia com probólide.	Microcefalia. Holoprosencefalia Alobar.
II. Etimocefalia	Hipotelorismo orbital extremo, mas órbitas separadas. Arrinia com probólide.	Microcefalia. Holoprosencefalia Alobar.
III. Cebocefalia	Hipotelorismo orbital, nariz como probólide mas sem fissura de lábio mediana.	Microcefalia. Usualmente tem Holoprosencefalia Alobar.
IV. Com fissura de lábio mediana	Hipotelorismo orbital, nariz achatado.	Microcefalia e algumas vezes Trigonocefalia. Usualmente tem Holoprosencefalia Alobar.
V. Com primórdio da pré-maxila	Hipotelorismo orbital, fissura de lábio bilateral com processo mediano representando Primórdio da Pré-maxila. Nariz achatado.	Microcefalia e algumas vezes Trigonocefalia Holoprosencefalia Semilobar ou Lobar.

Fonte: DEMYER; ZEMAN; PALMER, 1964.

Quadro 2 - Correlações entre alterações faciais e severidade da HPE

Atualmente, aceita-se que a correlação entre a alterações da face e do cérebro está presente em aproximadamente 80% dos casos (COHEN, 2006; DUBOURG et al., 2007). Os exames de neuroimagem surgem como uma importante

ferramenta para auxiliar na classificação, diagnóstico, prognóstico, manejo e aconselhamento genético das Holoprosencefalias.

Outras manifestações clínicas da HPE envolvem o atraso no DNPM, que varia de acordo com a gravidade das alterações cerebrais. Convulsões podem estar presentes em aproximadamente metade dos pacientes com HPE e, geralmente, são refratárias à medicação nos casos de mais graves. Além disso, hipotonia, fraqueza muscular, espasticidade, distonias, movimentos anormais e hidrocefalia podem estar presentes (DUBOURG et al., 2007).

Muitos indivíduos apresentam desordens endocrinológicas que podem resultar de alterações no desenvolvimento do Hipotálamo e/ou da Hipófise (HAHN et al., 2005). O Diabetes Insípido (DI) é a principal manifestação endocrinológica e pode ser decorrente de alterações no desenvolvimento dos núcleos supra-ópticos e paraventriculares da região hipotalâmica, que produzem o hormônio antidiurético; ou na liberação inadequada deste hormônio, através da Hipófise Posterior (Neuroipófise).

Hahn et al. (2005) analisaram 117 pacientes com os diferentes subtipos de HPE e encontraram 70% dos pacientes com DI. Os autores identificaram uma correlação entre DI e a não separação da região hipotalâmica. Neste mesmo estudo, também foi descrito hipotireoidismo em 11% dos pacientes, hipocortisolismo em 7% e deficiência de hormônio de crescimento em 5% dos casos, que podem ser decorrentes de alterações hipotalâmicas ou da Hipófise Anterior (Adenoipófise).

A HPE tem grande variabilidade na expressão clínica, e no extremo de formas mais leves, mas pertencente ao espectro holoprosencefálico, encontram-se indivíduos com características faciais mais leves e sem as alterações cerebrais clássicas da HPE. Este grupo de indivíduos foi denominado como portadores de HPE *minor* ou Microforma (ROESSLER et al., 2003; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006, 2010).

Esses indivíduos apresentam anomalias da linha média da face, que compreende pequenos achados, tais como hipotelorismo isolado, ICSU, FLP unilateral, bilateral ou mediana, anomalias do Septo Nasal (aplasia, hipoplasia, perfil facial plano) e perímetro craniano normal ou no limite inferior de normalidade. Essas características conferem à face um aspecto típico (ROESSLER et al., 2003; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006, 2010; STOKES et al., 2018). Em alguns casos, estes indivíduos podem apresentar ausência de Trato Olfatório, agenesia de Corpo

Caloso e alterações no desenvolvimento da Hipófise e Hipotálamo, enquanto outros parentes são afetados com formas mais graves da HPE (COHEN, 2006; TATSI et al., 2013; PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015).

Indivíduos com HPE podem apresentar FLP como parte do seu fenótipo, e em alguns casos, ser a única manifestação clínica mais evidente de uma Microforma (RICHERI-COSTA; RIBEIRO, 2006, 2010). Este quadro clínico pode, erroneamente, levar ao diagnóstico de FLP isolada (não síndrômica). As FLP são defeitos congênitos, caracterizados pela descontinuidade das estruturas do lábio, palato, ou ambos, podendo comprometer a anatomia e funcionalidade da face, com diferentes graus de severidade. Constituem uma das mais frequentes malformações da espécie humana, com prevalência média mundial de 1 a 2 para cada 1.000 nascimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A FLP pode ser uma manifestação isolada ou pode estar associada a outras malformações e, nestes casos, é considerada como FLP síndrômica. Em indivíduos com HPE, embora a FLP possa comprometer o lábio e/ou palato, nos casos clássicos de HPE, a fissura mediana é a mais frequente, e resulta da agenesia da pré-maxila (SOLOMON; GROPMAN; MUENKE, 2000; RICHERI-COSTA; RIBEIRO, 2010; BOUTRAY et al., 2016).

Alguns autores têm demonstrado uma associação entre FLP e deficiências de hormônios hipofisários (LARON; TAUBE; KAPLAN, 1969; ROITMAN; LARON, 1978; RUDMAN et al., 1978; TUOHY; FRANKLIN, 1984). Outros estudos sugerem que o desenvolvimento do cérebro e da face estão fortemente relacionados e defeitos craniofaciais podem estar associados a defeitos cerebrais (KJAER, 1995; NOPOULOS et al., 2001, 2002; CALZOLARI et al., 2007; MUELLER et al., 2007; NOPOULOS et al., 2007). A associação clínica entre as FLP e as deficiências de hormônios hipofisários também podem estar presentes na HPE, o que sugere, em alguns casos, uma possível etiologia comum (COHEN, 2006; MCCABE et al., 2011; BANCALARI et al., 2012).

Indivíduos com quadros mais graves de HPE vão à óbito, variando de dias a meses em 20 a 30% dos casos de HPE Alobar, podendo sobreviver até um ano de idade. A sobrevida dos indivíduos está relacionada ao funcionamento do encéfalo malformado e a presença de outras malformações que possam comprometer a qualidade de vida. Os pacientes com HPE Alobar apresentam importante atraso no

DNPM, embora, raramente alguns possam adquirir algumas habilidades. A vasta maioria de crianças com HPE Alobar tem taxa de sobrevivência muito limitada (WEISS et al., 2018).

A principal causa de óbito, entre os pacientes com formas mais graves de HPE, são manifestações dependentes de alterações de funções básicas, reguladas pelo tronco cerebral, que resultarão em hipo/hipertermia, apneia e alterações na frequência cardíaca. Além disso, são comuns infecções, principalmente pulmonares, Diabetes Insípido e convulsões refratárias ao tratamento usual (COHEN, 2006).

Na HPE Semilobar ou Lobar, na maioria dos casos, a sobrevida não é previsível. Nos casos de Microformas de HPE, os indivíduos têm sobrevida longa e a maioria apresenta coeficiente normal de cognição (SANTIAGO et al., 2006). Embora estes indivíduos possam apresentar significativo comprometimento das habilidades de linguagem (SANTIAGO et al., 2006), já foram descritos casos de indivíduos com Microformas, com mutações patogênicas associadas à HPE e função cognitiva bem desenvolvida (SOLOMON et al., 2012).

A identificação de Microformas de HPE em indivíduos com características faciais mais leves, DNPM adequado, sem parentes afetados com formas clássicas, pode ser uma tarefa difícil, tornando este diagnóstico ainda mais desafiador.

2.2 ETIOLOGIA

A etiologia da HPE é heterogênea e complexa, resultante de múltiplas influências, tanto genéticas como ambientais, que se manifestam na grande variabilidade da expressão clínica (CROEN; SHAW; LAMMER, 2000; MING; MUENKE, 2002). Entre os fatores ambientais, o Diabetes Mellitus (DM) gestacional é o fator mais bem reconhecido, sendo o início da gestação a fase mais crítica. Diversos estudos relatam esta associação e consideram um risco de 1-2% de gestantes com DM terem filhos com HPE (BARR et al., 1983, COHEN; SHIOTA, 2002).

Como o DM apresenta alta incidência na população mundial, esta associação tem grande relevância (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). A hiperglicemia, o estresse oxidativo e outras causas de distúrbios metabólicos têm sido investigados, mas, o mecanismo pelo qual o DM aumenta o risco para o

desenvolvimento da HPE, ainda não está bem esclarecido (JOHNSON; RASMUSSEN, 2010; MOEN et al., 2017).

A exposição de gestantes a álcool também pode estar associada à etiologia da HPE. Foram descritos casos de HPE em gestantes com história de abuso de álcool (RONEN; ANDREWS, 1991). Em estudos em animais, o álcool foi capaz de induzir HPE em camundongos (ROGERS et al., 2004; HIGASHIYAMA et al., 2007). Estes estudos sugerem que o etanol pode reduzir a mielinização cerebral e desencadear neurodegeneração apoptótica maciça no cérebro em desenvolvimento, com diminuição da massa cerebral (OLNEY et al., 2000; OZER; SARIOGLU; GÜRE, 2000). Além disso, o álcool poderia interferir na síntese do ácido retinóico, outro teratógeno envolvido na HPE (COHEN; SHIOTA, 2002).

O ácido retinóico, usado para o tratamento de vários distúrbios de queratinização da pele, induz Holoprosencefalia em camundongos e inibe a expressão do *Shh* e *Ptch* em embriões de aves. Estes genes estão associados à HPE em humanos (COHEN; SHIOTA, 2002). Outros possíveis agentes teratogênicos são as drogas usadas para reduzir os níveis de colesterol, como as estatinas. O colesterol participa da via de sinalização do SHH, e a síndrome de Smith-Lemli-Opitz, com marcada redução do colesterol, está associada, em 5% dos casos, à HPE. Tem sido sugerido que os níveis de colesterol durante a embriogênese poderiam influenciar nas alterações genéticas, alterando a expressão fenotípica da HPE (EDISON; MUENKE, 2004; HAAS; MUENKE, 2010).

Miller et al. (2010) encontrou fortes evidências de associação de HPE com o uso de aspirina e com TÉCNICAS de reprodução assistida, mas essas associações ainda não foram confirmadas. Estudos que avaliaram a associação de infecções congênicas (citomegalovírus, rubéola, herpes vírus, infecções pulmonares e infecções sexualmente transmissíveis) também não são conclusivos (BARR et al., 1983; CROEN; SHAW; LAMMER, 2000; JOHNSON; RASMUSSEN, 2010; MILLER et al., 2010).

Os agentes teratogênicos podem interagir com as causas genéticas da HPE, como mostram alguns estudos em animais. Estes achados acentuam a complexidade etiológica da HPE, que não pode ser explicada somente pelas várias causas genéticas já identificadas (BARTHOLIN et al., 2006; KIETZMAN et al., 2014). Todos esses

fatores reforçam uma hipótese multifatorial da HPE para explicar sua variedade fenotípica.

Causas genéticas de HPE são identificáveis em aproximadamente 15-20% dos casos e incluem desde aberrações cromossômicas até mutações em um único gene (COHEN, 2006). As aberrações cromossômicas são a causa mais frequente de HPE, diagnosticadas em 32-41% dos casos de HPE, mas estes dados podem ser subestimados, uma vez que a maioria destas aberrações resultam em óbito fetal (SOLOMON et al., 2010). Entre as aberrações cromossômicas, a trissomia do cromossomo 13 é a mais frequente, diagnosticada em 70% dos casos e seguida pela trissomia do cromossomo 18 (DUBOURG et al., 2007).

Em uma menor porcentagem dos casos, a HPE pode ser resultante de mutações genéticas. Nestes casos, a HPE pode estar associada a diversas síndromes genéticas (HPE síndrômica), ou se apresentar como uma patologia isolada (HPE não síndrômica). Em quase 75% dos casos onde não se encontram aberrações cromossômicas, também não se identificam mutações genéticas (ROESSLER; MUENKE, 2010). Entre as síndromes genéticas associadas à HPE estão a síndrome de Smith-Lemli-Opitz (OMIM 270400), Pallister-Hall (OMIM 146510), Rubinstein-Taybi (OMIM 180849), Hartsfield, (OMIM 615465). Diversas outras síndromes, com herança autossômica dominante, autossômica recessiva ou herança ligada ao X, também podem ter a HPE compondo seu espectro fenotípico (COHEN, 2006).

Casos de HPE não síndrômicos, têm sido considerados como uma patologia de herança autossômica dominante com penetrância incompleta e expressividade altamente variável (SOLOMON et al., 2010). Entretanto, estudos mais recentes, apontam para um padrão de herança complexa, envolvendo a interação de mais de um gene, associado a diversos fatores ambientais (DUBOURG et al., 2016; MOUDEN et al., 2016).

Mutações em heterozigose já foram identificadas em 17 genes relacionados as principais vias de sinalização que participam do desenvolvimento inicial do encéfalo (DUBOURG et al., 2016). As principais vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento embriológico do encéfalo são as vias do SHH (*Sonic hedgehog*), do BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), do FGF (*Fibroblast Growth Factor*), do WNT (*Wingless/Integrated*), do NODAL e do RA (*Retinoid*) (PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015).

Além dos 17 genes já identificados (Quadro 3), outros genes candidatos têm sido propostos: *EYA4*, *FOXA2*, *LRP2*, *LSS*, *HHIP*, *SMO*, *BMP4*, *CDC42*, *ACVR2A*, *OTX2*, e *WIF1* (ROESSLER; MUENKE, 2010; ROSENFELD et al., 2010; SOLOMON et al., 2010; MERCIER et al., 2011; ROESSLER et al., 2012). Estes genes participam das fases iniciais do desenvolvimento embrionário, pertencendo principalmente aos caminhos de sinalização como SHH ou NODAL (MERCIER et al., 2013).

Gene Humano	Cromossomo	Função
<i>SHH</i>	7q36.3	Essencial na padronização bilateral do prosencéfalo ventral e na divisão do campo ocular, coordenando a organização da região craniofacial (estruturas dentro da linha média). Participa da formação precoce do lábio superior e palato.
<i>ZIC2</i>	13q32.3	Formação do eixo axial e desenvolvimento do cérebro dorsal, atuando na neurulação.
<i>SIX3</i>	2p21	Desenvolvimento do prosencéfalo e formação dos olhos.
<i>TGIF1</i>	18p11.31	Fator de transcrição que inibe a sinalização através das vias do Nodal/ <i>TGF-β</i> e repressor da transcrição genética regulada pelo ácido retinóico.
<i>PTCH1</i>	9q22.32	Receptor para ligantes do <i>SHH</i> , repressor desta sinalização.
<i>TDGF1</i>	3p21.31	Membro da família <i>EGF-CFC</i> e um co-receptor obrigatório envolvido na sinalização NODAL.
<i>GLI2</i>	2q14.2	Fator de transcrição implicado como mediador obrigatório da transdução do sinal do <i>SHH</i> .
<i>DISP1</i>	1q41	Liberador do ligantes do <i>SHH</i> .
<i>FOXH1 (FAST1)</i>	8q24.3	Fator co-transcricional do <i>SMAD2</i> e <i>SMAD4</i> que intervêm nas vias de sinalização Nodal/ <i>TGF-β</i> e são vitais para a especificação do eixo anterior-posterior.
<i>GAS1</i>	9q21.33	Co-receptores da sinalização Hedgehog e necessário para ativar completamente esta via.
<i>NODAL</i>	10q22.1	Membro da família <i>TGF-β</i> envolvido na estabilidade e lateralidade da linha média, atuando na gastrulação.
<i>DLL1</i>	6q27	Parece atuar na regionalização do prosencéfalo, mas sua função ainda não está bem definida.
<i>CDON</i>	11q24.2	Co-receptores da sinalização Hedgehog, sendo necessário para ativar completamente esta via.
<i>STIL</i>	1p33	Provável função durante a padronização precoce do prosencéfalo, ligada a sinalização <i>SHH</i> .
<i>FGF8</i>	10q24.32	Estudos em animais, atua no desenvolvimento do mesencéfalo e dos membros, na organogênese, na gastrulação embrionária e na determinação do eixo esquerda-direita.
<i>FGFR1</i>	8p11.23	Essencial para o desenvolvimento do telencéfalo ventral, mas também regula a formação da linha média rostro-dorsal.
<i>SUFU</i>	10q24.32	Regulador negativo da sinalização do <i>SHH</i> .

Fonte: GUTIN et al., 2006; DUPÉ et al., 2011; MOUDEN et al., 2015; PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015; XAVIER et al., 2016.

Quadro 3 - Genes associados à HPE, sua localização cromossômica e sua função relacionada ao desenvolvimento do encéfalo

Os genes *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* e *TGIF1* têm sido considerados os mais frequentes, identificados em 12-17%, 3-9%, 1-3%, e 1% dos casos respectivamente (COHEN, 2006; DUBOURG et al., 2007). Entretanto, estudos recentes, usando Sequenciamento de Nova Geração (SNG), tem identificado outros genes com relevante participação na patologia da HPE (DUBOURG et al., 2016). Dubourg et al. (2016), usando SNG, estudaram 257 indivíduos (80 deles com Microforma de HPE). Com os resultados obtidos da análise molecular de um painel de 20 genes selecionados, os autores sugerem uma nova frequência de genes envolvidos na HPE: *SHH*, 5,8%; *ZIC2*, 4,7%; *GLI2*, 3,1%; *SIX3*, 2,7%; *FGF8*, 2,3%; *FGFR1*, 2,3%; *DISP1*, 1,2%; *DLL1*, 1,2% e *SUFU*, 0,4%.

As mutações no *SHH*, o principal gene envolvido na patogenia da HPE, têm expressão clínica muito variável, podendo se manifestar desde Microformas até formas mais severas de HPE (ROESSLER et al., 1996; BERTOLACINI; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO-BICUDO, 2010). As mutações no gene *ZIC2*, geralmente ocorrendo *de novo* e associadas a formas mais graves de HPE, apresentam dimorfismo menos severos da face. Alterações no gene *ZIC2* também estão associadas a HPE IHM e a outros defeitos do tubo neural (HAHN; PINTER, 2002; DUBOURG et al., 2007; DUBOURG et al., 2016). As mutações do *SIX3* são descritas em casos mais graves de HPE, acompanhados de severas alterações faciais e as mutações neste gene geralmente são herdadas (COHEN, 2006; LACBAWAN et al., 2009; DUBOURG et al., 2016). Mutações no gene *TGIF1* foram identificadas em indivíduos com HPE clássica e, em seus familiares apresentando somente hipotelorismo, microcefalia e FLP, fenótipos representativos das Microformas (GRIPP et al., 2000; DUBOURG et al., 2007).

Solomon et al. (2010), analisando a correlação entre o genótipo e o fenótipo da HPE, observou uma maior associação entre HPE Semilobar e mutações no gene *ZIC2* e uma maior probabilidade de indivíduos com HPE *minor* apresentarem mutações no gene *SHH*. Mas os autores concluem que a identificação de uma mutação ainda não permite a previsão exata de um fenótipo, e que novos estudos deveriam abordar mais indivíduos, contemplando os dois extremos do fenótipo, com atenção as características não vistas comumente como parte do espectro da HPE.

Mercier et al. (2011) estudando uma amostra europeia de 645 indivíduos (51% de fetos e 49% de crianças nascidas vivas) e seus 699 familiares, identificou, em 25%

dos casos, mutações nos quatro maiores genes associados à HPE (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*). As mutações encontradas nos genes *SHH*, *SIX3* e *TGIF1* foram herdadas em mais de 70% casos e a severidade da face se correlacionava com a severidade da malformação encefálica. Inversamente, as mutações no *ZIC2*, em 70% dos casos, ocorreram *de novo*, e nenhuma correlação foi possível estabelecer para essas mutações. As formas mais graves de HPE foram associados às mutações do *SIX3* e *ZIC2*, enquanto as Microformas foram associadas a mutações de *SHH*. Nos casos de mutações no *ZIC2*, predominaram defeitos de migração neuronal. Quarenta por cento das mutações identificadas, em indivíduos com malformações extracranianas associadas, foram no gene *ZIC2*. Além disso, nos 11 indivíduos com HPE IHM, as mutações, identificadas em dois indivíduos, foram no gene *ZIC2*.

Entre os outros genes relacionados a etiologia da HPE, o gene *GLI2*, um fator de transcrição mediador da via de sinalização do SHH, tem aumentado sua frequência em estudos recentes (DUBOURG et al., 2016). Mutações neste gene que, inicialmente, foram associadas a um fenótipo específica do espectro de HPE (ROESSLER et al., 2003), posteriormente, também mostraram diversidade na expressão fenotípica, sendo descritos tanto em indivíduos apresentando HPE Lobar como HPE *minor* (DUBOURG et al., 2016). As mutações neste gene, na maioria das vezes, estão associações com alterações da linha média, como ICSU e hipopituitarismo (COHEN, 2006; BERTOLACINI et al., 2012; DUBOURG et al., 2016).

Mutações nos genes *FGF8* e *FGFR1*, recentemente identificadas em indivíduos com HPE, também mostraram grande variabilidade fenotípica entre os familiares afetados, com vários indivíduos exibindo Microformas (MCCABE et al., 2011; DUBOURG et al., 2016).

Tem sido discutido na literatura que a interação entre os múltiplos genes e os fatores ambientais poderiam explicar a variabilidade fenotípica Inter e Intrafamiliar. A HPE apresenta penetrância incompleta e grande variabilidade na expressão clínica, que ainda não está totalmente esclarecida. A interação de dois ou mais genes clássicos da HPE; os efeitos cumulativos de mutações em genes não clássicos da HPE, mas que atuam nas vias de sinalização da embriogênese do encéfalo; a presença de modificadores genéticos ou contribuições epigenéticas; todos estes fatores compõe a etiologia multifatorial da HPE, denominada hipótese de *Múltiplo Hit*,

e atualmente a mais aceita (MING; MUENKE, 2002; MERCIER et al., 2011; BILLINGTON et al., 2015; PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015; DUBOURG et al., 2016; MOUDEN et al., 2016).

Recentemente, os Sequenciamentos de Nova Geração têm possibilitado a investigação simultânea de vários genes, tornando-se uma ferramenta importante para o diagnóstico molecular de doenças com etiologia complexa, tais como a HPE (BIESECKER; GREEN, 2014; RICHARDS et al., 2015). Essas novas tecnologias têm permitido a identificação de novas variantes genéticas em indivíduos com HPE (DUBOURG et al., 2016; MOUDEN et al., 2016).

Apesar desses avanços em genética molecular, muitos casos ainda permaneçam sem diagnóstico etiológico, especialmente as Microformas, que constituem um dos mais desafiadores fenótipos da HPE.

2.3 EMBRIOLOGIA DO ENCÉFALO

O Sistema Nervoso Central (SNC) inclui o encéfalo e a medula espinhal e tem sua origem na placa neural. Em torno da terceira semana, o disco embrionário bilaminar, com duas camadas de células (hipoblasto e epiblasto), torna-se trilaminar, dando origem a três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma de onde se originaram os diversos órgãos e tecidos específicos do organismo. Esse processo recebe o nome de gastrulação (MOORE; PERSAUD, 2013).

Em seguida, células mesenquimais migram para o polo cefálico do embrião, desenvolvendo um cordão celular, a notocorda, que se tornará o eixo principal deste embrião. A notocorda e o mesoderma paraxial, induzem o ectoderma sobrejacente a se expressar para formar a placa neural, e funcionam como um indutor primário do embrião inicial (MOORE; PERSAUD, 2013).

Por volta do 18º dia, inicia-se a neurulação, que é a invaginação da placa neural formando o sulco neural e as pregas neurais. Este processo termina ao final da quarta semana, com a formação do tubo neural e a crista neural (Figura 2). O tubo neural vai dar origem ao SNC (encéfalo e medula espinhal). As células da crista neural

formação a maior parte do Sistema Nervoso Periférico e do Sistema Nervoso Autônomo (LARSEN, 2001; MOORE; PERSAUD, 2013).

Fonte: MOORE; PERSAUD, 2013.

Figura 2 - Formação do tubo neural e crista neural

Com a formação do tubo neural, em cada uma de suas extremidades se formam orifícios chamados de neuroporos. O fechamento do neuroporo rostral (25º dia) e do neuroporo caudal (27º dia) ocorrem juntamente com a formação da circulação vascular no tubo neural. A parte interna do tubo neural constitui-se no canal neural, que se desenvolverá no sistema ventricular do encéfalo e no canal central da medula espinhal (LARSEN, 2001; MOORE; PERSAUD, 2013).

Na terceira semana, na extremidade rostral do tubo neural, desenvolvem-se três vesículas encefálicas primárias: o prosencéfalo (encéfalo anterior), o mesencéfalo (encéfalo médio) e o rombencéfalo (encéfalo posterior). Na quinta semana o prosencéfalo se dividirá em telencéfalo e diencéfalo, e o rombencéfalo se divide em metencéfalo e mielencéfalo. O mesencéfalo não se divide. O telencéfalo dará origem aos hemisférios cerebrais e Ventrículos Laterais e o diencéfalo formará o Epitálamo, Tálamo, Hipotálamo e Terceiro Ventrículo (MOORE; PERSAUD, 2013) (Figura 3).

Fonte: MOORE; PERSAUD, 2013.

Figura 3 - Representação esquemática da divisão das vesículas encefálicas e as estruturas resultantes

Desde da gastrulação, o prosencéfalo adquire especialização regional sob a influência de vários centros de sinalização. Modelos animais mostram que o *Shh* é essencial para indução e diferenciação da parte ventral do tubo neural. A via do Shh interage com outras vias de sinalização (Fgf, Bmp e Wnt), com ações reguladoras e sinérgicas resultando em especificação regional e na morfogênese do telencéfalo. (GENG; OLIVER, 2009).

No desenvolvimento e diferenciação do tubo neural dorsal estão envolvidas as proteínas das vias Bmp e Wnt. O envolvimento da sinalização do Shh no desenvolvimento do telencéfalo dorsal também tem sido sugerida. A divisão do prosencéfalo e a formação da linha média requerem equilíbrio delicado entre estas vias de sinalização (SHIOTA et al., 2007).

O crescimento desigual das estruturas resultantes da divisão do prosencéfalo dá origem às flexuras encefálicas (flexura mesencefálica, cervical e pontinha) que conferem ao encéfalo sua forma característica. Após a formação do prosencéfalo, o neuroepitélio do tubo neural prolifera para desenvolver neuroblastos, glioblastos e o epêndima do SNC. A migração posterior dos neuroblastos para a região periférica desenvolverá a substância branca e substância cinzenta do SNC (LARSEN, 2001).

O rápido crescimento lateral dos hemisférios cerebrais envolve externamente o diencéfalo e o mesencéfalo. À medida que os hemisférios se expandem surgem os

sulcos e giros cerebrais, com formação dos lóbulos cerebrais. Os hemisférios cerebrais ficam unidos pelas comissuras cerebrais, que atravessam os hemisférios pela lâmina terminal, resultante da região do fechamento do neuroporo rostral. A maior comissura cerebral é o Corpo Caloso que conecta as áreas neocorticais. A Comissura Anterior conecta o Bulbo Olfatório e áreas de cada hemisfério relacionadas e a Comissura do Hipocampo conecta as formações hipocâmpais. O Septo Pelúcido tem origem do espessamento do final da lâmina terminal e o Quiasma Óptico se desenvolve na parte ventral da lâmina terminal. O Bulbo Olfatório e o Trato Olfatório também se originam do telencéfalo (LARSEN, 2001; MOORE; PERSAUD, 2013).

A divisão do diencefalo resulta em três estruturas que desenvolvem importantes funções no nosso organismo: Hipotálamo, Tálamo e Epitálamo. O Hipotálamo controla a secreção dos hormônios hipofisários e as atividades viscerais, como os batimentos cardíacos e a regulação da temperatura corporal. O Tálamo serve como um centro de retransmissão das informações de estruturas subcorticais, antes de passarem pelo córtex cerebral. O Epitálamo dá origem a glândula pineal e os corpos mamilares que surgem na superfície ventral do Hipotálamo. O diencefalo também dá origem à porção nervosa da Hipófise, à Neuroipófise, juntamente com a haste hipofisária e eminência média (LARSEN, 2001; MOORE; PERSAUD, 2013).

A Hipófise, que se desenvolve da terceira à oitava semana embrionária, é composta por dois diferentes tecidos de diferentes origens. A Adenoipófise (porção anterior), com tecido glandular, tem origem de uma evaginação do teto do estomadeu (cavidade oral primitiva), denominado divertículo hipofisário. A porção posterior, a Neuroipófise, resulta de uma invaginação do neuroectoderma da região ventral do diencefalo (Figura 4) (MOORE; PERSAUD, 2013). Para que a Hipófise se desenvolva é necessário o contato da Bolsa de Rathke (divertículo hipofisário) com o cérebro e a troca de informações moleculares entre Adenoipófise e Neuroipófise (RIZZOTI; LOVELL-BADGE, 2005).

Fonte: MOORE; PERSAUD, 2013.

Figura 4 - Estágios sucessivos de desenvolvimento da Hipófise

Até a 24^a semana, o cérebro ainda tem uma aparência primitiva com apenas uma circunvolução giral mínima. A partir desse período, até o nascimento, o cérebro aumenta em tamanho, peso e principalmente na complexidade giral, mas estas transformações só ocorrem com base nas estruturas estabelecidas anteriormente na gestação (YANG; CHU; LEE, 2017).

2.4 EMBRIOLOGIA DA FACE

A face humana se forma entre a quarta e a décima semana embrionária, em torno do estomodeu (cavidade oral primitiva) e seu desenvolvimento depende da indução de centros organizadores do prosencéfalo e do rombencéfalo. As estruturas da face resultam da fusão das cinco proeminências faciais: a proeminência frontonasal única, um par de proeminências maxilares e um par de proeminências mandibulares (YAMADA, 2006; MOORE; PERSAUD, 2013).

A proeminência frontonasal, que circunda a porção ventrolateral do prosencéfalo, desenvolverá as proeminências nasais laterais e mediais, que formarão a testa, o nariz e o limite rostral do estomodeu, de onde se desenvolve a pré-maxila e o palato primário, sendo, portanto, essencial para o desenvolvimento da face média (YAMADA, 2006). As proeminências maxilares e mandibulares surgem do primeiro par de arcos faríngeos, resultantes da migração das células da crista neural. As

proeminências maxilares formarão a parte superior das bochechas, a maior parte do lábio superior e da mandíbula e o palato secundário. As proeminências mandibulares formarão o queixo, o lábio inferior e as regiões inferiores da bochecha (MOORE; PERSAUD, 2013) (Figura 5).

Fonte: MOORE; PERSAUD, 2013.

Figura 5 - Ilustrações das fases progressivas do desenvolvimento da face humana

Os olhos se originam de um campo retiniano único, que se desenvolve no final craniano da placa neural, ao final do período da gastrulação. Posteriormente, no 22º dia, esse único campo retiniano é dividido em dois primórdios retinianos (MUENKE;

BEACHY, 2000; SHIOTA et al., 2007), que surgem como evaginações (vesículas ópticas) na porção lateral do prosencéfalo e vão se tornando mais frontais, de acordo com o crescimento do encéfalo (MOORE; PERSAUD, 2013). O mesênquima da proeminência frontonasal contribui para manter a distância entre os dois olhos e formar as estruturas nasais (YAMADA, 2006).

O nariz começa a se formar no final da quarta semana, com o surgimento dos placóides nasais nas porções inferolaterais da proeminência frontonasal. Com a proliferação do mesênquima que circunda estes placóides, desenvolvem-se as fossetas nasais, que são os primórdios das narinas e das cavidades nasais (MOORE; PERSAUD, 2013). A migração medial das proeminências maxilares facilita a fusão das proeminências nasais medianas que formaram o lábio superior medial, o filtro da pré-maxila (sulco vertical do lábio superior), os dentes incisivos superiores, o palato primário e o Septo Nasal. As proeminências nasais laterais dão origem às narinas (BAXTER; SHROFF, 2011).

A formação do palato inicia-se no final da quinta semana e completa-se na décima segunda semana gestacional. O palato se desenvolve em dois estágios: palato primário e palato secundário. No início da sexta semana, após a fusão das saliências nasais mediais, surge um segmento intermaxilar (o processo palatino mediano), que vai dar origem ao palato primário. Essa estrutura vai dar origem à parte pré-maxilar da maxila que é uma pequena porção do palato duro, a porção anterior ao forame incisivo. Também na sexta semana, os processos palatinos laterais, que têm origem nas faces internas das saliências maxilares, crescem e se fundem no final da décima semana, na linha média, atrás do forâmen incisivo, formando o palato secundário (MOORE; PERSAUD, 2013).

2.5 ALTERAÇÕES EMBRIOLÓGICAS NA HOLOPROSENCEFALIA

Os mecanismos de interação entre fatores genéticos e ambientais, que resultam na grande variabilidade das alterações encefálicas e faciais presentes na HPE, ainda não estão completamente esclarecidos (PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015).

As vias de sinalização do SHH, BMP, FGF, WNT, Nodal e RA devem atuar de modo sincrônico e coordenado para que a embriogênese do encéfalo e da face se

desenvolvam adequadamente. Os diferentes fenótipos individuais resultam da interação molecular entre o cérebro e a face, além do efeito direto que o crescimento do encéfalo exerce sobre a morfologia da face (PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015).

A interação entre estas vias de sinalização ajuda a amortecer as perturbações genéticas e/ou ambientais, até que eventos indesejáveis ultrapassem um determinado limiar e o fenótipo da HPE se expresse (PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015). O período da gastrulação parece ser um período crítico para que estes eventos aconteçam e resultem em malformações em períodos posteriores (SHIOTA et al., 2007).

Inicialmente o tubo neural é rodeado por mesoderma paraxial, lateralmente; mesoderma precordial e endoderma, por baixo; e ectoderma, por cima. Durante a gastrulação, a interação entre as sinalizações do FGF, WNT e BMP, em centros organizadores nestes tecidos vizinhos, vão desencadear a diferenciação e fechamento do tubo neural. Em seguida, células do ectoderma cefálico da crista neural migram para o polo cefálico do tubo neural e se diferenciam para formar os primórdios da face (PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015).

O *Shh* está presente em todo o mesoderma axial do embrião inicial, incluindo a placa precordial. Em estágios posteriores, o *Shh* sinaliza a partir de três domínios ectodérmicos: o neuroectoderma do prosencéfalo ventral; o ectoderma da linha média facial; e o endoderma faríngeo. A sinalização do *Shh* também é vista nos processos faciais durante a formação inicial do lábio superior e do palato. A relação tempo e espaço dos centros de sinalização é essencial para o desenvolvimento adequado da região craniofacial, particularmente as estruturas da linha média. Deste modo, mutações de genes que participam dos caminhos da sinalização do SHH podem resultar em HPE, com fenótipos de diferentes gravidades (PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015; XAVIER et al., 2016).

A simetria bilateral do prosencéfalo e a subdivisão do campo ocular, inicialmente único, é estabelecida pela sinalização do mesoderma (XAVIER et al., 2016). O prosencéfalo deve se dividir sagitalmente em hemisférios cerebrais direito e esquerdo, transversalmente em telencéfalo e diencefalo, e horizontalmente em Trato e Bulbo Olfativos (COHEN; SHIOTA, 2002). Estudos em animais demonstram que centros de sinalização do SHH no encéfalo participam da polaridade dorsoventral do prosencéfalo, da expressão do *Shh* no telencéfalo basal e na zona ectodérmica

frontonasal, que dará origem às estruturas da face. A diferenciação e especificação do telencéfalo também é resultante da adequada interação entre as sinalizações do SHH, FGF e BMP (PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015).

A três formas clássicas de HPE resultam da falta de expressão de genes na notocorda e na placa de assoalho do embrião, ou do excesso da expressão de genes na placa do teto do embrião. Como consequência, o desenvolvimento das estruturas da linha média e dos aspectos mais rostral e medial do prosencéfalo ficam prejudicados. Na face resultará em hipotelorismo e no encéfalo, na falta de indução do crescimento do lobo frontal. As estruturas cerebrais profundas (Tálamo, Hipotálamo e Núcleos Caudado e Lentiforme) são mais frequentemente acometidas, principalmente o Hipotálamo e o Núcleo Caudado (SIMON et al., 2000; BARKOVICH, 2002). Estudos demonstram o envolvimento dos genes dos caminhos de sinalização do Nodal, do BMP e do SHH, sendo o *Shh* o gene mais importante no desenvolvimento desta patologia (GENG; OLIVER, 2009) (Figura 5).

A MIH é resultante da diminuição da expressão de genes da placa de teto do embrião, ou da excessiva expressão de genes da notocorda ou da placa de assoalho do embrião. Como consequência, temos separação normal dos olhos ou hipertelorismo, Lobos Frontais separados na sua porção anterior, mas comprometimento dos núcleos talâmicos e da porção do corpo do Corpo Caloso. O *ZIC2* atua na linha média dorsal para promover a diferenciação da placa do teto do embrião em desenvolvimento. Mutações neste gene afetam estruturas encefálicas dorsais, como vistas na HPE IHM (Figura 5). Este gene também está associado ao fechamento do tubo neural, e sua insuficiência pode resultar em cefalocele, mielomeningocele ou malformação de Chiari II, malformações que podem estar associadas em indivíduos com HPE IM (BARKOVICH, 2002; SIMON et al., 2002).

Alterações hipofisárias podem estar presentes em indivíduos com HPE e, em alguns casos, ser a única alteração encefálica nas formas mínimas. Para adequado desenvolvimento da Hipófise, é necessário o contato da bolsa de Rathke com o cérebro, com troca de informações entre a Adenoipófise e Neuroipófise. A falha neste contato pode resultar em malformações hipofisárias (YAMADA, 2006). Estudos em animais mostram que mutações no *Gli2*, com perda de função, resultam em defeitos hipofisários e na formação do ICSU, por interferir na regulação de outros genes que atuam no germe dentário (ROESSLER et al., 2003; GENG; OLIVER, 2009).

Diversos genes atuam na embriogênese do prosencéfalo, mas a expressão clínica das mutações que resultam na HPE depende da relação tempo e espaço em que se manifestam (Figura 6). Alterações ocorrendo durante a gastrulação e a dobra do polo cefálico podem afetar a placa precordal, com maior probabilidade de resultar em HPE Alobar. Alterações durante ou após o fechamento do tubo neural, envolvendo os centros de padronização telencefálicos, rostral e ventral, têm maior probabilidade de desenvolver HPE Semilobar ou Lobar. Porém, quando o centro de padronização afetado é da região telencefálica dorsal, a forma provável de HPE é a IHM. Nas Microformas, sem alterações encefálicas, somente a sinalização do *Shh*, no ectoderma facial, é prejudicado (GENG; OLIVER, 2009).

Fonte: GENG; OLIVER, 2009.

Nota: (A) modelo de desenvolvimento do telencéfalo de mamíferos normais. No lado esquerdo, o retângulo branco representa a placa precordal. O quadrado azul, ao seu redor, destaca as etapas conhecidas por serem críticas na patogênese da HPE Alobar. No lado direito da figura, os genes conhecidos como importantes durante as etapas subsequentes do desenvolvimento do prosencéfalo. O retângulo laranja destaca as etapas e genes importantes para o HPE Semilobar. O retângulo verde ressalta os genes importantes para HPE IHM, e o retângulo cinza enfatiza os genes importantes para as Microformas do HPE. Linhas sólidas representam os processos que foram demonstrados e as linhas tracejadas representam esses mesmos processos que ainda não foram provados diretamente. **(B)** e **(C)** padrões de expressão normal dos genes no telencéfalo, em fases iniciais do seu desenvolvimento.

Figura 6 - Genes envolvidos no desenvolvimento de telencéfalo em condições normais e HPE

O crescimento e posicionamento das estruturas da face estão diretamente relacionadas com o crescimento do cérebro. Além das variações da face, resultantes do crescimento físico do encéfalo, recentes pesquisas revelam que a expressão do *SHH* no telencéfalo e no ectoderma da superfície cefálica interferem na expressão do *SHH* na zona ectodérmica frontonasal (PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015). O *Shh* participa da sobrevivência das células do polo cefálico da crista neural, que migram para

desenvolver o primeiro arco faríngeo, de onde se originaram os Processos Maxilares e mandibulares (XAVIER et al., 2016). Estas células da crista neural também migram da linha média dorsal do diencéfalo posterior para formar o Processo Frontonasal (GENG; OLIVER, 2009). O mesênquima craniofacial, especialmente na região da face média, pode estar significativamente reduzido em embriões com HPE (YAMADA, 2006).

O *SHH*, o principal gene que atua na sinalização da linha média ventral, é crítico para o desenvolvimento normal da face. Estudos em embriões de aves mostram que o hipotelorismo, a hipoplasia da face média e a FLP podem resultar de perturbações no desenvolvimento do Processo Frontonasal, em decorrência da reduzida sinalização do *Shh*. Do mesmo modo, excesso de sinalização do *Shh* pode resultar no alargamento mediolateral do Processo Frontonasal, levando ao fenótipo de hipertelorismo (SHIOTA et al., 2007; PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015). (Figura 6).

A ciclopia, presente em alguns casos mais graves de HPE Alobar, resulta de perturbações na divisão do primórdio ocular único, induzido pela sinalização da placa precordal, sob a sinalização do *SHH*. Perturbações neste processo podem levar a uma divisão incompleta, podendo ocorrer a formação de um olho mediano único (YAMADA, 2006; PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015).

2.6 NEUROIMAGENS EM HOLOPROSENCEFALIA

A genética é de fundamental importância na etiologia da HPE, mas ela sozinha não define o quadro clínico e o prognóstico, uma vez que a mesma variante genética pode estar presente em diferentes fenótipos, assim como, semelhantes fenótipos podem resultar de diferentes variantes (RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006; TATSI et al., 2013; DUBOURG et al., 2016). As alterações anatômicas presentes, resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais, irão definir o quadro clínico e o prognóstico destes pacientes (PLAWNER et al., 2002). Estes fatores fazem dos exames de neuroimagem uma importante ferramenta auxiliar no diagnóstico, classificação e entendimento das malformações cerebrais (BARKOVICH, 2002).

O desenvolvimento dos exames de neuroimagem, como a tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), na década de 1970, permitiram o estudo de órgãos internos do corpo, anteriormente analisadas somente por visualização direta, através de procedimentos cirúrgicos ou autópsias (SHAMPO; KYLE, 1996). Os avanços em biologia molecular e neuroimagens possibilitaram uma análise mais ampla e aprimorada de todo o espectro das malformações cerebrais presentes na HPE, incluindo desde diagnósticos intra-útero (ARANGIO et al., 2013), até pequenas alterações em pacientes com Microformas (BARKOVICH, 2002; HAHN; PLAWNER, 2004; HAHN; BARNES, 2010).

Além disso, as neuroimagens, sendo um método não invasivo, possibilitam a reavaliação desses pacientes em idades diferentes, o que muitas vezes se faz necessário, tendo em vista que o cérebro de uma criança ainda se apresenta em crescimento e mielinização. Em alguns casos, também pode ocorrer hidrocefalia, que dificulta a análise dos exames e a repetição das neuroimagens pode ser necessária após tratamento desta comorbidade (HAHN; PLAWNER, 2004).

Com o avanço das neuroimagens tem sido possível detalhar as diversas características anatômicas dos diferentes subtipos de HPE, bem como ajudar a entender sua origem embrionária. Esses exames confirmaram a percepção de que a HPE, antes de ser um conjunto de subtipos bem estabelecidos, é um contínuo de malformações das estruturas da linha média originárias do prosencéfalo. Além das três formas clássicas de HPE, a descrição de outros subtipos, como a IHM e a SPO, só foi possível com os estudos das imagens do encéfalo. O detalhamento das alterações encontradas envolve as discussões na definição das Microformas (BARKOVICH, 2002; HAHN; BARNES, 2010).

Para se obter uma melhor avaliação de indivíduos suspeitos de serem portadores de HPE, os exames de RM devem incluir sequências de imagens: axial, sagital e coronal, em cortes finos. As imagens axial e coronal ponderadas em T2, são preferidas. Os exames também devem permitir uma boa avaliação volumétrica e diferenciação da substância branca e da substância cinzenta. Idealmente, os exames deveriam ser analisados por radiologistas com experiência em neuroimagens (HAHN; BARNES, 2010). Embora, nem sempre se disponha de todas estas condições, devemos tentar identificar as principais estruturas que podem estar alteradas e que compõem o espectro das malformações da HPE.

Em imagens de um cérebro normal é possível visualizar os dois hemisférios cerebrais, do mesmo tamanho, separados pela fissura interhemisférica e unidos pelo Corpo Caloso, localizado acima do Septo Pelúcido, na linha média. Os hemisférios cerebrais apresentam giros e sulcos, resultando em uma forma arborizada, com a substância branca cerebral distribuída uniforme e periféricamente. Sobrepondo a substância branca subcortical, há a substância cinzenta cortical de 2 a 4 mm de espessura, e aparentemente uniforme em qualquer região. Na substância cinzenta profunda é possível visualizar os núcleos da base, assim como e as regiões talâmicas e hipotalâmicas, separados. Os Ventrículos Laterais, com cornos temporais (frontais) bem formados, e o Terceiro Ventrículo estão separados (YANG; CHU; LEE, 2017). A análise das neuroimagens nos planos: axial, coronal e sagital, são complementares, uma vez que a visualização de algumas estruturas só é possível em planos específicos.

Na análise de neuroimagens de indivíduos com HPE, as fissuras interhemisféricas, as estruturas da linha média do encéfalo, os Gânglios da Base, os núcleos talâmicos e hipotalâmicos, e o mesencéfalo, devem ser o foco da atenção. Também devem ser avaliados o sistema ventricular, a presença de cisto dorsal, malformações da substância branca e da substância cinzenta, a fissura Silviana (FS), o quiasma e nervos ópticos, e o Trato e Bulbo Olfatório. Anomalias do cérebro médio, cérebro posterior e estruturas extra cerebrais também devem ser pesquisadas para o diagnóstico adequado (HAHN; BARNES, 2010).

Estudos de neuroimagens demonstram que a maioria dos indivíduos com as três formas clássicas de HPE (Alobar, Semilobar e Lobar) apresentam córtex de espessura normal, embora a aparência visual possa ser de alargamento. Anormalidades corticais, quando presentes, são encontradas nas áreas corticais bem menos diferenciadas (heterotipias subcorticais). Este grupo de anormalidades resulta de grandes coleções de neurônios e glia situados na substância branca cerebral (BARKOVICH, 2002).

Barkovich et al. (2002) avaliaram o córtex cerebral em 96 pacientes com HPE clássica, com especial atenção a FS. A FS, um grande sulco lateral que separa os lobos frontais e parietais dos lobos temporais, foi usada como referência para criar um Linha Silviana. Essa linha imaginária, tangencial ao desenho da FS, foi traçada com origem em dois pontos: porção mais anterior e a mais posterior da margem mais

interna do córtex da insula, região que margeia internamente a porção medial FS. O prolongamento das Linhas Silvianas na porção anterior do cérebro formará um ângulo, que os autores definiram como Ângulo Silviano (Figura 7).

Fonte: BARKOVICH et al., 2002.

Nota: O ângulo resultante do encontro das Linhas Silvianas na porção anterior resulta no Ângulo Silviano.

Figura 7 - Imagem de RM em corte axial mostrando as Linhas Silvianas tangenciando as FS ao nível do gânglio basal

Os autores encontraram uma correlação positiva entre o Ângulo Silviano e a gravidade anatômica da HPE, resultante de uma diminuição da quantidade de lobo frontal anterior às FS. Os autores também definiram como normal um Ângulo Silviano variando de 12° a 18°, e sugerem que a classificação da gravidade da HPE estaria melhor representada pela medida do Ângulo Silviano em relação à classificação proposta por DeMyer (BARKOVICH et al., 2002). Este ângulo poderia contribuir para quantificar o desenvolvimento da massa cerebral do lobo frontal (KINSMAN, 2004).

Nos indivíduos com HPE, o padrão dos giros do cérebro posterior é mais próximo do padrão de giro normal, quando comparado ao cérebro anterior. As anormalidades dos giros cerebrais estão presentes nas formas mais graves. Nos indivíduos com formas mais leves de HPE, estas anomalias podem acometer a porção do córtex frontal medial, levando à incompleta indução das estruturas do telencéfalo mais rostral. A falta de formação de mesênquima interhemisférico prejudicaria o

desenvolvimento cortical, e a falta de formação dos caminhos dos axônios rostrais prejudicaria a sulcação. Como consequência da formação inadequada dos giros, o cérebro ficaria microcefálico (BARKOVICH et al., 2002).

A classificação das três formas clássicas tem como base a presença ou ausência das fissuras interhemisféricas, assim como sua extensão (GOLDEN, 1999).

Na HPE Alobar (Quadro 4), os hemisférios cerebrais aparecem completamente unidos com o parênquima cerebral em toda a linha média. Existe um único hemisfério cerebral (Holosfera) e, ao invés dos Ventrículos Laterais, forma-se um monoventrículo, sem os cornos temporais ou frontais distintos que, frequentemente, se comunica com um cisto dorsal. A fissura interhemisférica, a foixe cerebral, o Corpo Caloso, o Septo Pelúcido e os Bulbos e Trato Olfatórios estão ausentes. Os Gânglios da Base, o Hipotálamo e os Núcleos Talâmicos estão anormalmente fundidos ou ausentes e o Terceiro Ventrículo está ausente ou eventualmente pequeno. Quando presente, a substância cinzenta profunda está pobremente diferenciada. As artérias cerebrais anteriores são completamente anômalas (Figura 8) (HAHN; BARNES, 2010; YANG; CHU; LEE, 2017). O tronco cerebral e o cerebelo podem ser grosseiramente normais (GOLDEN, 1999). Nesta forma mais grave de apresentação da HPE, geralmente observa-se microcefalia, mas quando um grande cisto dorsal está presente, pode desenvolver macrocefalia (HAHN; BARNES, 2010).

Na HPE Semilobar (Quadro 4), os hemisférios anteriores também estão unidos, mas ocorre separação parcial dos hemisférios posteriores. Os Ventrículos Laterais estão parcialmente formados, somente com os cornos temporais presentes. O Septo Pelúcido está ausente. O Corpo Caloso é rudimentar, com ausência da porção anterior, variando consoante a formação da fissura interhemisférica. Os núcleos da substância cinzenta profunda estão parcialmente separados, sendo o Núcleo Caudado um dos mais acometidos, com formação de um Terceiro Ventrículo pequeno. Em alguns casos o cisto dorsal pode estar presente, geralmente associado à não separação dos núcleos talâmicos e, os Bulbos Olfatórios estão ausentes ou hipoplásicos (Figura 9). Este grupo de pacientes também podem apresentar micro ou macrocefalia (HAHN; BARNES, 2010; YANG; CHU; LEE, 2017).

ESTRUTURA ENCEFÁLICA	HPE ALOBAR	HPE SEMILOBAR	HPE LOBAR	HPE IHM	HPE SPO
Não separação cortical	Difusa (Holosfera)	Frontal	Frontal basal	Frontal posterior e parietal	Região septal e pré-óptica
Corpo Caloso	Ausente	Rostro, genu e corpo ausente Esplênio presente	Rostro e genu ausente Corpo anterior variável Esplênio presente	Corpo ausente Genu variável Esplênio presente	Rostro ausente ou hipoplásico Genu hipoplásico Corpo e Esplênio presente
Fissura interhemisférica e foixe cerebral	Ausente anterior e posteriormente	Presente somente posteriormente	Hipoplásica anteriormente e presente posteriormente	Ausente na região frontal posterior e parietal	Presente anterior e posteriormente
Ventrículos	Monoventrículo comunicando com cisto dorsal	CA ausentes CP presente III ventrículo pequeno	CA rudimentares III ventrículo formado	CA normais ou hipoplásicos III ventrículo formado	CA normais ou hipoplásicos III ventrículo formado
Cisto dorsal	Geralmente presente	Variavelmente presente	Ausente	Presente em ¼ dos casos	Ausente
Septo Pelúcido	Ausente	Ausente	Ausente ou displásico	Ausente	Presente ou displásico, raramente ausente
Tálamo	Frequentemente fusionado	Fusão parcial	Geralmente separado	Fusionado em ⅓ a ½ dos casos	Separado
Gânglios da Base	Frequentemente fusionado (pode formar massa única com Tálamo)	Fusão parcial (especialmente cabeça do Núcleo Caudado)	Fusão em graus variáveis	Separados	Separados
Hipotálamo	Fusionado em algum grau (100%)	Fusão em algum grau muito frequente (98%)	Fusão em algum grau frequente (83%)	Separado	Frequente fusão da porção anterior
Fissuras Silvianas	Frequentemente ausente	Deslocada anterior e medialmente (alargada) lobo frontal fundido	Deslocada anterior e medialmente (alargada) lobos frontais pequenos	Muitas vezes, anormalmente conectado através da linha média sobre o vértice	Não descrito
Displasia cortical e substância cinzenta heterotópica	Frequentemente giros largos e difusos com poucos sulcos	Ocasionalmente giros largos com poucos sulcos	Raras heterotipias subcortical da linha média em regiões frontais	Muito comum	Não descrito
Vascularização cerebral	Rede de vasos que se ramificam das AC internas	ACA <i>azygous</i>	ACA <i>azygous</i>	ACA <i>azygous</i>	ACA <i>azygous</i> (localizada mais posterior)

Fonte: Modificado de Hahn e Barnes (2010); Hahn et al. (2010); Bulakbasi; Cancuri; Kocaoğlu (2016).

ACA= Artéria Cerebral Anterior; CA= Cornos Anteriores; CP= Cornos Posteriores; IHM= Interhemisférica Média.

Quadro 4 - Alterações de neuroimagens dos diferentes tipos de HPE

Fonte: HAHN; BARNES, 2010.

Nota: (A) Imagem Sagital-T1, MV= monoventrículo, DC= cisto dorsal; (B) Imagem Axial-T2, seta branca mostra o Núcleo Caudado e o Lentiforme não bem diferenciado; (C) Imagem Coronal-T2, seta preta aponta os núcleos talâmicos parcialmente fusionados.

Figura 8 - HPE Alobar. RM de recém-nascido com 5 dias

Fonte: HAHN; BARNES, 2010.

Nota: (A) Imagem Sagital-T1, ausência de genu e corpo do Corpo Caloso e presença de esplênio (cabeça de seta branca); (B) Imagem Axial-T2, ausência de FIH anteriormente, hemisférios cerebrais posteriores bem separados e cornos posteriores dos Ventriculos Laterais bem formados, mas cornos frontais ausentes, a cabeça do Núcleo Caudado não está separada e o Tálamo parcialmente separado, Terceiro Ventrículo anormal; (C) Imagem Coronal-T2 ao nível do Tálamo, mostra a fissura inter-hemisférica superficial (pontas de flechas pretas) e a fusão do córtex na linha média.

Figura 9 - HPE Semilobar. RM de criança com 7 meses

Na HPE Lobar (Quadro 4), os hemisférios cerebrais estão bem desenvolvidos, com os hemisférios posteriores separados e apenas os aspectos mais rostral e ventral do neocórtex frontal estão parcialmente separados. A fissura interhemisférica e a foixe cerebral estão presentes, mas rudimentar na porção não separada. O Corpo Caloso também está malformado, com o genu, o rostro e a porção anterior do corpo podendo estar ausentes. A porção posterior do corpo e o esplênio estão presentes. Os Ventriculos Laterais podem apresentar os cornos frontais rudimentares, mas o Terceiro Ventrículo é bem formado. Defeitos da migração neuronal são raros, sendo

as heterotopias raramente vistas. As estruturas da substância cinzenta profunda estão geralmente comprometidas, mas, os núcleos talâmicos estão totalmente separados. O cisto dorsal geralmente está ausente. O Trato e Bulbos Olfatórios podem estar presentes, mas são geralmente hipoplásicos (GOLDEN, 1999; HAHN; BARNES, 2010; YANG; CHU; LEE, 2017) (Figura 10).

Fonte: HAHN; BARNES, 2010.

Nota: (A) Imagem Sagital-T1, mostra a porção posterior do corpo e esplênio do Corpo Caloso (seta reta), mas com a ausência de genu e da porção anterior do corpo hipoplásica; (B) Imagem Axial-T2, com FIH anterior e posterior presente (seta reta) e substância cinzenta anormal, contínua através linha média anterior. (seta curva); (C) Imagem Coronal-T1, aponta a falha da completa separação do lobo frontal através da FIH (seta curva) e substância cinzenta na região frontal basal (seta reta).

Figura 10 - HPE Lobar. RM de criança com 19 meses

Por vezes, a classificação da HPE entre Lobar a Semilobar pode ser difícil, pois existe um contínuo de não separação dos hemisférios cerebrais. Se a fusão dos lobos frontais for menor que 50%, o Terceiro Ventrículo estiver bem desenvolvido, os cornos frontais dos Ventriculos Laterais e a metade posterior do Corpo Caloso (porção posterior do corpo e esplênio) estiverem presentes, estes achados favorecem o diagnóstico de HPE Lobar (HAHN; BARNES, 2010).

A HPE IHM ou Sintelencefalia (Figura 11), que tem como característica a predominância da fusão do cérebro anterior dorsal, compromete o lobo frontal posterior e o lobo parietal. A região encefálica basal anterior, o lobo frontal anterior e o lobo occipital são bem separados. O Corpo Caloso está presente, mas malformado. A porção central (corpo) é a mais comprometida, podendo até estar ausente em muitos casos. Na substância cinzenta profunda, o Tálamo é o mais comprometido, com separação incompleta. Os Bulbos e Trato Olfatórios podem ser hipoplásicos. Nos

indivíduos com a variante IHM, as fissuras Silvianas têm orientação mais verticalizada. Um cisto da linha média dorsal pode estar presente em alguns casos. Muitos pacientes apresentam heterotopia subcortical da massa cinzenta ou displasia cortical (Quadro 4) (HAHN; PINTER, 2002; HAHN; BARNES, 2010).

Fonte: HAHN; BARNES, 2010.

Nota: (A) Imagem Sagital-T2, indica a presença de genu e esplênio do Corpo Caloso (cabeça de seta branca) e o corpo do Corpo Caloso ausente (seta branca curva); (B) Imagem Coronal inversa, apresenta a continuidade da substância cinzenta (cabeça de seta preta), com heterotipias no assoalho do ventrículo lateral; (C) e (D) Imagem Axial-FLAIR; em (C), mostra a continuidade da substância cinzenta anterior ao genu do Corpo Caloso e a ausência de Septo Pelúcido. Em (D), indica as fissuras Silvianas deslocadas anteriormente, com substância cinzenta anormal, cruzando a linha média (seta reta).

Figura 11 - HPE IHM. RM de menina com 2 anos

Na variante Septopreóptica, as alterações anatômicas ficam restritas à fusão da área pré-óptica e região septal, que também são estruturas telencefálicas (Figura 12). O rostro do Corpo Caloso está ausente ou hipoplásico, o genu é hipoplásico e o corpo e o esplênio estão bem desenvolvidos. Os ventrículos estão bem formados, exceto os cornos frontais que podem ser hipoplásicos. O Hipotálamo geralmente está fusionado na porção anterior. O Septo Pelúcido pode ser normal ou hipoplásico, mas não há fusão neocortical significativa do lobo frontal (HAHN; BARNES, 2010; HAHN et al., 2010).

Fonte: HAHN et al., 2010.

CC= Corpo Caloso; SP= Septo Pelúcido; AC= Comissura Anterior; V3= Terceiro Ventriculo.

Figura 12 - Diagrama da vista sagital mediana do encéfalo mostra a localização das regiões septal e pré-óptica

Nos pacientes com as formas mais graves de HPE, com várias alterações anatômicas presentes nos exames de neuroimagens, o diagnóstico de HPE se torna evidente. Porém, nas formas mais leves de HPE, nem sempre os achados de neuroimagens são conclusivos. Alterações anatômicas no Trato e Bulbos Olfatórios, no Corpo Caloso e na Hipófise podem ser formas mínimas de HPE ou manifestações clínicas de outras patologias. A variante SPO e os quadros mais leves de HPE Lobar podem se encaixar nessa problemática.

Além disso, na complexidade patogênica da HPE, existe outro grupo de pacientes que dificulta ainda mais o diagnóstico, os pacientes com Microformas ou HPE *minor*. Neste contexto, colocamos uma questão essencial.

Nesta apresentação clínica, em que pacientes com alterações faciais menores como hipotelorismo, ICSU e FLP, ausência das alterações cerebrais (HAHN; BARNES, 2010), ou com alterações não típicas da HPE e DNPM normal (RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006), que achados de neuroimagens poderiam permitir ou excluir este diagnóstico?

Diante desta interrogação, realizamos a reavaliação retrospectiva, mais detalhada de neuroimagens de 31 pacientes com fenótipo de HPE *minor*, atendidos na SGCBM do HRAC-USP, durante um período de oito anos. Com este estudo

pretendemos contribuir significativamente com o conhecimento das neuroimagens neste grupo de pacientes, bem como, refinar a associação entre fenótipos e neuroimagens.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar possíveis anomalias estruturais (menores ou maiores), em neuroimagem indivíduos com fenótipo de HPE *minor*, que possam estar relacionadas com alterações no desenvolvimento embriológico do prosencéfalo, que resultam no espectro fenotípico das HPE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar novos subgrupos relacionados a HPE, cuja causa se mantém desconhecida.
- Refinar os fenótipos de HPE *minor*, procurando agrupá-los de acordo com a *gestalt* facial e os achados por neuroimagem.
- Propor, com esta seleção de amostra, substrato para a identificação de novos genes candidatos a HPE e HPE *minor*.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Realizamos um estudo retrospectivo, observacional e descritivo de exames de neuroimagens de indivíduos com “fenótipo de HPE *minor*” ou Microforma, atendidas no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), Bauru/SP, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HRAC-USP (CAAE n. 79798817.5.0000.5441) (Anexo A).

Foram selecionados indivíduos com diagnóstico clínico do “fenótipo de HPE *minor*”, de ambos os gêneros, de todas as faixas etárias, atendidos no período de janeiro de 1983 a dezembro de 2016, que apresentavam exames de ressonância magnética (RM) previamente realizados. O diagnóstico clínico foi realizado por geneticista clínico da Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular (SGCBM) do HRAC-USP.

O “fenótipo de HPE *minor*” foi definido como indivíduos que apresentavam pequenas anomalias da linha média da face, que podem compor o diagnóstico da HPE, mas sem as alterações encefálicas clássicas em neuroimagens. As alterações faciais se caracterizam por: da distância interocular (hipotelorismo ou hipertelorismo), dente incisivo central superior único (ICSU), fissuras de lábio e/ou palato (FLP) unilaterais, bilaterais ou medianas, anomalias do Septo Nasal (aplasia ou hipoplasia), ângulo frontonasal diminuído, hipoplasia da face média, perfil facial plano e hipoplasia malar. Estes indivíduos podem ainda apresentar microcefalia ou perímetro cefálico no limite inferior de normalidade.

Foram excluídos os indivíduos que não possuíam exames de RM de encéfalo ou apresentavam alterações de neuroimagens que confirmaram o diagnóstico das formas clássicas de HPE, ou com outras malformações associadas que pudessem caracterizar outra síndrome genética.

Foram selecionados os exames de RM que apresentavam no mínimo duas incidências, independente das técnicas utilizadas. Como os indivíduos avaliados são procedentes de diferentes cidades brasileiras, as neuroimagens foram obtidas em várias instituições, não sendo possível uma padronização entre os exames. As imagens de RM de encéfalo foram obtidas nas sequências comumente realizadas:

Axial, Coronal e Sagital, ponderadas em T1, T2, FLAIR ou GE (Gradiente-echo), sem uso de contraste, variando na espessura dos cortes e no número de imagens arquivadas.

Os exames de RM do encéfalo foram analisados, separadamente, por dois radiologistas com experiência na área de atuação, segundo um roteiro previamente elaborado (Apêndice A). O roteiro foi elaborado visando uma análise sistematizada e uniforme entre os radiologistas, com atenção mais detalhada nas estruturas da linha média, originárias do prosencéfalo. Todas as estruturas foram analisadas subjetivamente.

A fissura interhemisférica foi avaliada como “normal” quando os dois hemisférios estavam totalmente separados, ou “incompleta” quando se apresentava com imagens sugestivas de seguimentos de separação anormal do córtex ou da foice cerebral. Os ventrículos foram definidos como “normal”, quando de tamanho e formato adequados, ou com “separação incompleta”, quando malformados.

O Corpo Caloso foi avaliado como “normal” quando de tamanho e formato adequados, “ausente” quando não visualizado, e “malformado” quando se apresentava hipoplásico ou com agenesia parcial, sendo descrita a malformação presente.

Os Núcleos da Base (Núcleo Caudado, Putamen e Globo Pálido) e o Tálamo e Hipotálamo foram analisados como “normal”, quando de tamanho e formato adequados, ou com “separação incompleta” quando permaneciam parcialmente unidos.

Quando possível, a Hipófise foi avaliada na sua porção anterior (Adenoipófise) e posterior (Neuroipófise). A Adenoipófise foi descrita como “normal” quando de tamanho e formato adequados, ou de “tamanho reduzido”. A Neuroipófise como “normal” quando visualizada em sua localização habitual, “ectópica” quando visualizada em posição anômala, ou “ausente” quando não visualizada podendo, eventualmente, estar normal ou ectópica e não ter sido visualizada por não apresentar sequências adequadas.

As Vias Pré-Ópticas (nervos e quiasma óptico) foram descritas como “normais” quando visualizadas de tamanho adequados, ou “hipoplásicas” quando de tamanho reduzido. O Septo Pelúcido foi descrito como “normal” quando presente no formato adequados, ou “ausente” quando não visualizado.

O Volume Encefálico foi avaliado como “normal” quando o tamanho foi adequado para idade, ou “desproporcional à faixa etária” quando de tamanho foi inadequado para a idade em que o indivíduo realizou a RM. A Região Cortical do encéfalo, o Tronco e o Mesencéfalo foram descritos como “normais” quando de tamanho e formato adequados, ou foi descrita alguma alteração quando presente.

Além das descrições acima referidas para cada estrutura analisada, a presença de outras anormalidades foi descrita no item “Outras alterações”. Nas neuroimagens em que houve divergências entre os avaliadores, as duas avaliações foram descritas e posteriormente analisados de acordo com o quadro clínico e exames genéticos desses indivíduos. Quando as imagens não permitiram uma análise adequada de uma determinada estrutura, ela foi referida como “não avaliada”. Quando uma estrutura não pode ser avaliada pelos dois avaliadores, ela foi excluída para fins de cálculo de porcentagens.

Para verificar a concordância entre os avaliadores foi calculado o Coeficiente Kappa para cada estrutura analisada, considerando os resultados das avaliações como: “normal” quando o avaliador não encontrou alterações na estrutura, “alterado” quando o avaliador encontrou alguma alteração na estrutura, “não visualizado” quando o avaliador não localizou a estrutura, ou “não analisado” quando avaliador não disponha de imagens que permitissem a análise da estrutura. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

O Ângulo Silviano, definido como o ângulo resultante do prolongamento das Linhas Silvianas na porção anterior do cérebro, conforme descrito por Barkovich et al. (2002), foi medido pelo pesquisador. A medida do Ângulo Silviano foi calculada na sequência axial das neuroimagens, ponderadas em T1, ao nível dos núcleos da base em que fosse possível visualizar a margem mais interna do córtex da insula, a região que margeia internamente a porção medial fissura Silviana. Foi considerado “normal” um Ângulo Silviano variando de 12° a 18°, considerando um ângulo médio de 15°, com desvio padrão (DP) de 1,1° (BARKOVICH et al., 2002).

O fenótipo, a evolução clínica, os exames de cariótipo e as análises moleculares, previamente realizados, foram obtidos das anotações contidas no prontuário geral do HRAC-USP, no arquivo da SGCBM do HRAC-USP e no Laboratório de Citogenética Humana do HRAC-USP. Na avaliação fenotípica foram considerados o tipo de FLP, a graduação do ângulo nasofacial, a medida da distância

interocular interna (DICI), o Septo Nasal normal ou hipoplásico, Hipoplasia da face média e Perfil Plano da face.

A FLP foi descrita como fissura de lábio com ou sem fissura palatina (FL/P), quando o indivíduo apresentava fissura labial (FL), com ou sem fissura palatina, uni ou bilateral; fissura palatina (FP), quando apresentava apenas fissura do palato; e com fissura de lábio com ou sem fissura palatina mediana (FL/P M), quando a fissura de lábio, com ou sem FP, foi mediana.

O Ângulo Nasofacial, usado para avaliar a inclinação do dorso nasal, foi medido entre o plano da face e o dorso nasal. A medida foi realizada pelo pesquisador utilizando os registros fotográficos da face, em perfil, de cada indivíduo. Foi considerado Ângulo Nasofacial diminuído quando os valores foram menores de 36° para os homens e 34° para as mulheres (FURTADO, 2016). A DICI, quando descrita, foi previamente medida pelo geneticista clínico da SGCBM do HRAC-USP e apresentada em percentil (P).

Foi considerado hipotelorismo quando a DICI foi igual ou menor ao P3, e hipertelorismo quando maior ou igual ao P97. Quando a DICI não foi medida, foi considerada a descrição clínica de “hipotelorismo” ou “hipertelorismo”, quando referida no prontuário geral do HRAC-USP, ou no arquivo da SGCBM do HRAC-USP.

O Septo Nasal foi considerado “normal”, ou “hipoplásico” quando de tamanho reduzido. Hipoplasia da face média e perfil plano da face foi considerado presente ou ausente. Estas avaliações foram realizadas com base nas anotações obtidas dos prontuários e da análise dos registros fotográficos da face de cada indivíduo.

Na evolução clínica foram consideradas avaliações descritas por pediatras, geneticista ou psicólogos, referentes à idade gestacional, peso, estatura e perímetro cefálico ao nascimento, idade do pai e da mãe ao nascimento do probando, DNPM e aprendizagem escolar. O DNPM foi referido como “normal” ou “atrasado”, e o rendimento escolar como “normal” ou “baixo”, conforme registros nos prontuários geral do HRAC-USP ou no arquivo da SGCBM do HRAC-USP.

Os exames de cariótipo foram realizados no Laboratório de Citogenética Humana do HRAC-USP, a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico, cultivados em meios 199 e RPMI 1640 suplementados com 20% de soro fetal bovino.

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Citogenética Humana do HRAC-USP. Em 24 indivíduos foi realizada análise molecular por Sequenciamento Direto dos genes *SHH*, *SIX3*, *TGIF*, *ZIC2*, *PTCH1*, *GLI2*, *GAS1*. Em três indivíduos foi realizada análise molecular por Sequenciamento Direto dos genes *SHH*, *SIX3*, *TGIF*, *GLI2*. Em três indivíduos foi realizada MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Em dois deles foi utilizado o kit P187-B1 Holoprosencefaly (MRC-Holland) contendo sonda para análise dos genes: *GLI2* (Éxons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), *SHH* (Éxons 1, 2, 3), *FBXW11* (Éxons 2, 8, 14), *SIX2* (Éxons 1 e 2), *SIX3* (Éxons 1 e 2), *TGIF1* (Éxons 3, 6, 8, 9), *ZIC2* (Éxons 1 e 3), *TRAPPC10/TMEM1* (Éxons 3, 7, 21), *PTCH1* (Éxons 16). Em um indivíduo foi utilizado o kit SALSA MLPA KIT P070-B2 Human-telomere-5, para análise das regiões subteloméricas.

As alterações encontradas nos exames de RM do encéfalo, os achados fenótipos dos indivíduos, o cariótipo e as variantes patogênicas encontradas foram apresentados de forma descritiva e consolidados por meio de seus percentuais. Pela limitação do tamanho da amostra não foi possível uma análise inferencial da associação entre os dados analisados.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Foram identificados 64 indivíduos com fenótipo de HPE *minor* atendidos por geneticista clínico da SGCBM do HRAC-USP, no período de janeiro de 1983 a dezembro de 2016. Deste total, 35 indivíduos tinham exames de neuroimagens, sendo dois com tomografia computadorizada (TC) e 33 com de RM arquivados no HRAC-USP. Entre os 33 indivíduos com RM de encéfalo, um indivíduo apresentava neuroimagens somente com incidência axial, um indivíduo apresentava neuroimagens que confirmavam o diagnóstico de HPE Lobar e, ambos, foram excluídos. Deste modo, a amostra final ficou composta por 31 indivíduos.

Dos 31 indivíduos selecionados, 17 apresentavam exames de RM de encéfalo com incidências sagital, axial e coronal, 13 com incidência sagital e axial, um com incidência axial e coronal (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE *minor*, segundo as incidências (sagital, axial ou coronal) dos exames de RM do encéfalo

Incidência	Indivíduo	Total	%
Sagital, Axial e Coronal	1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 18, 20, 23, 24, 25, 28, 29 e 31	17	54,8%
Sagital e Axial	3, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 26 e 30	13	42%
Axial e Coronal	27	1	3,2%

Quanto ao gênero, a amostra foi composta por 11 indivíduos masculinos (35,5%) e 20 femininos (64,5%). As idades em que os exames de RM foram realizados variaram de 3 meses a 28 anos e 9 meses (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE *minor*, segundo a idade em que foi realizado o exame de RM do encéfalo

Idade	Indivíduo	Total	%
< 1 ano	30	1	3,2%
≤ 1 ano > 5 anos	15, 16, 18, 25, 27, 28, 29, 31	8	25,8%
≤ 5 anos > 10 anos	7, 13, 14, 17, 19, 23, 24	7	22,6%
≤ 10 anos > 15 anos	1, 5, 6, 12, 20	5	16,2%
≤ 15 anos > 20 anos	2	1	3,2%
≤ 20 anos	3, 4	2	6,4%
Não descrito	8, 9, 10, 11, 21, 22, 26	7	22,6%

Exame de cariótipo foi descrito em 14 indivíduos (45,2%). Um indivíduo feminino apresentou cariótipo 46,XX,t(9;12)(q34;q24), caracterizando uma cromossomopatia, e os demais indivíduos analisados não apresentaram alterações cromossômicas (Tabela 3).

A análise molecular por sequenciamento direto foi descrita em 27 indivíduos (87,1%). Em 24 indivíduos foram analisados sete genes (*SHH*, *SIX3*, *TGIF*, *ZIC2*, *PTCH1*, *GLI2*, *GAS1*) e, em três indivíduos, foram analisados quatro genes (*SHH*, *SIX3*, *TGIF*, *GLI2*). Foram identificados oito indivíduos portadores de mutação (29,6% dos indivíduos analisados). As mutações foram identificadas no gene *SHH*, em cinco indivíduos, e no gene *GLI2*, em três indivíduos. Em dois indivíduos, os pais também foram portadores da mesma mutação (Tabela 4).

Tabela 3 - Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE *minor*, segundo o resultado dos exames de cariótipo

Cariótipo	Indivíduo	Total	%
46,XY, sem anormalidades estruturais ou numéricas	1, 10, 22, 29	4	28,6%
46,XX, sem anormalidades estruturais ou numéricas	2, 14, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 30	9	64,3%
46,XX,t(9;12)(q34;q24)	18	1	7,1%
Não realizado	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 24, 31	17	*

*Os indivíduos que não realizaram exames de cariótipo, não foram incluídos no cálculo das porcentagens.

Tabela 4 - Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE *minor*, segundo a análise molecular por sequenciamento direto

Análise molecular por sequenciamento direto	Indivíduo	Total	%	Pai com mutação
Genes <i>SHH</i> , <i>SIX3</i> , <i>TGIF</i> , <i>GLI2</i> , sem mutações identificadas	5, 17, 18	3	11,1%	N
Genes <i>SHH</i> , <i>SIX3</i> , <i>TGIF</i> , <i>ZIC2</i> , <i>PTCH1</i> , <i>GLI2</i> , <i>GAS1</i> , sem mutações identificadas	1, 3, 6, 8, 12, 13, 15, 19, 21, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 31	16	59,3%	N
Gene <i>SHH</i> (Ser208Stop)	20	1	3,7%	N
Gene <i>SHH</i> (Leu218Pro)	16	1	3,7%	S
Gene <i>SHH</i> (Cys363Tyr)	11	1	3,7%	N
Gene <i>SHH</i> (Cys198Tyr)	4, 10	2	7,4%	N
Gene <i>GLI2</i> (Pro1226Ile)	25	1	3,7%	N
Gene <i>GLI2</i> (Met1226Ile)	2, 7	2	7,4%	S
Não realizado	9, 14, 26, 27	4	*	-

*Indivíduos que não realizaram exames de análise molecular não foram incluídos no cálculo das porcentagens.

N= sem mutação identificada nos pais ou pais não analisados; **S**= pai com a mesma mutação identificado no probando.

Em três indivíduos foi realizado exame molecular pela técnica de MLPA (indivíduo 10, 16 e 27) e não foram identificadas deleções e/ou duplicações nos genes pesquisados.

A idade paterna ao nascimento variou de 18 a 50 anos e a materna de 15 a 37 anos. Vinte e três indivíduos nasceram de gestação a termo (92%), dois de partos prematuros (8%) e em seis indivíduos não foi possível obter essa informação. O peso de nascimento foi adequado em 26 indivíduos (89,6%), dois apresentaram baixo peso ao nascer (6,9%), um apresentou peso aumentado (3,5%) e em dois indivíduos essa informação não estava disponível. A estatura ao nascimento foi adequada para idade gestacional em 14 indivíduos (66,7%), sete foram pequenos para idade gestacional (33,3%) e em 10 indivíduos não foi possível obter esse dado. O perímetro cefálico (PC) ao nascimento foi obtido em quatro indivíduos, sendo três com microcefalia (75%) e um com valores dentro da normalidade (25%) (Tabela 5, 6 e 7).

Todos os indivíduos tinham FLP como parte do seu fenótipo, sendo que, 26 indivíduos (83,8%) eram portadores de FL/P, um indivíduo (3,2%) com FP e quatro indivíduos (13%) com FL/P M. O Ângulo Nasofacial foi menor que 36° em todos os indivíduos masculinos e menor que 34° em todos os femininos. Nos masculinos a média do Ângulo Nasofacial foi 17°, variando de 12° a 23° e, nos femininos, a média foi de 19°, variando de 11° a 31° (Tabela 5, 6 e 7).

A DICI foi identificada em 24 indivíduos: oito indivíduos (33,3%) apresentando hipotelorismo (valores $\leq$ P3), e outros oito indivíduos (33,3%) com valores da DICI entre o P3 e o P25, com aparente hipotelorismo. Entre os sete indivíduos nos quais não foi encontrado o registro de DICI, em um havia o registro de “hipotelorismo” e em dois o registro de “hipertelorismo” (Tabela 5, 6 e 7).

Em 26 indivíduos (81,9%) o Septo Nasal foi hipoplásico, em 22 indivíduos (71%) havia hipoplasia da face média, em 24 indivíduos (77,4%) havia hipoplasia malar e 29 indivíduos (93,5%) apresentavam o perfil plano. Dezenove indivíduos (65,5%) apresentavam microcefalia, em quatro (13,8%) o perímetro cefálico (PC) estava entre o P3 e o P50, em seis (20,7%) o PC estava no P50, e em dois indivíduos não foi possível obter essa informação (Tabela 5, 6 e 7).

O DNPM foi referido como normal em 21 indivíduos (77,8%), atrasado em seis (22,2%) e em quatro indivíduos não foi possível obter essa informação. O rendimento

escolar foi registrado como normal em 16 indivíduos (64%), baixo em nove (36%) e em seis não foi possível obter essa informação (Tabela 5, 6 e 7).

Dos 31 indivíduos avaliados, seis (19,4%) referiam parentes com ICSU e sete (22,6%) referiram parentes com FLP. Também foram referidos parentes com incisivos centrais tortos, crânio pequeno, malformações cardíacas e genitais, como descritas na Tabela 5, 6 e 7.

Os exames de neuroimagens dos indivíduos com fenótipo de HPE *minor* foram analisadas por dois radiologistas com experiência na área. A concordância entre as análises dos dois radiologistas, calculada pelo coeficiente Kappa, mostra que eles diferiram em relação a algumas estruturas encefálicas. A concordância foi menor que 90% na análise da fissura interhemisférica, região do Tálamo e Hipotálamo, das Vias Pré-Ópticas e da Região Cortical. Houve 100% de concordância em relação aos Ventrículos e ao Volume Encefálico (Tabela 8).

Tabela 5 - Achados clínicos dos indivíduos 1 a 11, com fenótipo de HPE *minor*

Indivíduo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Gênero	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Masculino
Idade pai	36 anos	?	30 anos	?	21 anos	?	22 anos	?	?	50 anos	?
Idade mãe	35 anos	?	20 anos	?	22 anos	?	18 anos	?	?	38 anos	?
IG	8 meses	Termo	Termo	Termo	Termo	Termo	Termo	?	?	Termo	?
PN	2.850 g	4.580 g	2.950 g	?	3.200 g	2.930 g	2.950 g	3.200 g	3.750 g	2.950 g	2.850 g
EN	?	49,5 cm	45,5 cm	?	45 cm	51 cm	49 cm	45 cm	51cm	45,5 cm	48,5 cm
PC	?	?	?	?	?	?	?	32 cm	?	32,5 cm	?
Tipo de FLP	FL/P	FL/P	FL/P M	FL/P	FL/P M	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P
ANF (graus)	23°	20°	12°	17°	15°	12°	21°	19°	25°	22°	12°
DICI	P25-P50	P3-P25	P50	P3	P3-P25	P3-P25	?	P25-P50	<P3	<P3	P3-P25
SN hipoplásico	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
FM hipoplásica	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Perfil plano	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Microcefalia	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim
Hipoplasia malar	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
DNPM	Atrasado	Normal	Normal	Normal	Normal	?	?	Normal	Normal	Normal	Normal
Rendimento escolar	Baixo	?	Normal	Baixo	Normal	Normal	Normal	Normal	Baixo	Baixo	Baixo
Parente afetado	Não	Pai ICSU e convulsões	Não	Não	Mãe ICSU	Mãe ICSU	Não	?	?	Não	?

ANF= Ângulo Nasofacial; **DICI**= distância interocular interna; **DNPM**= desenvolvimento neuropsicomotor; **EN**= estatura ao nascimento; **FL/P M**= fissura de lábio com ou sem fissura palatina mediana; **FL/P**= fissura de lábio com ou sem fissura palatina; **FM**= face média; **ICSU**= incisivo central superior único; **IG**= idade gestacional; **P**= percentil; **PN**= peso ao nascimento; **SN**= Septo Nasal.

Tabela 6 - Achados clínicos dos indivíduos 12 a 21, com fenótipo de HPE *minor*

Indivíduo	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Gênero	Masculino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino
Idade pai	37 anos	22 anos	27 anos	33 anos	30 anos	17 anos	25 anos	42 anos	?	24 anos
Idade mãe	31 anos	20 anos	27 anos	32 anos	35 anos	18 anos	15 anos	29 anos	?	29 anos
IG	Termo	Termo	Termo	Termo	Termo	Termo	Termo	?	Termo	Termo
PN	?	2.770 g	3.500 g	3.750 g	2.900 g	3.100 g	2.800 g	2.960 g	3.500 g	2.595 g
EN	?	?	?	49,5 cm	45 cm	49 cm	47 cm	47 cm	48 cm	45 cm
PC	?	?	?	?	?	34 cm	?	?	?	31,5 cm
Tipo de FLP	FL/P	FL/P	FL/P M	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P
ANF (graus)	17°	15°	14°	19°	25°	27°	15°	19°	22°	24°
DICI	Hipotelorismo	?	P25-P50	P3-P25	<P3	P3-P25	Hipertelorismo	?	P3-P25	Hipotelorismo
SN hipoplásico	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não
FM hipoplásica	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Perfil plano	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Microcefalia	?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	?	Sim	Sim
Hipoplasia malar	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
DNPM	Normal	Atrasado	Atrasado	Normal	?	Normal	Atrasado	Normal	Normal	Normal
Rend. escolar	?	?	Baixo	Normal	Baixo	Normal	Baixo	Normal	?	Normal
Parente afetado	Primo materno FLP	Não	Primo da mãe FL	Pai ICSU, Primos FLP	Pai ICSU e crânio pequeno	Mãe crânio pequeno, Primo FP	Primo do pai FLP	?	Não	Não

ANF= Ângulo Nasofacial; **DICI**= distância interocular interna; **DNPM**= desenvolvimento neuropsicomotor; **EN**= estatura ao nascimento; **FL/P M**= fissura de lábio com ou sem fissura palatina mediana; **FL/P**= fissura de lábio com ou sem fissura palatina; **FLP**= fissura labiopalatina; **FM**= face média; **ICSU**= incisivo central superior único; **IG**= idade gestacional; **P**= percentil; **PN**= peso ao nascimento; **SN**= Septo Nasal.

Tabela 7 - Achados clínicos dos indivíduos 22 a 31, com fenótipo de HPE *minor*

Indivíduo	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Gênero	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino
Idade pai	18 anos	21 anos	36 anos	?	20 anos	40 anos	32 anos	24 anos	29 anos	34 anos
Idade mãe	19 anos	17 anos	24 anos	?	15 anos	26 anos	26 anos	24 anos	22 anos	32 anos
IG	Termo	Termo	Termo	Termo	Termo	?	Termo	Termo	33 sem	?
PN	2.480 g	2.870 g	3.150 g	2.850 g	2.750 g	2.180 g	3.280 g	3.910 g	1.860 g	4.250 g
EN	?	?	47 cm	?	50 cm	?	48 cm	51 cm	40 cm	?
PC	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Tipo de FLP	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P	FL/P	FP	FL/P	FL/P	FL/P M	FL/P
ANF (graus)	13°	15°	15°	22°	22°	12°	17°	19°	11°	31°
DICI	Hipertelorismo	P25-P50	P3	P3-P25	P25-P50	P25	<P3	P50-P75	<P3	<P3
SN hipoplásico	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
FM hipoplásica	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Perfil plano	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Microcefalia	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
Hipoplasia malar	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
DNPM	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Atrasado	Normal	Atrasado	?	Normal
Rend. escolar	Normal	Normal	Normal	?	Normal	?	Normal	Baixo	Normal	Normal
Parente afetado	Não	Não	Prima FLP	Não	Primos ICSU	Não	Não	Não	Irmão FLP, malformação cardíaca e genital	Mãe estrabismo Irmão IC tortos

ANF= Ângulo Nasofacial; **DICI**= distância interocular interna; **DNPM**= desenvolvimento neuropsicomotor; **EN**= estatura ao nascimento; **FL/P M**= fissura de lábio com ou sem fissura palatina mediana; **FL/P**= fissura de lábio com ou sem fissura palatina; **FLP**= fissura labiopalatina; **FM**= face média; **IC**= incisivos centrais; **ICSU**= incisivo central superior único; **IG**= idade gestacional; **P**= percentil; **PN**= peso ao nascimento; **SN**= Septo Nasal.

Tabela 8 - Concordância entre os avaliadores 1 e 2, com relação às alterações encontradas nas diferentes estruturas encefálicas, em indivíduos com fenótipo de HPE *minor*, segundo o percentual de concordância e o coeficiente Kappa

Estrutura encefálica	%	Coeficiente Kappa	<i>p</i>
Fissura interhemisférica	87,1%	0,53	<i>p</i> < 0,001
Ventrículos	100%	1,00	<i>p</i> < 0,001
Corpo Caloso	96,77%	0,86	<i>p</i> = 0,001
Núcleo Caudado	93,55%	0,63	<i>p</i> < 0,001
Núcleo Putamen	96,77%	0,78	<i>p</i> < 0,001
Núcleo Globo Pálido	96,77%	0,78	<i>p</i> < 0,001
Tálamo/Hipotálamo	67,74%	0,18	<i>p</i> = 0,003
Adenoipófise	93,55%	0,85	<i>p</i> < 0,001
Neuroipófise	90,32%	0,80	<i>p</i> < 0,001
Vias Pré-Ópticas	80,65%	0,59	<i>p</i> = 0,001
Septo Pelúcido	96,77%	0,88	<i>p</i> < 0,001
Volume Encefálico	100%	*	*
Região Cortical	87,10%	0,00	<i>p</i> = 1,0
Tronco e Mesencéfalo	96,77%	0,00	<i>p</i> = 1,0

* Não foi possível calcular o coeficiente Kappa por ter sido descrito somente uma categoria.

O Ângulo Silviano foi possível de ser medido em 27 indivíduos. A média dos Ângulos Silvianos foi de 14°, variando de 7° a 23°. Dezesete indivíduos apresentavam valores considerados normais, variando de 12° a 18°, sete indivíduos apresentavam valores menores que 12° (-2 DP) e três apresentavam valores maiores que 18° (+2 DP) (Tabela 9, 10 e 11).

Tabela 9 - Distribuição dos indivíduos com fenótipo de HPE *minor*, segundo o valor do Ângulo Silviano

Ângulo Silviano	Paciente	Total	%
< 12° (< 2 DP)	8, 9, 10, 14, 20, 21, 25	7	25,9%
12° a 18° (normal)	1, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 15, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 30, 31	17	63%
>18° (> 2 DP)	2, 13, 18	3	11,1%
Não medido	11, 26, 28, 29	4	*

* Os indivíduos em que não foi possível medir o Ângulo Silviano não foram incluídos no cálculo das porcentagens.

Tabela 10 - Valor do Ângulo Silviano dos indivíduos 1 a 16, com fenótipo de HPE *minor*

Indivíduo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ângulo Silviano (graus)	14°	19°	13°	13°	13°	12°	15°	7°	11°	10°	*	17°	23°	10°	15°	16°

* Não foi possível medir o Ângulo Silviano.

Tabela 11 - Valor do Ângulo Silviano dos indivíduos 17 a 31, com fenótipo de HPE *minor*

Indivíduo	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Ângulo Silviano (graus)	15°	20°	13°	11°	10°	12°	13°	12°	11°	*	12°	*	*	12°	17°

* Não foi possível medir o Ângulo Silviano.

O avaliador 1 descreveu 13 indivíduos com malformações em alguma das estruturas avaliadas (indivíduo 1, 2, 4, 6, 7, 10, 13, 18, 25, 27, 28, 29 e 30). As malformações foram observadas em fissura interhemisférica, Ventrículos, Corpo Caloso, Núcleos da Base, região de Tálamo e Hipotálamo, Adenoipófise, Neuroipófise e Septo Pelúcido e Região Cortical (Tabela 12). O Ângulo Silviano foi avaliado em 11 destes indivíduos e foi normal em seis, aumentado em três e diminuído em dois indivíduos. As malformações descritas estavam presentes em 35,3% dos indivíduos com Ângulo Silviano normal, em 28,5% dos indivíduos com Ângulo Silviano menor que 12°, e 100% dos indivíduos com Ângulo Silviano maior que 18° (Tabela 13).

O avaliador 2 descreveu 10 indivíduos com malformações em alguma das estruturas avaliadas (indivíduo 2, 6, 10, 13, 18, 25, 27, 28, 29 e 30). As malformações foram observadas em Ventrículos, Corpo Caloso, Núcleos da Base, região de Tálamo e Hipotálamo, Adenoipófise, Neuroipófise, Vias Pré-Ópticas e Septo Pelúcido (Tabela 12). Não foram relatados indivíduos com alterações em fissura interhemisférica ou Região Cortical. O Ângulo Silviano foi medido em oito destes indivíduos e foi normal em três, aumentado em três e diminuído em dois indivíduos. As malformações descritas estavam presentes em 17,7% dos indivíduos com Ângulo Silviano normal, em 28,6% dos indivíduos com Ângulo Silviano menor que 12°, e 100% dos indivíduos com Ângulo Silviano maior que 18° (Tabela 14).

Tabela 12 - Indivíduos com fenótipo de HPE *minor* com alterações nas diferentes estruturas encefálicas, segundo a análise de cada avaliador

Estrutura encefálica		Avaliador 1		Avaliador 2	
		Total	%	Total	%
Fissura interhemisférica	Normal	26	96,3%	26	100%
	Incompleta	1	3,7%	0	0%
	Não avaliada	4	*	5	*
Ventrículos	Normal	27	87,1%	27	87,1%
	Malformados	4	12,9%	4	12,9%
Corpo Caloso	Normal	27	90%	27	87,1%
	Malformado	3	10%	4	12,9%
	Não avaliado	1	*	0	*
Núcleo Caudado	Normal	28	90,3%	28	90,3%
	Clivagem anormal	3	9,7%	2	6,5%
	Tamanho reduzido	0	0%	1	3,2%
Núcleo Putamen e Núcleo Globo Pálido	Normal	29	93,5%	28	90,3%
	Clivagem anormal	2	6,5%	2	6,5%
	Tamanho reduzido	0	0%	1	3,2%
Tálamo/Hipotálamo	Normal	29	93,5%	20	95,2%
	Clivagem anormal	2	6,5%	1	4,8%
	Não avaliado	0	*	10	*
Adenoipófise	Normal	21	75%	23	76,7%
	Tamanho reduzido	6	21,4%	6	20%
	Macroadenoma	1	3,6%	1	3,3%
	Não avaliada	3	*	1	*
Neuroipófise	Normal	21	77,8%	21	75%
	Ectópica	1	3,7%	0	0%
	Não visualizada	5	18,5%	7	25%
	Não avaliada	4	*	3	*
Vias Pré-Ópticas	Normal	20	100%	20	95,2%
	Hipoplásticas	0	0%	1	4,8%
	Não avaliada	11	*	10	*
Septo Pelúcido (SP)	normal	27	90%	26	89,6%
	Ausente	2	6,7%	2	7%
	SP Vergae	1	3,3%	1	3,4%
	Não avaliado	1	*	2	*
Volume Encefálico	Normal	31	100%	31	100%
Região Cortical	normal	27	66,6%	31	100%
	Displasia cortical	3	26,7%	0	0%
	Não avaliada	1	*	0	*
Tronco e Mesencéfalo	Normal	30	100%	31	100%
	Não avaliado	1	*	0	*

* Quando a estrutura encefálica foi considerada como "não avaliada", o indivíduo não foi incluído no cálculo das percentagens.

Tabela 13 - Indivíduos com fenótipo de HPE *minor* e presença de malformações nas estruturas encefálicas de acordo com o Ângulo Silviano apresentado, segundo o avaliador 1

AS	Sem MFE	%	Com MFE	%	Total
< 12°	5	71,4%	2	28,6%	7
12° a 18°	11	64,7%	6	35,3%	17
> 18°	0	0%	3	100%	3
NA	2	*	2	*	4

* Quando não foi possível avaliar o AS o indivíduo não foi incluído no cálculo das porcentagens.

AS= Ângulo Silviano; MFE= malformação encefálica.

Tabela 14 - Indivíduos com fenótipo de HPE *minor* e presença de malformações nas estruturas encefálicas, de acordo com o Ângulo Silviano apresentado, segundo o avaliador 2

AS	Sem MFE	%	Com MFE	%	Total
< 12°	5	71,4%	2	28,6%	7
12° a 18°	14	82,3%	3	17,7%	17
> 18°	0	0%	3	100%	3
NA	2	*	2	*	4

* Quando não foi possível avaliar o AS o indivíduo não foi incluído no cálculo das porcentagens.

AS= Ângulo Silviano; MFE= malformação encefálica.

O resumo das alterações encontradas nas estruturas encefálicas, em cada indivíduo, segundo a análise de cada avaliador, está descrito no Apêndice B, exceto a descrição do Volume Encefálico e do Tronco e Mesencéfalo, que foram descritos como normais, em todos os indivíduos. A descrição resumida do quadro clínico, dos exames genéticos e das neuroimagens, apresentados por cada indivíduo, estão descritos no Apêndice C.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os indivíduos analisados apresentam características faciais semelhantes. Perfil plano, hipotelorismo, hipoplasia malar, hipoplasia do Septo Nasal e microcefalia estavam presentes na maioria dos indivíduos. Somente dois pacientes apresentaram hipertelorismo. O Ângulo Nasofacial reduzido em todos os pacientes contribuiu, na quase totalidade dos casos, para um perfil plano. Os dois indivíduos que não apresentavam perfil plano, apresentavam hipotelorismo, resultando em face característica de HPE. As alterações observadas nestes parâmetros são importantes, não apenas por serem indicativas do fenótipo estudado, mas também para o planejamento de intervenções corretivas que venham a ser utilizadas durante o processo de reabilitação (NAINI et al., 2016).

A FLP foi uma característica comum a todos. A fissura mediana, a mais frequente na HPE (SOLOMON; GROPMAN; MUENKE, 2000; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2010; BOUTRAY et al., 2016), esteve presente em apenas quatro indivíduos (12,9%), sendo dois femininos e dois masculinos. A FP estava presente somente em um indivíduo feminino. Estes dados mostram a necessidade de um exame clínico cuidadoso da face de indivíduos com todos os tipos de FLP, buscando, principalmente, encontrar hipoplasia das estruturas da face média. A presença de hipotelorismo e perfil plano, associado a qualquer tipo de FLP, deve levantar a suspeita diagnóstica de uma forma mais leve de HPE e a investigação diagnóstica deve ser realizada.

A alta frequência de indivíduos com FLP na amostra reflete um viés natural referente à natureza do Centro onde a amostra foi coletada. Não obstante, estas FLP são relatadas com frequência variável em outras famílias com o fenótipo *minor* (COLLINS et al., 1993; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO, 2006).

As FLP não sindrômicas são mais frequentes em meninos (MOSSEY; MODELL, 2012), enquanto a HPE, quando analisadas crianças nascidas vivas, predomina em meninas (CROEN; SHAW; LAMMER, 1996; ORIOLI; CASTILLA, 2007). Neste estudo, 64,5% dos indivíduos são femininos, o que sugere um padrão de incidência mais próximo das HPE.

Mais de 50% dos indivíduos avaliados realizaram os exames de RM do encéfalo após os 5 anos de idade, evidenciando o aspecto sutil das características faciais destes indivíduos que, provavelmente, em muitos desses casos, foram inicialmente classificados como FLP não síndrômica.

O DNPM mostrou-se variável, com alguns indivíduos apresentando atraso importante e outros apenas com dificuldades na aprendizagem escolar. A maioria dos indivíduos apresentou DNPM e rendimento escolar adequado (77,8% e 64%, respectivamente), e nenhum foi referido como superdotado. A hipótese de que alguns indivíduos com HPE possam apresentar alta função intelectual, como descrito por Solomon et al. (2012), parece pouco provável.

O maior prejuízo na aprendizagem escolar do que no DNPM sugere comprometimento do funcionamento de áreas corticais (SANTIAGO et al., 2006), que não foi possível avaliar nos exames de neuroimagens realizados. Com base nestes dados, observamos que nos indivíduos com FLP, com características faciais sugestivas de formas leves de HPE, o atraso no DNPM, ou baixo rendimento escolar, reforçam a suspeita diagnóstica. Porém, os indivíduos com DNPM e rendimento escolar adequado não devem ser excluídos da investigação diagnóstica, uma vez que, casos familiares mostram que as mutações encontradas são responsáveis por extensa heterogeneidade das manifestações clínicas presentes (PAULUSSEN et al., 2010).

O Ângulo Silviano esteve alterado em 10/27 dos indivíduos (37%). Em três indivíduos (11,1%), o Ângulo Silviano estava aumentado, com o maior ângulo medindo 23°. No estudo realizado por Barkovich et al. (2002), o Ângulo Silviano médio foi de 39°, em indivíduos com HPE Lobar, e ainda mais elevado nas formas mais graves de HPE, em decorrência de uma redução acentuada do Lobo Frontal. O aumento do Ângulo Silviano em menor grau pode representar um comprometimento do Lobo Frontal, porém em menor intensidade do que pode ser observado em formas mais graves. Estes três indivíduos, com Ângulo Silviano aumentado, também apresentavam alguma alteração encefálica, sendo que, um deles, apresentava diversas estruturas acometidas, podendo classifica-lo como HPE Lobar. Apesar de ser um número pequeno de indivíduos, o aumento do Ângulo Silviano, mesmo que em pequenas variações, pode ser significativo e, contribui para o diagnóstico de HPE.

No nosso estudo, também identificamos indivíduos com Ângulo Silviano reduzido em 25,9% dos casos, o que é sugestivo de fissuras Silvianas (FS) mais horizontalizadas. O Ângulo Silviano reduzido, geralmente está presente na HPE IM, onde o comprometimento encefálico está localizado nas estruturas da região frontal posterior e parietal (BULAKBASI; CANCURI; KOCAOĞLU, 2016). Dois indivíduos com o Ângulo Silviano reduzido apresentavam alterações encefálicas, caracterizadas por alterações hipofisárias, ausência de Septo Pelúcido e da porção anterior do Corpo Caloso. Estas alterações, geralmente, estão presentes na HPE Lobar (HAHN; BARNES, 2010), na qual foi descrito um Ângulo Silviano reduzido (BARKOVICH et al., 2002). É possível que as alterações presentes, sem redução acentuada do Lobo Frontal, possam ter redirecionado as FS, para uma posição menos oblíqua, resultando em um Ângulo Silviano reduzido.

A fissura interhemisférica, que está incompleta em todas as formas clássicas de HPE (HAHN; BARNES, 2010), foi descrita como normal em todos os indivíduos avaliados, exceto em um que, segundo um dos avaliadores, não estava completamente separada, podendo ser uma foixe cerebral malformada. Estas alterações encefálicas menores podem ser difíceis de ser diagnosticadas, mas não são as alterações características das Microformas e sua ausência não exclui o diagnóstico.

Anomalias estruturais dos ventrículos estavam presentes em 4/31 dos indivíduos (12,9%). As alterações ventriculares podem estar presentes em todas as formas clássicas de HPE e também nas formas IHM e SPO, sendo os Ventrículos Laterais os mais acometidos (HAHN; BARNES, 2010), como observamos neste estudo. Geralmente são descritas hipoplasia dos ventrículos, mas nós observamos, em 50% dos casos, ventrículos dilatados, sugerindo uma malformação dos plexos ventriculares, embora não tenha sido possível avaliá-los.

Alterações no Corpo Caloso (afilamento difuso ou ausência da porção anterior) estavam presentes em 4/31 dos indivíduos (12,9%), o que pode ser resultante de pequenos distúrbios na placa do assoalho do tubo neural, mas que não atingiram um limiar suficiente para comprometer o Lobo Frontal, como observado no HPE Lobar (SIMON et al., 2000; BARKOVICH, 2002; HAHN; BARNES, 2010).

Os Núcleos da Base apresentaram clivagem anormal em 3/31 dos indivíduos e estavam de tamanho levemente reduzido em um, totalizando 12,9% (4/31) dos

indivíduos acometidos, sendo que, em três, estavam associadas as alterações vistas no Corpo Caloso. A separação anormal da região talâmica e hipotalâmica foi observada somente em dois indivíduos. Mas as alterações encontradas foram discordantes entre os avaliadores, evidenciando a dificuldade da análise destas estruturas, em decorrência da sutileza das alterações. Estes achados, fazem parte do espectro da HPE Lobar e reforçam a suspeita de pequenos distúrbios na placa do assoalho do tubo neural.

O Septo Pelúcido estava acometido em 3/30 dos indivíduos (10%), sendo ausente em dois e Vergae em um. Em todos os casos, estavam associadas alterações nos Ventrículos Laterais e no Corpo Caloso e um indivíduo também apresentava hipoplasia das Vias Pré-Ópticas. O Septo Pelúcido pode estar ausente nas formas clássicas de HPE e na forma IHM (HAHN; BARNES, 2010). O conjunto das malformações presentes, nestes indivíduos, sugere uma origem embrionária semelhante à que ocorre na HPE Lobar. Entretanto, a manifestação fenotípica pode variar consoante a interação de diversos eventos, ambientais ou genéticos.

A Hipófise estava comprometida em 7/31 dos indivíduos (23,3%). A Adenoipófise apresentava tamanho reduzido em 19,3% dos indivíduos. As alterações na Adenoipófise podem ter resultado de alterações no teto do estomadeu, de onde ela se origina (MOORE; PERSAUD, 2013); ou da ausência de contato entre a Bolsa de Rathke (divertículo hipofisário) com o cérebro; ou ainda, da inadequada troca de informações moleculares entre Adenoipófise e Neuroipófise (RIZZOTI; LOVELL-BADGE, 2005).

A Neuroipófise, que tem sua origem no diencefalo, não foi visualizada em 21,4% dos indivíduos. Alterações diencefálicas, podem ser a origem das alterações na Neuroipófise (MOORE; PERSAUD, 2013). No entanto, quando observamos as alterações endócrinas, não houve referência ao Diabetes Insípido, a endocrinopatia mais frequente em indivíduos com HPE (HAHN et al., 2005), resultante da disfunção da Neuroipófise. Dois indivíduos referiam deficiência de hormônios da Adenoipófise e, em três deles, foi relatada baixa estatura, podendo ser decorrente de deficiência de hormônio de crescimento. É provável que as alterações hipofisárias observadas nestes indivíduos resultem de alterações no eixo Hipotálamo/Hipófise, ou somente da Adenoipófise, sem maior comprometimento das estruturas de origem diencefálicas, embora isto não tenha sido investigado.

A hipoplasia da face média, a FLP e a hipoplasia de Adenoipófise podem ter resultado de redução no número de células que migraram para formar as estruturas embrionárias primitivas (Processo Frontonasal e Processo Maxilar), ou da diferenciação da massa celular destas estruturas, sem alteração da padronização ventro-dorsal do prosencéfalo.

Neste estudo, a Hipófise foi a estrutura mais acometida (23,3%). Estes dados reforçam a importância da investigação clínica direcionada para alterações da sela túrcica em indivíduos com fenótipo de Microformas de HPE, assim como a avaliação e seguimento por endocrinologista deveria sempre ser solicitada.

Na análise das neuroimagens, o Volume Encefálico foi considerado normal em todos os indivíduos, mas a medida do perímetro cefálico, revelou microcefalia em 65,5% dos casos, e perímetro cefálico abaixo do percentil 50, em 13,8% dos casos. Também observamos que, todos os indivíduos com alterações nas estruturas encefálicas da linha média apresentavam microcefalia ou crânio pequeno, sugerindo uma redução sutil do tamanho do encéfalo, não percebida em uma avaliação subjetiva. Os hemisférios cerebrais são estruturas de origem telencefálicas. O crescimento inadequado pode ter resultado em microcefalia e impactar diretamente na forma da face (NOPOULOS et al., 2001, 2002, 2007; GENG; OLIVER, 2009; PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015; XAVIER et al., 2016).

As neuroimagens não apresentavam o mesmo padrão de sequências e ponderações. Além disso, houve variação na qualidade dos exames, dificultando a análise de algumas estruturas que, por este motivo, foram descritos como não avaliadas. Mas, o conjunto das características fenotípicas e dos achados de neuroimagens presentes nestes indivíduos sugere que, pequenos distúrbios na placa do assoalho do tubo neural, comprometendo principalmente estruturas de origem telencefálica e diencefálicas, podem ser a origem das malformações que resultem em uma Microforma ou forma mínima de HPE.

Em um único indivíduo (7,1% dos indivíduos que realizaram o cariótipo) foi observado uma translocação entre o braço longo do cromossomo 9 e do cromossomo 12. As aberrações cromossômicas, frequentes nos casos mais graves de HPE (SOLOMON et al., 2010), não seriam esperadas nos casos mais leves, como os da amostra estudada. Este indivíduo foi um dos mais acometidos, apresentando várias

alterações encefálicas, o Ângulo Silviano aumentado e atraso no DNPM, resultantes das alterações cromossômicas identificadas.

As análises genéticas, previamente realizadas, identificaram mutações nos genes *SHH* e *GLI2*, em 29,6% dos indivíduos analisados. Mutações no *SHH*, o gene mais frequentemente relacionado a etiologia da HPE (COHEN, 2006; DUBOURG et al., 2007; MOUDEN et al., 2016), também apresentou maior incidência neste estudo (18,5%). E, como nos casos mais graves, os indivíduos também apresentaram variações na expressão clínica (BERTOLACINI; RICHIERI-COSTA; RIBEIRO-BICUDO, 2010).

O gene *GLI2* foi identificado em 11,1% dos casos. Nestes indivíduos não foram referidas alterações em membros, como descrito por Roessler et al. (2003), ou deficiência de hormônios hipofisários, como observado em outros estudos (COHEN, 2006; BERTOLACINI et al., 2012; DUBOURG et al., 2016) embora, todos os indivíduos com mutações neste gene tenham apresentado alguma alteração encefálica. O gene *GLI2* também está envolvido em carcinogênese (STECCA; RUIZ I ALTABÁ, 2010). Um dos indivíduos, com mutação neste gene, apresentava um macroadenoma hipofisário, enquanto o pai, com a mesma mutação, apresentava ICSU e referia convulsões. Mutações no *GLI2* também estão associadas FLP isolada e HPE Semilobar (RAHIMOV et al., 2006; BERTOLACINI et al., 2012; FLEMMING et al., 2013), apresentando grande variabilidade fenotípica, mas com predomínio nas formas mais leves (BEAR et al., 2014).

Estes achados exemplificam a complexidade da interação entre fatores genéticos e ambientais, interferindo na expressão clínica dos genes. Além disso, em 3/4 dos indivíduos analisados não se identificou uma causa genética, sendo possível que outros fatores, ainda não pesquisados (genes ou fatores epigenéticos), estejam envolvidos na etiopatogenia da HPE, reforçando a hipótese do “Múltiplos *hits*” (MING; MUENKE, 2002; MERCIER et al., 2011; BILLINGTON et al., 2015; PETRYK; GRAF; MARCUCIO, 2015; DUBOURG et al., 2016; MOUDEN et al., 2016).

Nas Microformas, o extremo mais leve da expressão clínica da HPE, ainda restam muitas questões a para ser respondidas. No entanto, este estudo sugere que alterações em estruturas originárias do telencéfalo e do diencéfalo possam ser as mais comprometidas. Estas alterações podem resultar de defeitos na migração de grupo celulares embriologicamente mais primitivos, oriundos da crista neural, ou da

diferenciação destas células, em estágios mais tardios. O envolvimento de genes e outros fatores relacionados com estas etapas embriológicas podem, eventualmente, contribuir para esclarecer a etiologia.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

As formas mais leves do espectro fenotípico da HPE, constituem um grupo especial de indivíduos que, assim como as formas mais graves de HPE, também apresentam pequenas variações da expressão clínica, o que nem sempre é relacionado apenas ao desenvolvimento do prosencéfalo.

Este estudo sugere que indivíduos com características faciais sugestivas de Microformas de HPE podem apresentar pequenas alterações encefálicas, sendo as estruturas originárias do telencéfalo e do diencéfalo as mais comprometidas.

As alterações hipofisárias foram as mais frequentes, presentes em 23% dos indivíduos e, em alguns casos, a única malformação presente em um indivíduo com a forma mínima de HPE. Deste modo, a avaliação e seguimento por endocrinologista deveria ser, sempre, solicitada.

Outras alterações das estruturas da linha média, como o Corpo Caloso e o Septo Pelúcido, também podem ser acometidos, assim como os Núcleos da Base e os Ventrículos Laterais. Essa variedade na expressão clínica sugere a interação de fatores, ainda não identificados, que contribuem para o fenótipo final.

A hipoplasia da face média, a FLP, a microcefalia e as alterações da Hipófise, presentes nos indivíduos analisados, podem ser resultantes de defeitos na migração e/ou na diferenciação de grupos celulares específicos para formar o Processo Frontonasal e/ou o Processo Maxilar, nos primórdios da embriogênese do encéfalo, sem que, necessariamente, altere a padronização do prosencéfalo.

O Ângulo Silviano é normal na maioria dos indivíduos e as variações da normalidade são em pequeno grau, sendo que, a medida do Ângulo Silviano aumentado, sugere a presença de malformações encefálicas, embora o Ângulo Silviano normal não as exclua.

Podemos finalmente concluir que a pesquisa de genes e outros fatores envolvidos na migração e diferenciação de células oriundos da crista neural, pode, eventualmente, contribuir para esclarecer a etiologia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Arangio P, Manganaro L, Pacifici A, Basile E, Cascone P. Importance of fetal MRI in evaluation of craniofacial deformities. *J Craniofac Surg*. 2013;24:773-6.
- Bancalari RE, Gregory LC, McCabe MJ, Dattani MT. Pituitary gland development: an update. *Endocr Dev*. 2012;23:1-15.
- Barkovich AJ. Magnetic resonance imaging: role in the understanding of cerebral malformations. *Brain Dev*. 2002;24(1):2-12.
- Barkovich AJ, Norman D. Absence of the septum pellucidum: a useful sign in the diagnosis of congenital brain malformations. *Am J Roentgenol*. 1989;152(2):353-60.
- Barkovich AJ, Quint DJ. Middle interhemispheric fusion: an unusual variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1993;14(2):431-40.
- Barkovich AJ, Simon EM, Clegg NJ, Kinsman SL, Hahn JS. Analysis of the Cerebral Cortex in Holoprosencephaly with Attention to the Sylvian Fissures. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23(1):143-50.
- Barr M Jr, Hanson JW, Currey K, Sharp S, Toriello H, Schmickel RD, et al. Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. *J Pediatr*. 1983;102(4):565-8.
- Bartholin L, Powers SE, Melhuish TA, Lasse S, Weinstein M, Wotton D. TGIF inhibits retinoid signaling. *Mol Cell Biol*. 2006;26(3):990-1001.
- Baxter DJ, Shroff MM. Developmental maxillofacial anomalies. *Semin Ultrasound CT MR*. 2011;32(6):555-68.
- Bear KA, Solomon BD, Antonini S, Arnhold IJ, França MM, Gerkes EH, et al. Pathogenic mutations in *GLI2* cause a specific phenotype that is distinct from holoprosencephaly. *J Med Genet*. 2014;51(6):413-8.
- Ben-Hur N, Ashur H, Murreri M. An unusual case of median cleft lip with orbital hypotelorism--a missing link in the classification. *Cleft Palate J*. 1978;15(4):365-8.
- Bertolacini CD, Richieri-Costa A, Ribeiro-Bicudo LA. Sonic hedgehog (SHH) mutation in patients within the spectrum of holoprosencephaly. *Brain Dev*. 2010;32(3):217-22.
- Bertolacini CD, Ribeiro-Bicudo LA, Petrin A, Richieri-Costa A, Murray JC. Clinical findings in patients with *GLI2* mutations--phenotypic variability. *Clin Genet*. 2012;81(1):70-5.
- Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med*. 2014;370(25):2418-25.
- Billington CJ Jr, Schmidt B, Marcucio RS, Hallgrimsson B, Gopalakrishnan R, Petryk A. Impact of retinoic acid exposure on midfacial shape variation and manifestation of holoprosencephaly in *Twsg1* mutant mice. *Dis Model Mech*. 2015;8(2):139-46.

- Blaas HG, Eriksson AG, Salvesen KA, Isaksen CV, Christensen B, Møllerløkken G, et al. Brains and faces in holoprosencephaly: pre- and postnatal description of 30 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002;19(1):24-38.
- Boutray M, Beziat JL, Yachouh J, Bigorre M, Gleizal A, Captier G. Median cleft of the upper lip: a new classification to guide treatment decisions. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(6):664-71.
- Bulakbasi N, Cancuri O, Kocaoğlu M. The middle interhemispheric variant of holoprosencephaly: magnetic resonance and diffusion tensor imaging findings. *Br J Radiol.* 2016;89(1063): 20160115.
- Bullen PJ, Rankin JM, Robson SC. Investigation of the epidemiology and prenatal diagnosis of holoprosencephaly in the North of England. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(6):1256-62.
- Calzolari E, Pierini A, Astolfi G, Bianchi F, Neville AJ, Rivieri F. Associated anomalies in multi-malformed infants with cleft lip and palate: an epidemiologic study of nearly 6 million births in 23 EUROCAT registries. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(6):528-37.
- Cohen MM Jr. Problems in the definition of holoprosencephaly. *Am J Med Genet.* 2001;103(1):183-7.
- Cohen MM Jr. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2006;76(9):658-73.
- Cohen MM Jr. Holoprosencephaly: a mythologic and teratologic distillate. *Am J Med Genet C.* 2010;154C:8-12.
- Cohen MM Jr, Shiota K. Teratogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet.* 2002;109(1):1-15.
- Collins AL, Lunt PW, Garrett C, Dennis NR. Holoprosencephaly: a family showing dominant inheritance and variable expression. *J Med Genet.* 1993;30(1):36-40.
- Croen LA, Shaw GM, Lammer EJ. Holoprosencephaly: epidemiologic and clinical characteristics of a California population. *Am J Med Genet.* 1996;64(3):465-72.
- Croen LA, Shaw GM, Lammer EJ. Risk factors for cytogenetically normal holoprosencephaly in California: a population-based case-control study. *Am J Med Genet.* 2000;90(4):320-5.
- Della Giustina E, Iodice A, Spagnoli C, Giovannini S, Frattini D, Fusco C, et al. Minimal holoprosencephaly in a 14q deletion syndrome patient. *Am J Med Genet A.* 2017;173(12):3216-20.
- Demyer W, Zeman W. Alobar holoprosencephaly (arhinencephaly) with median cleft lip and palate: clinical, electroencephalographic and nosologic considerations. *Confin Neurol.* 1963;23:1-36.

- Demyer W, Zeman W, Palmer CG. The face predicts the brain: diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arhinencephaly). *Pediatrics*. 1964;34:256-63.
- Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:8.
- Dubourg C, David V, Gropman A, Mercier S, Muenke M, Odent S, et al. Clinical utility gene card for: Holoprosencephaly. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(1):118-20.
- Dubourg C, Carré W, Hamdi-Rozé H, Mouden C, Roume J, Abdelmajid B, et al. Mutational spectrum in Holoprosencephaly shows that FGF is a new major signaling pathway. *Hum Mutat*. 2016;37(12):1329-39.
- Dupé V, Rochard L, Mercier S, Le Pétilion Y, Gicquel I, Bendavid C, et al. NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 2011;20(6):1122-31.
- Edison RJ, Muenke M. Mechanistic and epidemiologic considerations in the evaluation of adverse birth outcomes following gestational exposure to statins. *Am J Med Genet A*. 2004;131(3):287-98.
- Fitz CR. Holoprosencephaly and related entities. *Neuroradiology*. 1983;25(4):225-38.
- Fitz CR. Holoprosencephaly and septo-optic dysplasia. *Neuroimaging Clin N Am*. 1994;4(2):263-81.
- Flemming GM, Klammt J, Ambler G, Bao Y, Blum WF, Cowell C, et al. Functional characterization of a heterozygous GLI2 missense mutation in patients with multiple pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):E567-75.
- Fryns JP, Van den Berghe H. Single central maxillary incisor and holoprosencephaly. *Am J Med Genet*. 1988;30(4):943-4.
- Furtado IR. Nasal morphology - harmony and proportion applied to rhinoplasty. *Rev Bras Cir Plást*. 2016;31(4):599-608.
- Geng X, Oliver G. Pathogenesis of holoprosencephaly. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1403-13.
- Golden JA. Towards a greater understanding of the pathogenesis of holoprosencephaly. *Brain Dev*. 1999;21(8):513-21.
- Golden JA, Holmes LB. The face-brain relationship: a case of the face not predicting the brain. *Clin Dysmorphol*. 1994;3(2):164-70.
- Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, et al. Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet*. 2000;25(2):205-8.

- Gutin G, Fernandes M, Palazzolo L, Paek H, Yu K, Ornitz DM, et al. FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH. *Development*. 2006;133:2937-46.
- Haas D, Muenke M. Abnormal sterol metabolism in holoprosencephaly. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2010;154C:102-8.
- Hahn JS, Barnes PD. Neuroimaging advances in holoprosencephaly: refining the spectrum of the midline malformation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):120-32.
- Hahn JS, Pinter JD. Holoprosencephaly: genetic, neuroradiological, and clinical advances. *Semin Pediatr Neurol*. 2002;9(4):309-19.
- Hahn LS, Plawner LL. Evaluation and management of children with holoprosencephaly. *Pediatr Neurol*. 2004;31(2):79-88.
- Hahn JS, Barnes PD, Clegg NL, Stashinko EE. Septopreoptic Holoprosencephaly: a mild subtype associated with midline craniofacial anomalies. *AJNR Am Neuroradiol*. 2010;31(9):1596-601.
- Hahn JS, Hahn SM, Kammann H, Barkovich AJ, Clegg NJ, Delgado MR, et al. Endocrine disorders associated with holoprosencephaly. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2005;18(10):935-41.
- Higashiyama D, Saitsu H, Komada M, Takigawa T, Ishibashi M, Shiota K. Sequential developmental changes in holoprosencephalic mouse embryos exposed to ethanol during the gastrulation period. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007;79(7):513-23.
- Hong S, Hu P, Marino J, Hufnagel SB, Hopkin RJ, Toromanović A, Richieri-Costa A, Ribeiro-Bicudo LA, Kruszka P, Roessler E, Muenke M. Dominant-negative kinase domain mutations in FGFR1 can explain the clinical severity of Hartsfield syndrome. *Hum Mol Genet*. 2016;25(10):1912-1922.
- International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 8th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2017 [cited 2018 Jan. 3]. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/>
- Johnson CY, Rasmussen SA. Non-genetic risk factors for holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):73-85.
- Jones GE, Robertson L, Maniayar A, Shamas C, Phelan MM, Vasudevan PC, et al. Microform holoprosencephaly with bilateral congenital elbow dislocation; increasing the phenotypic spectrum of Steinfeld syndrome. *Am J Med Genet A*. 2016;170(3):754-9.
- Kietzman HW, Everson JL, Sulik KK, Lipinski RJ. The teratogenic effects of prenatal ethanol exposure are exacerbated by Sonic Hedgehog or GLI2 haploinsufficiency in the mouse. *PLoS One*. 2014;9(2):e89448.

Kinsman SL. White matter imaging in holoprosencephaly in children. *Curr Opin Neurol*. 2004;17(2):115-9.

Kjaer I. Human prenatal craniofacial development related to brain development under normal and pathologic conditions. *Acta Odontol Scand*. 1995;53(3):135-43

Ko JM, Kim SH. Clinical features and outcomes of holoprosencephaly in Korea. *Pediatr Neurol*. 2010;43(4):245-52.

Kundrat H. Arhinencephalie als typische Art von Missbildung. *Wien Med Bl*. 1882;5:1395.

Lacbawan F, Solomon BD, Roessler E, El-Jaick K, Domene´ S, Ve´lez JI, et al. Clinical spectrum of SIX3-associated mutations in holoprosencephaly: correlation between genotype, phenotype and function. *J Med Genet*. 2009;46:389-98.

Laron Z, Taube E, Kaplan I. Pituitary growth hormone insufficiency associated with cleft lip and palate: an embryonal developmental defect. *Helv Paediatr Acta*. 1969;24(6):576-81.

Larsen WJ. Human embryology. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 2001.

Leoncini E, Baranello G, Orioli IM, Annerén G, Bakker M, Bianchi F, et al. Frequency of holoprosencephaly in the International Clearinghouse Birth Defects Surveillance Systems: searching for population variations. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008;82(8):585-91.

Lewis AJ, Simon EM, Barkovich AJ, Clegg NJ, Delgado MR, Levey E, et al. Middle interhemispheric variant of holoprosencephaly: a distinct clinico neuroradiologic subtype. *Neurology*. 2002;59(12):1860-5.

McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Tziaferi V, Gregory LC, Alatzoglou KS, Signore M, et al. Novel FGF8 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(10):E1709-18.

Matsunaga E, Shiota K. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. *Teratology*. 1977;16(3):261-72.

Mercier S, David V, Ratié L, Gicquel I, Odent S, Dupé V. NODAL and SHH dose-dependent double inhibition promotes an HPE-like phenotype in chick embryos. *Dis Model Mech*. 2013;6(2):537-43.

Mercier S, Dubourg C, Garcelon N, Campillo-Gimenez B, Gicquel I, Belleguic M, et al. New findings for phenotype-genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. *J. Med. Genet*. 2011; 48(11):752-60.

Miller EA, Rasmussen SA, Siega-Riz AM, Frías JL, Honein MA. Risk factors for non-syndromic holoprosencephaly in the National Birth Defects Prevention Study. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):62-72.

- Ming JE, Muenke M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet.* 2002;71(5):1017-32.
- Moen GH, Sommer C, Prasad RB, Sletner L, Groop L, Qvigstad E, et al. Mechanisms in endocrinology: epigenetic modifications and gestational diabetes: a systematic review of published literature. *Eur J Endocrinol.* 2017;176(5):R247-67.
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica.* 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
- Mossey PA, Modell B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Front Oral Biol.* 2012;16:1-18.
- Mouden C, de Tayrac M, Dubourg C, Rose S, Carré W, Hamdi-Rozé H, et al. Homozygous STIL mutation causes holoprosencephaly and microcephaly in two siblings. *PLoS One.* 2015;10(2): e0117418.
- Mouden C, Dubourg C, Carré W, Rose S, Quelin C, Akloul L, et al. Complex mode of inheritance in holoprosencephaly revealed by whole exome sequencing. *Clin Genet.* 2016;89(6):659-68.
- Mueller AA, Sader R, Honigsmann K, Zeilhofer HF, Schwenzer-Zimmerer K. Central nervous malformations in presence of clefts reflect developmental interplay. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(4):289-95.
- Muenke M, Beachy PA. Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10(3):262-9.
- Naini FB, Cobourne MT, Garagiola U, McDonald F, Wertheim D. Nasofrontal angle and nasal dorsal aesthetics: a quantitative investigation of idealized and normative values facial *Plast Surg.* 2016;32(4):444-51.
- Nopoulos P, Langbehn DR, Canady J, Magnotta V, Richman L. Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007;161(8):753-8.
- Nopoulos P, Berg S, VanDemark D, Richman L, Canady J, Andreasen NC. Increased incidence of a midline brain anomaly in patients with nonsyndromic clefts of the lip and/or palate. *J Neuroimaging.* 2001;11(4):418-24.
- Nopoulos P, Berg S, Canady J, Richman L, Van Demark D, Andreasen NC. Structural brain abnormalities in adult males with clefts of the lip and/or palate. *Genet Med.* 2002;4(1):1-9.
- Olney JW, Farber NB, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Ikonomidou C. Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Environ Health Perspect.* 2000;108(Suppl 3):383-8.
- Ozer E, Sarioglu S, Güre A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin Neuropathol.* 2000;19(1):21-5.

Orioli IM, Castilla EE. Clinical epidemiologic study of holoprosencephaly in South America. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(24):3088-99.

Orioli IM, Castilla EE. Epidemiology of holoprosencephaly: prevalence and risk factors. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):13-21.

Paulussen AD, Schrandt-Stumpel CT, Tserpelis DC, Spee MK, Stegmann AP, Mancini GM, et al. The unfolding clinical spectrum of holoprosencephaly due to mutations in SHH, ZIC2, SIX3 and TGIF genes. *Eur J Hum Genet*. 2010;8(9):999-1005.

Petryk A, Graf D, Marcucio R. Holoprosencephaly: signaling interactions between the brain and the face, the environment and the genes, and the phenotypic variability in animal models and humans. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(1):17-32.

Plawner LL, Delgado MR, Miller VS, Levey EB, Kinsman SL, Barkovich AJ, et al. Neuroanatomy of holoprosencephaly as predictor of function: Beyond the face predicting the brain. *Neurology*. 2002;59(7):1058-66.

Rahimov F, Ribeiro LA, Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC. GLI2 mutations in four Brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A*. 2006;140(23):2571-6.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.

Richieri-Costa A, Ribeiro LA. Holoprosencephaly-like phenotype: clinical and genetic perspectives. *Am J Med Genet A*. 2006;140(23):2587-93.

Richieri-Costa A, Ribeiro LA. Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotypes: review of facial and molecular findings in patients from a craniofacial hospital in Brazil. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):149-57.

Rizzoti K, Lovell-Badge R. Early development of the pituitary gland: induction and shaping of Rathke's pouch. *Rev Endocr Metab Disord*. 2005;6(3):161-72.

Roach E, Demyer W, Conneally PM, Palmer C, Merritt AD. Holoprosencephaly: birth data, genetic and demographic analyses of 30 families. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1975;11(2):294-313.

Roessler E, Muenke M. The molecular genetics of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):52-61.

Roessler E, Vélez JI, Zhou N, Muenke M. Utilizing prospective sequence analysis of SHH, ZIC2, SIX3 and TGIF in holoprosencephaly probands to describe the parameters limiting the observed frequency of mutant gene-gene interactions. *Mol Genet Metab*. 2012;105(4):658-64.

- Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, et al. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.* 1996;14(3):357-60.
- Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillessen-Kaesbach G, et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(23):13424-9.
- Roessler E, Ma Y, Ouspenskaia MV, Lacbawan F, Bendavid C, Dubourg C, et al. Truncating loss-of-function mutations of DISP1 contribute to holoprosencephaly-like microform features in humans. *Hum Genet.* 2009;125(4):393-400.
- Rogers JM, Brannen KC, Barbee BD, Zucker RM, Degitz SJ. Methanol exposure during gastrulation causes holoprosencephaly, facial dysgenesis, and cervical vertebral malformations in C57BL/6J Mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2004;71(2):80-8.
- Roitman A, Laron Z. Hypothalamo-pituitary hormone insufficiency associated with cleft lip and palate. *Arch Dis Child.* 1978;53(12):952-5.
- Ronen GM, Andrews WL. Holoprosencephaly as a possible embryonic alcohol effect. *Am J Med Genet.* 1991;40(2):151-4.
- Rosenfeld JA, Ballif BC, Martin DM, Aylsworth AS, Bejjani BA, Torchia BS, et al. Clinical characterization of individuals with deletions of genes in holoprosencephaly pathways by aCGH refines the phenotypic spectrum of HPE. *Hum Genet.* 2010;127:421-40.
- Rudman D, Davis T, Priest JH, Patterson JH, Kutner MH, Heymsfield SB, et al. Prevalence of growth hormone deficiency in children with cleft lip or palate. *J Pediatr.* 1978;93(3):378-82.
- Santiago G, Abramides DV, De-Vitto LP, Ribeiro LA, Meira Junior SG, Richieri-Costa A. Language skills and neuropsychological performance in patients with SHH mutations and a holoprosencephaly-like phenotype. *Am J Med Genet A.* 2006;140(19):2085-90.
- Shampo MA, Kyle RA. Godfrey Hounsfield - developer of computed tomographic scanning. *Mayo Clin Proc.* 1996;71:990.
- Shiota K, Yamada S, Komada M, Ishibashi M. Embryogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:3079-87.
- Simon EM, Hevner R, Pinter JD, Clegg NJ, Miller VS, Kinsman SL, et al. Assessment of the deep gray nuclei in holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000;21:1955-61.
- Simon EM, Hevner RF, Pinter JD, Clegg NJ, Delgado M, Kinsman SL, et al. The middle interhemispheric variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002;23(1):151-6.

- Solomon BD, Gropman A, Muenke M. Holoprosencephaly overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. Gene reviews. Seattle: University of Washington; 2000 [cited 2018 Jan. 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1530/>.
- Solomon BD, Rosenbaum KN, Meck JM, Muenke M. Holoprosencephaly due to numeric chromosome abnormalities. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):146-8.
- Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Gropman AL, Willis MJ, Hadley DW, Muenke M. High intellectual function in individuals with mutation-positive microform holoprosencephaly. *Mol Syndromol*. 2012;3(3):140-2.
- Stecca B, Ruiz I, Altaba A. Context-dependent Regulation of the GLI Code in Cancer by HEDGEHOG and Non-HEDGEHOG Signals. *J Mol Cell Biol*. 2010;2(2):84-95.
- Stokes B, Berger SI, Hall BA, Weiss K, Martinez AF, Hadley DW, et al. SIX3 deletions and incomplete penetrance in families affected by holoprosencephaly. *Congenit Anom*. 2018;58(1):29-32.
- Tatsi C, Sertedaki A, Voutetakis A, Valavani E, Magiakou MA, Kanaka-Gantenbein C, et al. Pituitary stalk interruption syndrome and isolated pituitary hypoplasia may be caused by mutations in holoprosencephaly-related genes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):E779-84.
- Tuohy PG, Franklin RC. Cleft palate and gonadotrophin deficiency. *Arch Dis Child*. 1984;59(6):580-2.
- Vaaralahti K, Raivio T, Koivu R, Valanne L, Laitinen EM, Tommiska J. Genetic overlap between holoprosencephaly and Kallmann Syndrome. *Mol Syndromol*. 2012;3(1):1-5.
- Van Gool S, de Zegher F, de Vries LS, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Devlieger H, Casaer P, et al. Alobar holoprosencephaly, diabetes insipidus and coloboma without craniofacial abnormalities: a case report. *Eur J Pediatr*. 1990;149(9):621-2.
- Weiss K, Kruszka P, Guillen Sacoto MJ, Addissie YA, Hadley DW, Hadsall CK, et al. In-depth investigations of adolescents and adults with holoprosencephaly identify unique characteristics. *Genet Med*. 2018;20(1):14-23.
- World Health Organization. Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies: report of WHO meetings on International Collaborative Research on Craniofacial Anomalies. Geneva: World Health Organization; 2002.
- Xavier GM, Seppala M, Barrell W, Birjandi AA, Geoghegan F, Cobourne MT. Hedgehog receptor function during craniofacial development. *Dev Biol*. 2016;415(2):198-215.
- Yakovlev PI. Pathoarchitectonic studies of cerebral malformations. III. Arrhinencephalies (holotelencephalies). *J Neuropathol Exp Neurol*. 1959;18(1):22-55

Yamada S. Embryonic holoprosencephaly: pathology and phenotypic variability. *Congenit Anom.* 2006;46(4):164-71.

Yang E, Chu WCW, Lee EY. A practical approach to supratentorial brain malformations: what radiologists should know. *Radiol Clin North Am.* 2017;55(4):609-27.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Roteiro de análise das neuroimagens

Paciente: _____ Examinador: _____ Corte: Sagital () Coronal () Axial ()¹

Fissuras interhemisféricas	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Incompleta			
Outras alterações (Lobo Frontal)			
Ventrículos	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Separação incompleta			
Outras alterações			
Corpo Caloso	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Ausente			
Malformado			
Outras alterações			
Núcleos Caudado	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Clivagem anormal			
Outras alterações			
Núcleo Putamen	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Clivagem anormal			
Outras alterações			
Núcleo Globo Pálido	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Clivagem anormal			
Outras alterações			
Tálamo/ Hipotálamo	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Separação anormal			
Outras alterações			
Adenoipófise	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Tamanho reduzido			
Outras alterações			

2

Neuroipófise	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Ectópica			
Ausente			
Outras alterações			
Vias Pré-ópticas (Nervos e quiasma óptico)	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Hipoplásticas			
Outras alterações			
Septo Pelúcido	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Ausente			
Outras alterações			
Volume Encefálico	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Desproporcional à faixa etária			
Outras alterações			
Região Cortical	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Outras alterações			
Tronco e Mesencéfalo	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL
Normal			
Outras alterações			
Outras Alterações	CORTE SAGITAL	CORTE AXIAL	CORTE CORONAL

APÊNDICE B – Quadro resumido das alterações encefálicas apresentadas pelos indivíduos avaliados, segunda a análise de cada avaliador

Ind.	FIH		Ventr		CC		N. Caud		N. Put		N. GI Pál		Tal/Hipot		Adenoipóf		Neuroipóf		V Préopt		S Peluc		R Cortic	
	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2
1	ICP	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	DC	NL
2	NL	NL	NL	NL	NL	NL	CA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	MA	MA	NV	NV	NL	NL	NL	NL	DC	NL
3	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
4	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	ECT	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NL
5	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
6	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	RED	RED	NV	NV	NL	NL	NL	NL	NL	NL
7	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	DC	NL
8	NA	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NA	NA	NL	NL	NL	NL
9	NA	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NA	NA	NL	NL	NL	NL
10	NA	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	RED	RED	NV	NV	NA	NA	NL	NL	NL	NL
11	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NA	NL	NL	NL	NL
12	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NA	NL	NL	NL	NL
13	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	RED	RED	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
14	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL
15	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
16	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
17	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
18	NL	NL	MF	MF	MF	MF	NL	RED	NL	RED	NL	RED	NL	NL	RED	RED	NV	NV	NL	HIP	SP V	SP V	NL	NL
19	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NA	NL	NA	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL
20	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NA	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL
21	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
22	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL
23	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
24	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
25	NL	NL	MF	MF	MF	MF	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NA	AUS	AUS	NL	NL
26	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NA	NA	NL	NL	NL	NL
27	NL	NL	MF	MF	NA	MF	CA	CA	CA	CA	CA	CA	SA	SA	NA	NA	NA	NA	NA	NL	NA	NA	NL	NL
28	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	RED	RED	NV	NV	NL	NL	NL	NL	NL	NL
29	NL	NL	MF	MF	MF	MF	CA	CA	CA	CA	CA	CA	SA	NA	NL	NL	NL	NV	NA	NA	AUS	AUS	NL	NL
30	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	RED	RED	NA	NV	NA	NA	NL	NA	NL	NL
31	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NA	NL	NL	NL	NL	NL

Adenoipóf= Adenoipófise; **AUS=** ausente; **CA=** clivagem anormal; **CC=** Corpo Caloso; **DC=** displasia cortical; **ECT=** ectópica; **EX=** examinador; **FIH=** fissura interhemisférica; **HIP=** Hipoplásico; **ICP=** incompleta; **Ind.=** indivíduos; **MA=** macroadenoma; **MF=** malformado; **N. Caud=** Núcleo Caudado; **N. GI Pál=** Núcleo Globo Pálido; **N. Put=** Núcleo Putamen; **NA=** não avaliado; **Neuroipóf=** Neuroipófise; **NL=** normal; **NV=** não visualizado; **R Cortic=** Região Cortical; **RED=** reduzido; **S Pelic=** Septo Pelúcido; **SA=** separação anormal; **SP V=** Septo Pelúcido Vergae; **Tal/Hipot=** Tálamo/Hipotálamo; **Tr/Mesenc=** Tronco/Mesencéfalo; **V Préopt=** Vias Pré-Ópticas; **Ventr=** Ventriculos.

APÊNDICE C – Descrição resumida do quadro clínico, dos testes genéticos e dos exames de neuroimagens apresentado por cada indivíduo

Indivíduo 1: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 23°, DICI entre P25 e P50, microcefalia. Cariótipo normal e sem variantes patogênicas nos sete genes pesquisados. Ângulo Silvano foi de 14°. Neuroimagens com pequena área de descontinuidade da fissura interhemisférica e displasia cortical em região perisilviana à esquerda, segundo um analisador. Atraso no DNPM e baixo rendimento escolar. Sem parentes afetados.

Indivíduo 2: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 20°, DICI entre P3 e P25, microcefalia. Cariótipo normal e variante patogênica Met1116Ile no gene *GLI2*. Ângulo Silvano foi de 19°. Apresentava macroadenoma hipofisário, Neuroipófise não visualizada. Clivagem anormal do Núcleo Caudado e DC parietal alta à esquerda, segundo um analisador. DNPM normal e rendimento escolar não informado. Pai com ICSU e a mesma variante patogênica.

Indivíduo 3: masculino, FL/P mediana, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 12°, DICI P50, microcefalia. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silvano foi de 13°. Sem alterações encefálicas nas neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Sem parentes afetados.

Indivíduo 4: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 17°, hipotelorismo, microcefalia. Cariótipo não referido e variante patogênica Cys198Tyr no gene *SHH*. Ângulo Silvano foi de 13°. Neuroipófise ectópica em neuroimagens, segundo um avaliar. DNPM normal e baixo rendimento escolar. Sem parentes afetados.

Indivíduo 5: masculino, FL/P mediana, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 15°, DICI entre P3 e P25, sem microcefalia. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em quatro genes pesquisados. Ângulo Silvano foi de 13°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Mãe com ICSU.

Indivíduo 6: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 12°, DICI entre P3 e P25, sem microcefalia. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silvano foi de 12°. Adenoipófise de tamanho reduzido e

Neuroipófise não visualizada em neuroimagens. DNPM não referido e rendimento escolar normal. Mãe com ICSU.

Indivíduo 7: feminino, perfil plano, FL/P, Ângulo Nasofacial de 21°, DICl não referida, sem microcefalia. Cariótipo não referido e variante patogênica Met1116Ile no gene *GLI2* e Ângulo Silviano foi de 15°. DC em região frontal esquerda em neuroimagens, segundo um avaliar. DNPM não referido e rendimento escolar normal. Sem parentes afetados.

Indivíduo 8: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 19°, DICl entre P25 e P50, microcefalia. Cariótipo não referido e sem variantes patogênicas nos sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 7°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Sem referência de parentes afetados.

Indivíduo 9: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 25°, hipotelorismo, sem microcefalia. Cariótipo não referido e não tem análise molecular. Ângulo Silviano foi de 11°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM normal e baixo rendimento escolar. Sem referência de parentes afetados.

Indivíduo 10: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 22°, hipotelorismo, microcefalia. Cariótipo e MLPA normais e variante patogênica Cys198Tyr no gene *SHH*. Ângulo Silviano foi de 10°. Adenoipófise de tamanho reduzido e Neuroipófise não visualizada em neuroimagens. DNPM normal e baixo rendimento escolar. Sem parentes afetados. Foi referido que este indivíduo apresentava baixa estatura.

Indivíduo 11: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 12°, DICl entre P3 e P25, microcefalia. Cariótipo não referido e variante patogênica Cys363Tyr no gene *SHH*. Ângulo Silviano não aferido. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM normal e baixo rendimento escolar. Sem referência de parentes afetados.

Indivíduo 12: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 17°, hipotelorismo, sem referência ao perímetro cefálico. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 17°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM normal e rendimento escolar não informado. Primo materno FLP.

Indivíduo 13: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 15°, DICI não referida, microcefalia. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 23°. Neuroipófise de tamanho reduzido em neuroimagens. DNPM com atraso na fala e rendimento escolar não informado. Sem parentes afetados.

Indivíduo 14: feminino, FL/P mediana, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 14°, DICI entre P25 e P50, sem microcefalia. Cariótipo normal e não tem análise molecular. Ângulo Silviano foi de 10°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. Atraso no DNPM e baixo rendimento escolar. Primo da mãe FL.

Indivíduo 15: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 19°, DICI entre P3 e P25, microcefalia. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 15°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Pai com ICSU e primos paternos com FLP.

Indivíduo 16: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 25°, hipotelorismo, microcefalia. Cariótipo não referido, MLPA sem alterações e variante patogênica Leu218Pro no gene *SHH*. Ângulo Silviano foi de 16°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM não referido e baixo rendimento escolar. Pai com ICSU e crânio pequeno e com a mesma variante patogênica. Foi referido que este indivíduo apresentava baixa estatura.

Indivíduo 17: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 27°, DICI entre P3 e P25, microcefalia. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em quatro genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 15°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Mãe com crânio pequeno e primo paterno com FP.

Indivíduo 18: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 15°, hipertelorismo, microcefalia. Cariótipo 46,XX,t(9;12)(q34;q24) e sem variante patogênica em quatro genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 20°. Dilatação dos Ventrículos Laterais e do III ventrículo, Corpo Caloso com afilamento difuso, Adenoipófise de tamanho reduzido, Neuroipófise não visualizada e Septo Pelúcido Vergae em neuroimagens. Núcleos Caudado, Putamen e Globo Pálido com leve

redução volumétrica e Vias Pré-Ópticas hipoplásicas, segundo um avaliador. DNPM atrasado e baixo rendimento escolar. Primo do pai com FLP.

Indivíduo 19: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 19°, DICI e perímetro cefálico não referidos. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 13°. Sem alterações encefálicas. DNPM e rendimento escolar normais. Sem referência de parentes afetados.

Indivíduo 20: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 22°, DICI entre P3 e P25, microcefalia. Cariótipo não referido e variante patogênica Ser208Stop no gene *SHH*. Ângulo Silviano foi de 11°. Sem alterações encefálicas. DNPM normal e rendimento escolar não informado. Sem parentes afetados.

Indivíduo 21: feminino, FL/P, sem perfil plano, Ângulo Nasofacial de 24°, hipotelorismo, microcefalia. Cariótipo normal e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 10°. Sem alterações encefálicas. DNPM e rendimento escolar normais. Sem parentes afetados.

Indivíduo 22: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 13°, hipertelorismo, microcefalia. Cariótipo normal e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 12°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Sem parentes afetados.

Indivíduo 23: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 15°, DICI entre P25 e P50, microcefalia. Cariótipo normal e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 13°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Sem parentes afetados.

Indivíduo 24: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 15°, hipotelorismo, sem microcefalia. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 12°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Prima materna com FLP.

Indivíduo 25: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 22°, DICI entre P3 e P25, microcefalia. Cariótipo normal e variante patogênica Pro1226Ile no gene *GLI2*. Ângulo Silviano foi de 11°. Cornos anteriores dos Ventrículos Laterais malformados, ausência da porção anterior do Corpo Caloso e do Septo Pelúcido em neuroimagens. DNPM normal e rendimento escolar não informado. Sem parentes afetados.

Indivíduo 26: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 22°, DICl entre P25 e P50, sem microcefalia. Cariótipo e MLPA normais e não tem análise molecular. Ângulo Silviano não aferido. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Primos maternos com ICSU.

Indivíduo 27: feminino, FP, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 12°, DICl no P25, sem microcefalia. Cariótipo normal e não tem análise molecular. Ângulo Silviano foi de 12°, Ventrículos Laterais dilatados, clivagem anormal dos Núcleos Caudado, Putamen, Globo Pálido e da região do Tálamo e Hipotálamo em neuroimagens. Segundo um dos avaliadores, o Corpo Caloso estava malformado, com afilamento do genu e do esplênio, e a porção do corpo não pode ser avaliada pela falta de sequências sagitais. DNPM atrasado e rendimento escolar não informado. Sem parentes afetados.

Indivíduo 28: feminino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 17°, hipotelorismo, sem microcefalia. Cariótipo normal e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano não aferido. Adenoipófise de tamanho reduzido e Neuroipófise não visualizada em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Sem parentes afetados. Este indivíduo apresentava várias deficiências de hormônios hipofisários.

Indivíduo 29: masculino, FL/P, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 19°, DICl entre P50 e P75, sem microcefalia. Cariótipo normal e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano não aferido. Separação incompleta dos Ventrículos Laterais, clivagem anormal dos Núcleos Caudado, Putamen, Globo Pálido e da região do Tálamo e Hipotálamo, ausência da porção anterior do Corpo Caloso e do Septo Pelúcido em neuroimagens. DNPM atrasado e baixo rendimento escolar.

Indivíduo 30: feminino, FL/P mediana, perfil plano, Ângulo Nasofacial de 11°, hipotelorismo, microcefalia. Cariótipo normal e sem variante patogênica em sete genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 12°. Adenoipófise de tamanho reduzido e Neuroipófise não visualizada em neuroimagens. DNPM não referido e rendimento escolar normal. Irmão com FLP, problemas de coração, e genital malformado. Este indivíduo apresentava várias deficiências de hormônios hipofisários.

Indivíduo 31: feminino, FL/P, sem perfil plano, Ângulo Nasofacial 31°, hipotelorismo, microcefalia. Cariótipo não referido e sem variante patogênica em sete

genes pesquisados. Ângulo Silviano foi de 17°. Sem alterações encefálicas em neuroimagens. DNPM e rendimento escolar normais. Mãe com estrabismo e irmão com incisivos centrais tortos. Foi referido que este indivíduo apresentava baixa estatura.

ANEXO

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa do HRAC-USP **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Fenótipo de Holoprosencefalia minor: Investigação por imagem do Sistema Nervoso Central

Pesquisador: Maria Cristina Crês

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79798817.5.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.405.411

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Tese de Doutorado, de autoria de MARIA CRISTINA CRÊS sob orientação de Antonio Richieri da Costa e co-orientação de Célia Regina Nogueira. Neste estudo pretende-se realizar uma reavaliação retrospectiva de exames de neuroimagens de indivíduos com fenótipo de Holoprosencefalia (HPE) minor ou Microformas e correlacionar as possíveis alterações encontradas com os achados fenotípicos e sua evolução clínica. Serão selecionados, no mínimo, 25 indivíduos atendidos no ambulatório do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), Bauru / SP, Brasil, com fenótipo de HPE minor, previamente diagnosticado por geneticistas clínicos deste hospital, e sem as alterações clássicas da HPE nas imagens de ressonância magnética. As neuroimagens serão analisadas por, pelo menos, dois radiologistas, seguindo um roteiro previamente estabelecido, com enfoque nas estruturas originárias do prosencéfalo. Os resultados encontrados na avaliação dos exames de neuroimagens serão comparados com os achados clínicos por meio do teste do Qui-quadrado, e os achados clínicos serão representados por meio de seus percentuais.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar neuroimagens, obtidas através de exames de Ressonância Magnética (RM), de indivíduos

Endereço: Rua Silvío Marchione, 3-20
Bairro: Vila Nova Cidade Universitária **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 2.405.411

atendidos no HRAC-USP, com diagnóstico de HPE menor, buscando anomalias do sistema nervoso central (encéfalo) e suas associações clínicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Neste caso, por ser um estudo com base em análise de dados secundários, não há riscos aos participantes da pesquisa.

Benefícios:

Podem ser considerados benefícios indiretos aos participante da pesquisa:

- ter uma reavaliação mais minuciosas dos seus exames de imagem de encéfalo, podendo, eventualmente, resultar em uma reavaliação do prognóstico, da conduta e do aconselhamento genético,
- contribuir para ampliar o conhecimento científico sobre a HPE, podendo beneficiar também outros pacientes com a mesma patologia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa retrospectiva com fundamentação teórica e mérito científico sem impedimentos éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos foram apresentados adequadamente:

Carta de encaminhamento;

Formulário HRAC;

Folha de Rosto da Plataforma Brasil;

Termo de Compromisso de Manuseio de Informações;

Termo de Permissão para uso de Registros para Fins Científicos;

Termo de Compromisso de Tornar Públicos os Resultados da Pesquisa e Destinação de Materiais ou Dados Coletados;

Termo de Compromisso do Pesquisador Responsável.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação do projeto, uma vez que, não foram observadas inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deve atentar que o projeto de pesquisa aprovado por este CEP refere-se ao protocolo submetido para avaliação. Portanto, conforme a Resolução CNS 466/12, o pesquisador é responsável por "desenvolver o projeto conforme delineado", se caso houver alterações nesse

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20

Bairro: Vila Nova Cidade Universitária

CEP: 17.012-900

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 2.405.411

projeto, este CEP deverá ser comunicado em emenda via Plataforma Brasil, para nova avaliação. Cabe ao pesquisador notificar via Plataforma Brasil o relatório final para avaliação. Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos e/ou outros Termos obrigatórios assinados pelos participantes da pesquisa deverão ser entregues ao CEP. Os relatórios semestrais devem ser notificados quando solicitados no parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Checklist_Prot_Pesq_120_2017.pdf	10/11/2017 13:12:54	Rafael Mattos de Deus	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1026529.pdf	10/11/2017 09:35:58		Aceito
Outros	Term_Comp_Tornar_Publico_Dest_Mat.pdf	10/11/2017 09:33:37	Maria Cristina Crês	Aceito
Outros	Term_Comp_Pesq_Resp.pdf	10/11/2017 09:33:13	Maria Cristina Crês	Aceito
Outros	Term_Comp_Manuseio_Inform.pdf	10/11/2017 09:32:53	Maria Cristina Crês	Aceito
Outros	Carta_Encaminham.pdf	10/11/2017 09:32:27	Maria Cristina Crês	Aceito
Outros	Term_Perm_Uso_Registro_CresMC.docx	10/11/2017 09:31:34	Maria Cristina Crês	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Form_Cadastro_HRAC.pdf	10/11/2017 09:30:26	Maria Cristina Crês	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutorado_HPE_minor_RM_outubro_2017.docx	10/11/2017 09:29:56	Maria Cristina Crês	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	09/11/2017 18:13:19	Maria Cristina Crês	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
Bairro: Vila Nova Cidade Universitária **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 2.405.411

BAURU, 29 de Novembro de 2017

Assinado por:
Renata Paciello Yamashita
(Coordenador)

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
Bairro: Vila Nova Cidade Universitária **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** cephrac@usp.br