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

FRANCINE PINHEIRO FAVARO

**Investigação de loco gênico em famílias com
síndrome Richieri-Costa-Pereira**

**BAURU
2013**

FRANCINE PINHEIRO FAVARO

**Investigação de loco gênico em famílias com
síndrome Richieri-Costa-Pereira**

Tese apresentada 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.

Orientadora: Dra. Maria Leine Guion de Almeida

**BAURU
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

Rua Silvio Marchione, 3-20
Caixa Postal: 1501
17012-900 - Bauru – SP – Brasil
Telefone: (14) 3235-8000

Prof. Dr. João Grandino Rodas – Reitor da USP
Dra. Regina Célia Bortoleto Amantini – Superintendente do HRAC-USP

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

Francine Pinheiro Favaro

Bauru, ____ de _____ de ____.

Favaro, Francine Pinheiro

F278i Investigação de loco gênico em famílias com síndrome Richieri-Costa-Pereira / Francine Pinheiro Favaro. Bauru, 2013.

158 p.; il.; 30cm.

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

Orientadora: Dra. Maria Leine Guion de Almeida

1. Síndrome Richieri-Costa-Pereira. 2. Disostose acrofacial. 3. Expansão 5' UTR. 4. *EIF4A3*.

CDD 573.21

FOLHA DE APROVAÇÃO

Francine Pinheiro Favaro

Tese apresentada 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.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Dra. Maria Leine Guion de Almeida – Orientadora

Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - USP

Profa. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP

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

FRANCINE PINHEIRO FAVARO

Nascimento	30 de julho de 1985 Bariri – SP
2003 -2008	Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Modalidade Médica pela Universidade Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Botucatu.
2005 - 2008	Estagiária no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB – UNESP e na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.
2006 - 2008	Bolsista FAPESP no Laboratório de Estudo das Alterações Epigenéticas em Neoplasias Humanas – UNESP – Botucatu. Projeto de Iniciação Científica: "Caracterização de alterações epigenéticas em carcinomas vesicais".
2012	Estagiária no Children´s Hospital of Eastern Ontario Research Institute, Ottawa, Ontário, Canadá.
2008 - 2013	Curso de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, nível Doutorado Direto, no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e meus caminhos.

Aos Meus Pais, responsáveis por eu estar aqui hoje, pelo interesse demonstrado em todos os momentos e à motivação para enfrentar todas as dificuldades.

Ao meu noivo David, pelo amor, pelo seu companheirismo, seu carinho, sua compreensão, sua paciência, pela pessoa extremamente importante que é para mim e por fazer com que eu perseverasse diante das muitas dificuldades com que eu me deparei durante a realização desse trabalho, e diante delas me ajudando a me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus irmãos, pelos conselhos e incentivo à perseverança.

A minha grande amiga Cida, pela torcida, pela companhia, pelas conversas, pelo apoio, incentivo, pelos inúmeros conselhos e muitas risadas.

As amigas de laboratório, Cintia, Melina, Simone, Andreza, Larissa, Vanessa, Joana, pela amizade, ajuda em qualquer situação e risadas, muitas risadas... com vocês a rotina diária se tornou muito mais prazerosa!

A Priscila, Juliana, Camila, Nancy, Siulan e Daniela, amigas de setor, pela companhia e pelas risadas descontraídas durante o período de estudo.

A Dra. Lucilene por me permitir utilizar o laboratório para realização de eventuais experimentos.

Aos amigos verdadeiros, que mesmo longe, contribuíram para a minha formação e para o que sou hoje...

Ao Dr. Richieri, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e de permitir que eu estudasse a síndrome Richieri-Costa-Pereira.

A Dra. Maria Rita Passos Bueno, pelo interesse em tornar possível essa pesquisa e pela perseverança e otimismo na possibilidade de alcançarmos nosso objetivo final.

A Dra. Roseli Maria Zechi Ceide, pelas tantas explicações, considerações e correções, pelos conselhos e pela ajuda nos momentos mais críticos.

À minha orientadora Dra. Maria Leine Guion de Almeida, pelo incentivo e aprendizado, e por mostrar que dedicação e vontade são fundamentais para a formação de um profissional diferencial...

A Fapesp, pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

*“Nasceste no lar que precisavas,
Vestiste o corpo físico que merecias,
Moras onde melhor Deus te proporcionou,
De acordo com teu adiantamento.
Possuís os recursos financeiros coerentes
Com as tuas necessidades, nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.
Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização.
Teus parentes, amigos são as almas que atraíste, com tua própria afinidade.
Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle.
Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a
existência.
Teus pensamentos e vontade são a chave de teus atos e atitudes...
São as fontes de atração e repulsão na tua jornada vivência
Não reclames nem te faças de vítima.
Antes de tudo, analisa e observa.
A mudança está em tuas mãos.
Reprograma tua meta,
Busca o bem e viverás melhor.
Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
Qualquer Um pode Começar agora e fazer um Novo Fim.”*

Chico Xavier

RESUMO

Favaro FP. Investigação de loco gênico em famílias com síndrome Richieri-Costa-Pereira [tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: A síndrome Richieri-Costa-Pereira (SRCP; OMIM 268305) é uma disostose acrofacial autossômica recessiva caracterizada por fissura mandibular mediana associada a outros defeitos craniofaciais e de membros. **Objetivo:** Mapear o gene causador da SRCP. **Métodos e Resultados:** O gene da doença foi mapeado para uma região de 128.5kb no cromossomo 17q25.3, por meio de análise de identidade por descendência, em 22 genealogias. As estratégias de sequenciamento identificaram ampliação de motivos com 18 ou 20 nucleotídeos da região 5' não traduzida (5' UTR) do gene *EIF4A3*. Observou-se 15 ou 16 repetições dos motivos nos indivíduos afetados e de 3 a 12 repetições nos indivíduos do grupo controle (520 indivíduos). Estudo de expressão detectou níveis de transcrição do gene *EIF4A3* acentuadamente reduzidos nas células brancas do sangue de um dos indivíduos com SRCP, quando comparado aos cinco controles testados. Estudo funcional por meio de modelamento do ortólogo *eif4a3* em *zebrafish* resultou no subdesenvolvimento de estruturas cartilaginosas e ósseas craniofaciais derivadas do primeiro ao quinto arcos faríngeos, similar às alterações craniofaciais observadas nos indivíduos com SRCP. **Conclusão:** Estes estudos confirmam que a SRCP é causada por deficiência de *EIF4A3* e, ainda, que esse gene é essencial para a morfogênese da mandíbula, da laringe e dos membros, importantes estruturas comprometidas na SRCP.

Palavras-chave: Síndrome Richieri-Costa-Pereira. Disostose acrofacial. Expansão 5' UTR. *EIF4A3*.

ABSTRACT

Favaro FP. Genic locus investigation in families with Richieri-Costa-Pereira syndrome [thesis]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2013.

Introduction: Richieri-Costa-Pereira syndrome (RCPS; MIM#268305) is an autosomal recessive acrofacial dysostosis characterized by mandibular median cleft associated with other craniofacial and limb defects. **Purpose:** Map the gene that causes the SRCP. **Methods and Results:** We mapped the disease gene to a 128.5kb region on chromosome 17q25.3 through identity-by-descent analysis in 22 genealogies. Sequencing strategies identified an expansion of a complex region with several repeats of 18 or 20-nucleotide motifs in the 5' untranslated region (5'UTR) of *EIF4A3*, which contained from 15 or 16 repeats in the affected patients and from 3 to 12 repeats in 520 healthy individuals. *EIF4A3* transcriptional levels were markedly reduced in white blood cells of a RCPS patient as compared to controls. Furthermore, modeling of the ortholog *eif4a3* in zebrafish lead to underdevelopment of several cartilage and bone craniofacial structures derived from the 1st to 5th pharyngeal arches, in agreement with the craniofacial alterations of RCPS. **Conclusion:** These studies thus confirm that RCPS is caused by deficiency of *EIF4A3*, and assign *EIF4A3* for the first time as essential for mandibular and also for larynx and limb morphogenesis, important structures impaired in RCPS.

Keywords: Richieri-Costa-Pereira syndrome. Acrofacial dysostosis. 5' UTR expansion. *EIF4A3*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A. Vista frontal de um embrião de aproximadamente 24 dias. B. Vista frontal de um embrião com arcos mandibulares fusionados.....	34
Figura 2 -	Imagens da mandíbula em feto de 12 semanas. Cartilagem de Meckel visível (azul) no centro do osso neoformado (rosa). A. Visão lateral externa esquerda. B. Visão lateral externa direita.....	36
Figura 3 -	Vista frontal da mandíbula adulta. Pode-se observar a protuberância mental.....	36
Figura 4 -	Desenvolvimento dos brotos dos membros de embrião humano. A. Embrião com 5 semanas de desenvolvimento. B. embrião com 6 semanas de desenvolvimento. C. embrião com 8 semanas de desenvolvimento....	39
Figura 5 -	Sequência mostrando o desenvolvimento inicial dos ossos dos membros superiores. A. 28 dias. B. Ampliação do que está salientado em A. C. 33 dias. D. 6 semanas. E. 7 semanas.....	40
Figura 6 -	Representação esquemática da metodologia de <i>microarray</i> de SNP da plataforma <i>Affymetrix Gene Chips mapping</i> 100K modificado de <i>Affymetrix</i> (2004)	43
Figura 7 -	Isoformas do gene <i>EIF4A3</i> . A segunda isoforma é a que contém as repetições de interesse.....	91
Figura 8 -	Diagrama representando as regiões de homozigose (traçado vermelho) entre os indivíduos afetados genotipados	98
Figura 9 -	Diagrama representando as regiões de homozigose (traçado vermelho) entre os indivíduos afetados genotipados	106
Figura 10 -	Diagrama representando as regiões de homozigose (traçado vermelho) entre os indivíduos genotipados.....	108
Figura 11 -	Representação do padrão das repetições na 5'UTR do gene <i>EIF4A3</i> . (a, b) Alelos controles: nota-se que o número de motivos CA-18 nt variaram entre os diferentes padrões de alelos (d, e) alelos afetados: os alelos com 15 e 16 repetições têm a mesma estrutura de base	115

Figura 12 -	Gel de agarose do indivíduo 3 e de 16 controles normais.....	115
Figura 13 -	Gráfico representativo da expressão do gene <i>EIF4A3</i> no indivíduo afetado, na mãe e em 5 controles normais.....	116
Figura 14 -	A coloração com laranja de Acridina revelou um processo massivo de apoptose em morfantes <i>eif4a3</i> 24 hpf (A. vista lateral, anterior para a direita) em comparação ao grupo controle (B. vista lateral, anterior para a direita).....	117
Figura 15 -	Expressão de <i>p53</i> e <i>p21</i>	117
Figura 16 -	Vista lateral do controle (A) e do morfante <i>eif4a3</i> (B) em 24 hpf. Regiões da retina e mesencéfalo-rombencéfalo mostraram uma pigmentação escura (linhas pontilhadas), sugerindo a presença de células em apoptose. Seta em B indica o subdesenvolvimento das proeminências frontais cranianas no morfante <i>eif4a3</i>	118
Figura 17 -	A coloração de azul de Alcian (A e B , vista lateral, anterior para a direita; (C-F , vista ventral) revelou hipoplasia de numerosas cartilagens craniofaciais. Hipoplasia craniofacial é evidente nos elementos frontais, pré-maxilar e maxilar (asteriscos). A , C e E : controles. B , D e F : morfantes <i>eif4a3</i>	118
Figura 18 -	Coloração de Calceína mostra esqueleto ósseo de larvas 5dpf (vista dorsal, anterior à direita). Exceto para os ossos do ouvido interno (seta em B), não há evidências de processo de ossificação normal em morfantes <i>eif4a3</i> . A : controle. B : morfante <i>eif4a3</i>	119
Figura 19 -	Marcadores de crista neural. Expressão de marcadores da crista neural, <i>foxd3</i> , <i>sox10</i> , <i>sox9b</i> e <i>tbx2</i> estão significativamente reduzidos em morfantes <i>eif4a3</i> de zebrafish (MO) em comparação com o controle (mismatch morfante CTRL) ($p < 0,05$)	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caraterísticas dos marcadores microssatélites do painel <i>ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0; Perkin-Elmer, Apllied Biosystem.....</i>	61
Tabela 2 -	Características dos marcadores microssatélites do banco de dados <i>online NCBI</i>	64
Tabela 3 -	Caraterísticas dos SNPs do banco de dados <i>online NCBI</i> , bem como seus primers especificamente desenhados	67
Tabela 4 -	Primers desenhados para sequenciamento do gene <i>CBX8</i> e suas características.....	78
Tabela 5 -	Primers desenhados para sequenciamento do gene <i>CARD14</i> e suas características.....	82
Tabela 6 -	Primers desenhados para sequenciamento do gene <i>CCDC40</i> e suas características.....	84
Tabela 7 -	Primers desenhados para sequenciamento do gene <i>EIF4A3</i> e suas características.....	86
Tabela 8 -	Primers desenhados para sequenciamento das alterações obtidas pelo sequenciamento do exoma e suas características.....	88
Tabela 9 -	Valores de SNP <i>Call</i> obtidos para as enzimas <i>XbaI</i>	97
Tabela 10 -	Regiões de homozigose dos indivíduos genotipados por <i>microarray</i> de SNP (<i>Affymetrix GeneChips mapping 100K</i>) encontradas pelo <i>Homozygosity Mapper</i>	98
Tabela 11 -	Genótipos da região do cromossomo 17, escolhida para ser analisada através de análise de ligação, fornecida pelo <i>Homozygosity Mapper</i> . (Observar em destaque vermelho, os dois SNPs informativos).....	99-101
Tabela 12 -	Valores de SNP <i>Call</i> obtidos para as enzimas <i>HindIII</i>	102
Tabela 13 -	Valores de SNP <i>Call</i> obtidos para as enzimas <i>NspI</i>	105

Tabela 14 -	Regiões de homozigose dos indivíduos genotipados por <i>microarray</i> de SNP (<i>Affymetrix GeneChips mapping 500K</i>) encontradas pelo <i>Homozygosity Mapper</i>	106
Tabela 15 -	Genótipos da região do cromossomo 17	107
Tabela 16 -	Valores de SNP <i>Call</i> obtidos para as enzimas <i>StyI</i>	108
Tabela 17 -	Regiões de homozigose dos indivíduos genotipados por <i>microarray</i> de SNP (<i>Affymetrix GeneChips mapping 500K</i>) encontradas pelo <i>Homozygosity Mapper</i>	109
Tabela 18 -	Genótipos da região do cromossomo 17	109
Tabela 19 -	Genótipo dos indivíduos afetados e familiares quanto à expansão da região 5' UTR do gene <i>EIF4A3</i>	113
Tabela 20 -	Valores de expressão do gene <i>EIF4A3</i>	116

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	ASPECTOS CLÍNICOS DA SÍNDROME RICHIERI-COSTA-PEREIRA	29
2.2	ASPECTOS GENÉTICOS DA SRCP	30
2.3	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA SRCP	31
2.3.1	Síndrome de Nager	31
2.3.2	Síndrome Genée-Wiedemann	32
2.3.3	Disostose acrofacial tipo Guion-Almeida	33
2.4	ASPECTOS EMBRIOLÓGICOS	33
2.4.1	Desenvolvimento facial e genes relacionados	33
2.4.2	Desenvolvimento dos membros e genes relacionados	39
2.5	ESTRATÉGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES	42
3	PROPOSIÇÃO	45
4	INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA	49
4.1	CASUÍSTICA	51
4.2	METODOLOGIA	51
4.2.1	Coleta de sangue e extração de DNA genômico	51
4.2.2	Estudo molecular	52
4.2.2.1	Análise genômica	52
4.2.2.1.1	<u>Microarray de SNP (Affymetrix GeneChips mapping 100K)</u>	52
4.2.2.1.1.1	Diluição do DNA genômico	53
4.2.2.1.1.2	Digestão com enzimas de restrição	53
4.2.2.1.1.3	Ligação ao adaptador	54
4.2.2.1.1.4	PCR do produto da ligação	54
4.2.2.1.1.5	Purificação da PCR	55
4.2.2.1.1.6	Fragmentação	56
4.2.2.1.1.7	Marcação com biotina (Labelling)	56
4.2.2.1.1.8	Hibridização da sonda com o chip de SNPs	57
4.2.2.1.1.9	Lavagem e escaneamento dos chips	58
4.2.2.1.1.10	Análise de dados	59

4.2.2.1.2	<u>Análise de ligação com marcadores moleculares e análise de gene candidato.....</u>	60
4.2.2.1.2.1	<i>Análise de ligação com marcadores microsatélites do painel ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0; Perkin-Elmer, Applied Biosystem.....</i>	60
4.2.2.1.2.1.1	Reação de PCR.....	62
4.2.2.1.2.2	<i>Análise de ligação com marcadores microsatélites do Banco de Dados Online NCBI.....</i>	63
4.2.2.1.2.2.1	Reação de PCR.....	65
4.2.2.1.2.3	<i>Análise de ligação com SNPs do Banco de Dados Online do NCBI</i>	66
4.2.2.1.2.3.1	Reação de PCR.....	68
4.2.2.1.3	<u>Microarray de SNP (Affymetrix GeneChips mapping 500K).....</u>	70
4.2.2.1.3.1	<i>Diluição do DNA genômico</i>	70
4.2.2.1.3.2	<i>Digestão com enzimas de restrição</i>	70
4.2.2.1.3.3	<i>Ligação ao adaptador</i>	71
4.2.2.1.3.4	<i>PCR do produto da ligação.....</i>	72
4.2.2.1.3.5	<i>Purificação da PCR.....</i>	73
4.2.2.1.3.6	<i>Fragmentação</i>	73
4.2.2.1.3.7	<i>Marcação com biotina (Labelling).....</i>	74
4.2.2.1.3.8	<i>Hibridização da sonda com o chip de SNPs</i>	74
4.2.2.1.3.9	<i>Lavagem e escaneamento dos chips.....</i>	75
4.2.2.1.3.10	<i>Análise de dados.....</i>	76
4.2.2.1.4	<u>Sequenciamento de genes candidatos.....</u>	77
4.2.2.1.4.1	<i>CBX8</i>	77
4.2.2.1.4.1.1	Reação de PCR.....	79
4.2.2.1.4.2	<i>CARD14.....</i>	81
4.2.2.1.4.3	<i>CCDC40</i>	83
4.2.2.1.4.4	<i>EIF4A3</i>	85
4.2.2.1.5	<u>Sequenciamento do exoma.....</u>	87
4.2.2.1.5.1	<i>Sequenciamento de Sanger das alterações encontradas no sequenciamento do exoma.....</i>	87
4.2.2.1.6	<u>Sequenciamento da região 5' UTR e éxon 1 do gene EIF4A3.....</u>	89
4.2.2.2	<i>Análise de expressão do gene EIF4A3</i>	89
4.2.2.2.1	<u>Extração de RNA.....</u>	89

4.2.2.2.2	Síntese de cDNA.....	90
4.2.2.2.3	PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)	91
4.2.3	Estudo funcional do gene <i>Eif4a3</i> em modelo animal (<i>zebrafish</i>)	93
5	RESULTADOS	95
5.1	ESTUDO DE LIGAÇÃO POR MICROARRAY DE SNP (<i>AFFYMETRIX</i> <i>GENECHIPS MAPPING 100K</i>)	97
5.1.1	<i>Microarray</i> de SNP com a enzima <i>XbaI</i>	97
5.1.2	<i>Microarray</i> de SNP com a enzima <i>HindIII</i>	102
5.2	ESTUDO DE LIGAÇÃO POR MARCADORES MOLECULARES	103
5.2.1	Estudo de ligação por marcadores microssatélites do painel ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0.....	103
5.2.2	Estudo de ligação com marcadores microssatélites do Banco de Dados Online <i>NCBI</i>	103
5.2.3	Estudo de ligação com SNPs do Banco de Dados Online do <i>NCBI</i>	104
5.3	ESTUDO DE LIGAÇÃO POR MICROARRAY DE SNP (<i>AFFYMETRIX</i> <i>GENECHIPS MAPPING 500K</i>)	104
5.3.1	<i>Microarray</i> de SNP com a enzima <i>NspI</i>	105
5.3.2	<i>Microarray</i> de SNP com a enzima <i>StyI</i>	107
5.4	SEQUENCIAMENTO DE GENES CANDIDATOS	110
5.5	ANÁLISE DOS DADOS DO SEQUENCIAMENTO DO EXOMA E SEQUENCIAMENTO DE SANGER DAS REGIÕES ALTERADAS E DE BAIXA COBERTURA	111
5.6	SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 5' UTR E ÉXON 1 DO GENE <i>EIF4A3</i>	112
5.7	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE <i>EIF4A3</i>	116
5.8	ESTUDO FUNCIONAL DO GENE <i>EIF4A3</i> EM MODELO ANIMAL (<i>ZEBRAFISH</i>)	117
6	DISCUSSÃO	121
7	CONCLUSÕES	127
	REFERÊNCIAS	131
	APÊNDICES	143
	ANEXOS	155

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do embrião envolve uma sequência de eventos complexos e altamente integrados, o que requer crescimento e fusão coordenados de muitos tecidos especializados. O desenvolvimento compreende três fases sucessivas, sendo que as duas primeiras constituem o estágio embrionário e a terceira, o estágio fetal. A primeira fase (da fertilização até a 4ª semana de gestação) é caracterizada por grande proliferação e migração celular; a segunda fase (4ª - 8ª semana de gestação), também conhecida como morfogênese, é caracterizada pela diferenciação de todas as estruturas maiores e, a terceira fase caracteriza-se por crescimento e maturação do embrião, que passa a ser chamado de feto.

O modelamento craniofacial depende da adequada formação do tubo neural, da segmentação do sistema nervoso central e da migração das células da crista neural cranial para os arcos faríngeos (Ten Cate 2003). Alterações na complexa rede sinalizadora que coordena o desenvolvimento craniofacial, resultantes da expressão alterada ou insuficiente de diversos genes ou de insultos ambientais ou, ainda, da combinação de ambos, podem resultar em uma ampla variedade de anomalias craniofaciais (Dixon e Dixon 2004 e Chai e Maxson 2006). Alterações na rede sinalizadora do primeiro e do segundo arco faríngeo resultam em desenvolvimento anormal da face, incluindo anomalias de face média, mandibulares e auriculares, observadas em um extenso grupo de síndromes (Cobourne 2000, Gorlin, Cohen e Hennekan 2001 e Passos-Bueno, Ornelas e Fanganiello 2009), muitas das quais, de etiologia e patogênese desconhecidas. Dentre elas, destacam-se as disostoses mandibulofaciais.

A disostose mandibulofacial (DMF), defeito de desenvolvimento de primeiro e segundo arcos faríngeos, compreende um grupo de condições caracterizadas, principalmente, por anomalias do arco zigomático e hipoplasia mandibular (Graham e Smith 2001). Dentre as condições que cursam com DMF, a mais comum é a síndrome de Treacher Collins (OMIM 154500) (Splendore et al 2000, Masotti et al 2005 e Dixon, Trainor e Dixon 2007). A associação de anomalias faciais típicas de DMF a vários tipos de defeitos de membros representa um outro grupo raro e heterogêneo de síndromes, denominado *disostoses acrofaciais* (DAF). Em recente revisão sobre as disostoses faciais, Wieczorek (2013) classificou as DAF, conforme os achados clínicos, em DAF pré-axial, DAF pós-axial e outras DAFs. As síndromes mais frequentes nesse grupo são a síndrome de Nager (OMIM 154400),

a síndrome de Genée-Wiedemann (OMIM 263750), a disostose acrofacial tipo Guion-Almeida (OMIM 610536) e a síndrome Richieri-Costa-Pereira (OMIM 268305).

A síndrome Richieri-Costa-Pereira (OMIM 268305), foco do presente trabalho, é um quadro genético raro, de herança autossômica recessiva, com alto índice de casamentos consanguíneos e, ainda, com a maioria dos afetados concentrados em uma região restrita do Brasil (Vale do Ribeira-SP), o que sugere a existência de ancestral comum em uma população geneticamente isolada (*efeito do fundador*). Clinicamente, é caracterizada por micrognatia acentuada, microstomia, fissura mandibular e anomalias pré e pós-axiais de membros. Apesar de aceito o padrão de herança autossômico recessivo para a síndrome Richieri-Costa-Pereira e, da tentativa de identificação gênica (Lima et al 2003), até o início do presente estudo o gene causador permanecia desconhecido. Com o avanço da biotecnologia, surgiram técnicas mais eficientes de genotipagem, tendo como base a hibridização com múltiplas sondas de DNA num único experimento e, ainda, o sequenciamento do exoma e do genoma. A utilização dessas tecnologias inovadoras tem se mostrado de grande utilidade nos estudos de identificação gênica e, populações geneticamente isoladas (como proposto para a distribuição dos afetados com síndrome Richieri-Costa-Pereira) são importantes na identificação de genes recessivos (Arcos-Burgos e Muenkea 2002 e Strachan e Read 2002).

Atualmente, 30 indivíduos (pertencentes a 26 famílias) com SRCP estão cadastrados na Seção de Genética Clínica do HRAC-USP-Bauru e, 28 desses foram publicados (Favaro et al 2011), o que representa cerca de 82% do total de casos descritos na literatura (Raskin et al 2013). O número de famílias informativas com SRCP associada à possibilidade de uso de técnicas inovadoras de genotipagem e sequenciamento, nesse caso a análise de ligação através de microarray de SNP e o sequenciamento do exoma, deu subsídios para a realização do presente estudo, com a finalidade de contribuir na identificação do gene causador dessa condição. Para que esse objetivo fosse alcançado estabeleceu-se colaboração com o grupo da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno (Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil), do Prof. Dr. Andrew O. M. Wilkie (*Clinical Genetics Group, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK*) e da Profa. Dra. Nora Calcaterra (*Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Em 1992, Richieri-Costa e Pereira descreveram cinco crianças brasileiras, pertencentes a cinco famílias não relacionadas, com um conjunto de anomalias caracterizado por baixa estatura, sequência de Robin, fissura de mandíbula e anomalias pré e pós-axiais de membros superiores e inferiores. Essa combinação de achados clínicos foi considerada pelos autores como síndrome nova. Consanguinidade parental e/ou recorrência horizontal nas famílias descritas levaram os autores a considerarem a hipótese de herança autossômica recessiva para essa nova síndrome. Devido ao fato de os meninos afetados terem ido a óbito precocemente e de um deles ter apresentado apodia, os autores consideram a possibilidade de a condição ser causada por gene subletal para o gênero masculino. No entanto, em 1993 Richieri-Costa e Pereira observaram a ocorrência dessa síndrome em dois meninos, um com 12 meses e outro com 13 anos, que ao contrário do proposto anteriormente, não apresentavam quadro clínico mais grave do que o observado nas meninas afetadas. A partir de então outros 20 casos (19 brasileiros e um francês) foram publicados. Achados adicionais, como fusão anormal da mandíbula, anomalias dentárias, auriculares e de laringe foram observados (Tabith e Bento-Gonçalves 1996, Richieri-Costa e Brandão-Almeida 1997, Guion-Almeida e Richieri-Costa 1998, Walter-Nicolet et al 1999, Tabith e Bento-Gonçalves 2003, Golbert et al 2007, Graziadio et al 2009, Favaro et al 2011, Souza et al 2011, Galante-Severini et al 2012 e Miguel et al 2012).

2.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA SÍNDROME RICHIERI-COSTA-PEREIRA*

A síndrome Richieri-Costa-Pereira (SRCP) tem como critérios mínimos para o diagnóstico, fissura ou fusão anormal de mandíbula e anomalias pré e pós-axiais de membros. Os achados clínicos descritos incluem:

Crescimento: baixa estatura

Cabeça e pescoço

Face: retromicrognatia;

* Dados obtidos de OMIM 268305 (Favaro et al 2011, Galante-Severini et al 2012 e Miguel et al 2012).

Orelhas: implantação baixa; proeminentes;

Nariz: proeminente;

Boca: microstomia;

Região oral: fissura de borda alveolar inferior, palato alto e arqueado; fissura de palato; fissura de úvula; sequência de Robin;

Dentes: ausência de incisivos centrais inferiores e de pré-molares; opacidade de esmalte;

Laringe: laringe pequena e arredondada; epiglote ausente ou anômala; pregas subepiglóticas anômalas; microdiafragma laríngeo; anteriorização de aritenóides.

Esqueleto

Crânio: fissura mandibular; hipoplasia mandibular;

Membros: hipoplasia de rádio; hipoplasia de tíbia e de fíbula;

Mãos: hipoplasia e implantação proximal de polegares; clinodactilia de 5º dígito; desvio radial de mãos; hipoplasia de 1º metacarpo; hipoplasia de 1ª falange;

Pés: hipoplasia de háluces; pés tortos.

Voz: rouquidão; soprosidade.

2.2 ASPECTOS GENÉTICOS DA SRCP

Consanguinidade parental, recorrência horizontal, genitores fenotipicamente normais e, ainda, estudo citogenético normal, na maioria das famílias estudadas por Richieri-Costa e Pereira (1992, 1993), levaram esses autores a sugerirem a possibilidade da SRCP tratar-se de quadro autossômico recessivo. Com base na distribuição geográfica da maioria das famílias afetadas, concentradas em uma região restrita do Sul do Estado de São Paulo (Vale do Ribeira), Richieri-Costa e Pereira (1993) consideraram a possibilidade da existência de um ancestral comum entre as famílias e, portanto, com *efeito do fundador*. O conceito de *efeito do fundador* refere-se ao estabelecimento de uma nova população, por meio de um número pequeno de indivíduos os quais carregam consigo uma pequena fração da variação genética total da população de origem. Essa nova população se expande, podendo colonizar novos

ambientes. O nível alto de casamentos consanguíneos, nessa população isolada, resulta em aumento na incidência de doenças recessivas (Arcos-Burgos e Muenkea 2002). Favaro et al (2011), reforçaram as hipóteses de herança autossômica recessiva e *efeito do fundador* para SRCP devido ao fato de a maioria das famílias apresentarem recorrência horizontal, consanguinidade parental e estarem concentrados em uma região geográfica, isolados por barreira natural. Até o momento, apenas um caso não brasileiro foi descrito. Trata-se de um menino francês e filho de pais normais e consanguíneos. Os autores comentaram a possibilidade dos pais serem descendentes de brasileiros ou portugueses, portanto, não descartando a hipótese de um ancestral comum (Walter-Nicolet et al 1999).

Em 2003, Lima et al estudaram, do ponto de vista molecular, 15 indivíduos cadastrados no HRAC-USP-Bauru (pertencentes a 14 famílias não aparentadas), que apresentavam a SRCP. Por meio de análise de ligação, os autores genotiparam os indivíduos utilizando 497 marcadores polimórficos do *Cooperative Human Linkage Center (CHCL)* (www.marshfieldclinic.org), distribuídos ao longo do genoma, os quais foram complementados por marcadores adicionais (www-genome.wi.mit.edu). Realizaram, ainda, sequenciamento direto de 10 genes (*PAX9, MSX1, PITX1, DLX5, DLX6, PITX2, TBX4, TBX5, CLIMB2* e *FGF8*) que foram considerados candidatos por se expressarem durante o desenvolvimento da mandíbula e dos membros. Nenhuma evidência de ligação, para os marcadores testados, ou de mutação nos genes candidatos foi encontrada.

2.3 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA SRCP

O diagnóstico diferencial da SRCP inclui as DAF de forma geral (Wieczorek 2013), mas, principalmente, a síndrome de Nager, a síndrome de Genée-Wiedemann (OMIM 263750) e a disostose acrofacial tipo Guion-Almeida (OMIM 610536).

2.3.1 Síndrome de Nager

A síndrome de Nager (OMIM 154400) caracteriza-se pelos achados faciais de DMF associados ao comprometimento de primeiro raio. Os principais achados clínicos craniofaciais incluem: fissura palpebral inclinada para baixo, coloboma de pálpebras inferiores, ausência

total ou parcial dos cílios inferiores, ponte nasal alta, macrostomia, fissura de lábio e/ou palato, micrognatia, implantação baixa e rotação posterior das orelhas e deficiência auditiva. Achados esqueléticos incluem: hipoplasia do arco zigomático e da mandíbula, sinostose radioulnar, agenesia/hipoplasia radial, agenesia/hipoplasia dos polegares e pé torto, entre outros. A maioria dos casos descritos é esporádica e há evidência tanto de herança autossômica dominante quanto de herança autossômica recessiva (Kennedy e Teebi 2004, Dimitrov et al 2005 e Ansart-Franquet et al 2009). Recentemente estudos de Bernier et al (2012) identificaram o gene causador da síndrome de Nager. Os autores realizaram sequenciamento do exoma de 9 indivíduos com essa síndrome e identificaram mutações no gene *SF3B4*, um componente do complexo spliceossomal U2 do pré-RNA mensageiro, em todos os casos analisados. Os autores realizaram, ainda, sequenciamento de Sanger do gene *SF3B4* em outras 35 famílias com diagnóstico de síndrome de Nager (um total de 41 indivíduos afetados) e encontraram 18 mutações diferentes em 20 dessas famílias. A natureza dessas mutações (14 frameshift, 2 nonsense, 1 splicing e 1 missense) foi consistente com a haploinsuficiência do gene *SF3B4* como mecanismo patogênico da condição. De acordo os autores, seus resultados adicionaram a síndrome de Nager a uma lista crescente de doenças causadas por mutações em genes que codificam os principais componentes do spliceossomo. Entretanto, Czeschik et al (2013), ao detectarem mutação do gene *SF3B4* em aproximadamente metade dos indivíduos com síndrome de Nager, por eles analisados, sugeriram heterogeneidade genética para a condição.

2.3.2 Síndrome Genée-Wiedemann

A síndrome de Genée-Wiedemann (OMIM 263750), também denominada síndrome de Miller, caracteriza-se pelos achados faciais de DMF associados ao comprometimento de quinto raio. Os principais achados clínicos craniofaciais incluem: fissura palpebral inclinada para baixo, coloboma de pálpebras inferiores, ectrópio, fissura de lábio e/ou palato, micrognatia, implantação baixa das orelhas e deficiência auditiva. Achados esqueléticos incluem: hipoplasia malar, sinostose radioulnar, hipoplasia radial/ulnar, hipoplasia dos polegares e ausência do 5º dígito e artelho, entre outros (Miller, Fineman e Smith 1979 e Donnai, Hughes e Winter 1987). A maioria dos casos descritos é esporádica e há evidência tanto de herança autossômica dominante quanto de herança autossômica recessiva (Ng et al 2010b). Considerando o modelo

autossômico recessivo para estudo, Ng et al (2010b) identificaram, através de sequenciamento do exoma, mutações missenses heterozigotas compostas no gene *DHODH*, o qual codifica a enzima dihidrooorotato desidrogenase (DHodehase).

2.3.3 Disostose acrofacial tipo Guion-Almeida

A disostose acrofacial tipo Guion-Almeida (DAF tipo Guion-Almeida), também conhecida como disostose mandibulofacial tipo Guion-Almeida (OMIM 610536) é uma síndrome rara que compreende microcefalia, disostose mandibulofacial, hipoplasia do terço médio da face e do malar, micrognatia, fissura de palato, orelhas displásicas, apêndices pré-auriculares, anomalias de primeiro raio, grave atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e atraso de fala e de linguagem (Guion-Almeida et al 2006 e Wieczorek 2013). Outros sinais clínicos incluem atresia de coanas, resultando em dificuldade respiratória, perda auditiva condutiva, dermóide epibulbar, assimetria de face e fissura de arco zigomático (Guion-Almeida et al 2009, Wieczorek et al 2009, Luquetti et al 2013 e Wieczorek 2013). Recentemente estudos de Lines et al (2012) identificaram o gene causativo dessa DAF. Esses autores realizaram sequenciamento do exoma em 12 indivíduos, incluindo os casos 1 e 2 descritos por Guion-Almeida et al (2006) e, identificaram mutação heterozigota no gene *EFTUD2*, resultando em haploinsuficiência da proteína. O gene *EFTUD2* (*elongation factor TU GTP-binding domain-containing 2*) codifica um componente importante do spliceossoma, a proteína U5-116kD, a qual ocupa uma posição central dentro do spliceossoma, participando do processo de *splice*, o qual é obrigatório para a expressão gênica em todas as células.

2.4 ASPECTOS EMBRIOLÓGICOS

2.4.1 Desenvolvimento facial e genes relacionados

O processo de formação e desenvolvimento craniofacial é um evento complexo que requer formação, migração e diferenciação apropriadas das células derivadas da crista neural, as quais originam a borda do sistema nervoso em formação e migram extensivamente para diversos sítios no embrião. Na cabeça, células da crista neural cranial migram para os arcos

faríngeos e se diferenciam em ossos faciais e outros tecidos, assumindo papel importante no modelamento e na formação de estruturas da face (Ten Cate 2003 e McKeown e Bronner-Fraser 2008). A face se desenvolve ao redor da boca primitiva (*stomatodeum*) que é delimitada na porção rostral pela proeminência frontonasal (originada da flexão anterior da porção mais cranial do tubo neural), na porção caudal pelo desenvolvimento cardíaco e, lateralmente, pelo primeiro arco faríngeo (Junqueira e Zago 1982, Whiting 1997, Moore e Persaud 2000, Sadler 2001a e Ten Cate 2003) (Figura 1).

Fonte: Sadler (2001a)

Figura 1 - **A.** Vista frontal de um embrião de aproximadamente 24 dias. **B.** Vista frontal de um embrião com arcos mandibulares fusionados.

Nos vertebrados, há seis arcos faríngeos (em humanos, o 5º e o 6º arcos faríngeos são transitórios), os quais são separados por sulcos faríngeos (externamente) e por bolsas faríngeas (internamente). Eles são constituídos de uma lâmina de mesoderma, envolvida externamente por ectoderma e internamente, por endoderma. Cada arco faríngeo apresenta em seu interior, além do mesênquima, um eixo cartilaginoso, um ramo arterial e um ramo nervoso. Dois dos seis arcos faríngeos existentes estão envolvidos no desenvolvimento da face: o primeiro arco faríngeo, também chamado de arco mandibular, e o segundo, também chamado de arco hióideo. O arco mandibular torna-se aparente no estágio de 6 a 8 somitos como pequenas dilatações ao lado da cabeça em desenvolvimento. Ainda em estágio precoce (24 dias), torna-se evidente o processo maxilar (porção dorsal) o qual se estende abaixo e à frente da região dos olhos, crescendo medialmente e aproximando-se dos processos nasais mediais e laterais. O crescimento medial do processo maxilar empurra o processo nasal medial em direção à linha média onde ele se funde com sua contraparte.

Dessa forma, a fusão dos processos maxilares com o processo nasal medial forma o lábio superior. O mesênquima do processo maxilar origina a maxila, o osso zigomático e parte do osso temporal (Junqueira e Zago 1982 e Moore e Persaud 2000). O desenvolvimento da mandíbula depende da interação entre o ectoderma oral e as células da crista neural derivadas do mesênquima do primeiro arco faríngeo, as quais migram e se proliferam no arco mandibular que se desenvolve rapidamente em direção a linha média ventral, até que ocorra a fusão. Em adição, os processos mandibulares também se fundem nos cantos laterais com o processo maxilar e em suas bordas inferiores com o processo hióide (Mina 2001b). O eixo cartilaginoso do primeiro arco, cartilagem de Meckel, não se ossifica, mas induz o mesênquima vizinho a uma ossificação membranosa. A ossificação da mandíbula começa a efetuar-se na sexta semana de vida embrionária, mais precocemente do que a maioria dos ossos cranianos. O tecido conjuntivo ao redor da cartilagem de Meckel dá origem a duas lâminas ósseas, uma das quais está disposta látero-dorsalmente e a outra, em sentido médio-ventral. As duas lâminas reúnem-se, mais tarde, por baixo da cartilagem de Meckel, ao longo do futuro bordo inferior da mandíbula. Durante o desenvolvimento da mandíbula, formam-se três nódulos cartilagosos secundários, independentes da cartilagem de Meckel, a saber: cartilagem condilar, cartilagem coronóide e cartilagem sínfiseal. Os nódulos cartilagosos sofrem mais tarde um processo de ossificação peri-endocondral. As duas metades de que consta a mandíbula, estão, no início, ligadas ventralmente na sínfise por tecido conjuntivo. Nesse ponto, nota-se a presença de nódulos cartilagosos provenientes da cartilagem de Meckel (Figura 2). Esses nódulos se ossificam no 8º mês de vida intra-uterina, transformando-se nos ossículos do mento, os quais só depois do nascimento se fundem com as partes ósseas circunvizinhas, colaborando na formação da protuberância mental. Somente no primeiro ou durante o segundo ano se efetua uma ligação óssea ao nível da sínfise. A cartilagem de Meckel regride gradualmente, persistindo apenas na região dorsal e produzindo dois ossos da orelha média, a bigorna e o martelo (Junqueira e Zago 1982, Moore e Persaud 2000, Ten Cate e Nanci 2003 e Mina 2009) (Figura 3).

Fonte: <http://embryology.med.unsw.edu.au/wwwhuman/Hum12wk/Hum12wk.htm>

Figura 2 - Imagens da mandíbula em feto de 12 semanas. Cartilagem de Meckel visível (azul) no centro do osso neoformado (rosa). **A.** Visão lateral externa esquerda. **B.** Visão lateral externa direita.

Fonte: Sobotta (2000)

Figura 3 - Vista frontal da mandíbula adulta. Pode-se observar a protuberância mental.

Em relação aos demais arcos faríngeos, a cartilagem do 2º arco faríngeo (cartilagem de Reichert) origina o osso temporal, o estribo e o corno e parte do osso hióide. A cartilagem do 3º arco faríngeo origina a maior parte do osso hióide e, as cartilagens do 4º e 5º arcos faríngeos originam as cartilagens: tireóide, cricóide, aritenóide, corniculada e cuneiforme (Sadler 2001a).

O desenvolvimento das estruturas originadas do primeiro e do segundo arco faríngeo, assim como as demais estruturas craniofaciais depende de uma complexa rede sinalizadora. Muitos genes são expressos no primeiro e no segundo arco faríngeo, incluindo os genes *homeobox* das famílias *MSX* (*Muscle-segment homeobox*) e *DLX* (*distal-less*) e, ainda, genes do complexo *HOX*. Os genes *MSX1* e *MSX2* são expressos na região da linha média da

mandíbula e regulados pelo gene *BMP4* (*bone morphogenetic protein 4*). Mutações em *Msx1* e *Msx2*, em camundongo, resultam em fissura na linha média da mandíbula e graves defeitos na morfogênese da mandíbula (Chai e Maxson 2006). Em humanos, mutação no gene *MSX1* pode contribuir para formas não sindrômicas de fissura de lábio e/ou palato e agenesia dentária (Jezewski et al 2003) e mutação no gene *MSX2*, pode causar defeitos de fechamento nos ossos do crânio (Jabs et al 1993). Os genes *homeobox* da família *Dlx* exibem domínios de expressão altamente localizados nos arcos faríngeos, durante o desenvolvimento embrionário. Esses genes são dispostos em pares no genoma (*Dlx-1/-2*, *Dlx-3/-7* e *Dlx-5/-6*), com cada par tendo domínio similar de expressão. *Dlx-1/-2* são expressos no ectomesênquima, derivado de células da crista neural da região proximal e distal dos arcos faríngeos; os pares de genes *Dlx-5/-6* e *Dlx-3/-7* têm expressão restrita à região distal dos arcos faríngeos. No modelo animal, a perda do gene *Dlx5* e do gene *Dlx6* resulta na transformação homeótica da mandíbula em maxila (Cobourne e Sharpe 2003 e Chai e Maxson 2006). Transformação homeótica de mandíbula em maxila tem sido referida recentemente na síndrome aurículo-condilar (Rieder et al 2012), condição geneticamente heterogênea, causada por mutações missense nos genes *PLCB4* e *GNAI3*, os quais são moléculas de sinalização da via *EDN1-DLX5/DLX6* (*endotelina-1-distal-less homeobox 5 e 6*) (OMIM 602483). Estudos funcionais, utilizando osteoblastos mandibulares de probandos e de controles, realizados por Rieder et al (2012), demonstraram redução significativa da expressão dos genes *DLX5* e *DLX6* em indivíduos com síndrome aurículo-condilar. De acordo com os autores, estes resultados reforçam o papel da via sinalizadora *EDN1-Dlx5/6* na regulação da especificação mandibular, indicando que a disrupção dessa via resulta em fenótipo maxilar.

Outro gene *homeobox* com expressão no primeiro arco faríngeo, mais especificamente no ectomesênquima, é o gene *Gooseoid* (*Gsc*), envolvido na organização do eixo do corpo do embrião em estágio precoce (Ten Cate 2003). Em camundongos, mutações no gene *Gsc* resultam em anormalidades esqueléticas da mandíbula, incluindo hipoplasia mandibular com ausência dos processos coronóides e angulares, malformação da cartilagem de Meckel, anomalia de maxilar e alteração de palato (Cobourne e Sharpe 2003 e Ten Cate 2003).

Além dos genes *homeobox*, outros genes se expressam no primeiro arco faríngeo e têm papel importante no desenvolvimento da face. Dentre eles destacam-se os que codificam fatores de crescimento tais como os genes da família *FGF* (fatores de crescimento de fibroblastos), que estão envolvidos em proliferação e sobrevivência celular, e os genes da

família *BMP* (proteína morfogenética do osso), que codificam fatores de crescimento que induzem o crescimento ósseo. Os fatores de crescimento dessas famílias atuam na regulação de genes *homeobox* das células da crista neural, derivadas do mesênquima, e estão envolvidos no modelamento do primeiro arco faríngeo (Tucker, Matthews e Sharpe 1998, Tucker e Sharpe 2004 e Chai e Maxson 2006).

Alguns estudos têm mostrado que a morfogênese do processo mandibular é regulada por regiões da mandíbula, funcionalmente independente: duas grandes regiões laterais, que originam as porções do arco mandibular contendo os dentes molares, e uma pequena região medial, que origina a porção do arco mandibular contendo os dentes incisivos. As regiões laterais e a região medial têm padrão específico de expressão de moléculas sinalizadoras (Mina 2001a, 2001b). A expressão do gene *Fgf8* no epitélio da região lateral, em conjunto com outros genes tais como *Lhx6*, *Barx1*, *Gsc*, *Dlx* e *Pitx*, regula a proliferação celular, a apoptose e a morfogênese das regiões laterais (Trumpp et al 1999, Abu-Issa et al 2002, Frank et al 2002 e Macatee et al 2003). A morfogênese da região medial parece ser independente de *Fgf8* e dependente de interações complexas entre múltiplas vias sinalizadoras como *BMP*, endotelina-1 e sinalização mediada por *hedgehog* (*HH*) (Balic, Adams e Mina 2009). Genes que codificam fatores de transcrição, tais como *Hand2*, *Hand1*, *Fox*, *Dlx5*, *Dlx6*, *Msx1*, *Msx2*, *Prx1* e *Prx2* têm sido considerados candidatos para morfogênese da região medial da mandíbula (Satokata e Maas 1994, Srivastava, Cserjesi e Olson 1995, Thomas et al 1998, Fukuhara et al 2004, Jeong et al 2004, Ozeki et al 2004, Sato et al 2008a, 2008b e Balic, Adams e Mina 2009). Estudos com camundongos duplo-mutantes para os genes *Prx1/Prx2* apresentam processo mandibular curto, fundido na linha média, com ausência da sínfise mediana e com um, ou nenhum, incisivo central. Esses camundongos apresentavam expressão alterada dos genes *Fgf8*, *Bmp4* e *Shh* no epitélio mandibular medial, resultando em redução na proliferação do mesênquima abaixo do epitélio oral, e alterações nos sítios de expressão dos genes *Alx3* e *Dlx2* no mesênquima mandibular (ten Berge et al 1998, 2001). Em 2009, Balic, Adams e Mina observaram que a perda completa dos genes *Prx*, em duplo-mutante, leva a anomalias do processo mandibular, em estágio precoce do desenvolvimento, resultante de alterações na proliferação celular, na apoptose e na expressão de genes regulatórios nas regiões medial e lateral da mandíbula.

2.4.2 Desenvolvimento dos membros e genes relacionados

Basicamente, os membros constituem-se de quatro segmentos: broto; segmento proximal, constituído por um único osso (úmero/fêmur); segmento mediano, constituído por dois ossos (rádio e ulna/tíbia e fíbula) e parte distal, constituída por vários ossos (carpo, metacarpo/tarso, metatarso e falanges). Essas estruturas são originadas de cartilagens que são substituídas por osso durante o desenvolvimento (Gurrieri et al 2002).

Todo processo de formação dos membros de vertebrados, que vai desde a formação do broto primordial até o membro completo, ocorre durante a embriogênese (Gurrieri et al 2002), mais precisamente entre quarta e oitava semanas de desenvolvimento. No final da quarta semana do desenvolvimento, os brotos dos membros superiores tornam-se visíveis como evaginações que saem da parede ventrolateral do corpo (Figura 4A). Na sexta semana de gestação, a porção terminal dos brotos dos membros torna-se achatada, formando as placas das mãos e as placas dos pés, sendo essa separada do segmento proximal por uma constrição circular (Figura 4B). Por volta da oitava semana, uma segunda constrição divide a porção proximal dos membros em dois segmentos, e podem ser reconhecidas as partes principais das extremidades (Figura 4C). O mesmo processo ocorre para os membros inferiores, porém um a dois dias mais tarde (Sadler 2001b).

Fonte: Sadler (2001b)

Figura 4 - Desenvolvimento dos brotos dos membros de embrião humano. **A.** Embrião com 5 semanas de desenvolvimento. **B.** embrião com 6 semanas de desenvolvimento. **C.** embrião com 8 semanas de desenvolvimento.

Enquanto a forma externa está sendo estabelecida, o mesênquima dos brotos começa a condensar-se, e, na sexta semana do desenvolvimento, podem ser reconhecidos os primeiros modelos de cartilagem hialina, precursores dos ossos das extremidades (Sadler 2001b). Na quinta semana, à medida que os membros se alongam, são formados moldes mesenquimais dos ossos por agregados celulares. Os centros de condrição (centros de formação de cartilagem) aparecem mais tarde, ainda na quinta semana. Ao final da sexta semana, o esqueleto inteiro do membro é cartilaginoso. A osteogênese dos ossos longos (rádio, ulna, úmero, tibia, fíbula e fêmur) começa na sétima semana a partir de centros primários de ossificação no meio de moldes cartilagosos dos ossos longos (Moore e Persaud 2000) (Figura 5).

Fonte: Garcia e Fernández (2001)

Figura 5 - Sequência mostrando o desenvolvimento inicial dos ossos dos membros superiores. **A.** 28 dias. **B.** Ampliação do que está salientado em A. **C.** 33 dias. **D.** 6 semanas. **E.** 7 semanas.

A ossificação endocondral começa no fim do período embrionário. Na 12ª semana do desenvolvimento, centros de ossificação primários estão presentes em todos os ossos longos dos membros. Partindo do centro primário no corpo, ou diáfise do osso, a ossificação endocondral avança gradualmente em direção às extremidades do modelo cartilaginoso (Sadler 2001b).

O padrão de desenvolvimento dos membros nos vertebrados é controlado por alguns genes, muitos dos quais também têm expressão craniofacial (Gurrieri et al 2002). Pouco é

conhecido sobre os mecanismos moleculares ou genes envolvidos no modelamento dos membros. Porém sabe-se que alguns genes pertencentes à classe dos *Homeobox* agem no desenvolvimento dos membros e são ativados seguindo uma sequência espaço-temporal, a qual reflete uma ordem linear dos genes no grupo. Há quatro grupos de genes do complexo *Hox* (A, B, C e D) no genoma de mamífero, compreendendo 39 genes que codificam homeodomínios de fatores de transcrição. Genes *Hox* de vertebrados, membros dos complexos *HoxA* e *HoxD*, são estruturalmente relacionados ao gene *Abdominal-B* de *Drosophila* (grupos 9-13) e são ativados sequencialmente durante o desenvolvimento dos membros. Genes *HoxB* e *HoxC* aparentemente não estão envolvidos no desenvolvimento dos membros. Genes do grupo 9 são ativados prematuramente nos brotos, e como o crescimento distal é contínuo, eles são logo seguidos pelos genes dos grupos 10, 11, 12 e 13, os quais são restritos às partes mais distais dos membros. Camundongos mutantes para o complexo *HoxA* exibem malformações esqueléticas tanto nos membros anteriores como posteriores. Nos anteriores, a ulna e o rádio são malformados; os ossos piriforme e triangular são fundidos e ocorre desenvolvimento anormal do osso sesamóide. Nos membros posteriores, a tíbia e a fíbula são malformadas na parte distal. A disrupção de *Hoxa-10* quase não tem efeito nos membros anteriores e afeta o esqueleto dos membros posteriores. Camundongos com mutação em *Hoxa-10* e *Hoxa-11* apresentam defeitos de rádio e ulna (Zákány e Duboule 1999). Em camundongos com mutação homozigota no *Hoxd-13* ocorre redução no comprimento da ulna (van der Hoeven, Zákány e Duboule 1996). Os genes *Hox* também regulam o comprimento e o número de dígitos. A disrupção de *Hoxa-13* leva à ausência de dígitos anteriores e à morfogênese alterada de alguns outros elementos autopodais, tanto nos membros anteriores como posteriores (Zákány e Duboule 1999). Em humanos, mutação missense com expansão de polialanina no gene *HOXD-13*, causa sindactilia do tipo V (OMIM 186300) (Kjaer et al 2005 e Zhao et al 2007).

O desenvolvimento dos membros também é controlado por genes que não pertencem à classe dos *homeobox*, tais como os fatores de crescimento *FGFR2*, *BMP2* e *BMP4* e, os fatores de transcrição *TWIST* e *GLI* (Cohen 2006 e Bernier et al 2012). Em humanos, mutação de ganho de função no gene *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*) resulta na síndrome de Apert (OMIM 101200), caracterizada por craniossinostose, anomalias faciais e sindactilia simétrica de mãos e pés. Mutações nulas heterozigotas no gene *TWIST* (*Transcription Factor Twist*) leva à haploinsuficiência, resultando na síndrome de Saethre-Chotzen (OMIM 101400) a qual se caracteriza por braquidactilia e sindactilia grave de tecidos moles. Mutações nulas

no gene *GLI3* (*GLI zinc finger 3 family*) levam à haploinsuficiência, resultando na síndrome de Pallister-Hall (OMIM 146510) que se caracteriza por hamartoma hipotalâmico, anomalias faciais e polidactilia pós-axial. Recentes descobertas envolvendo os genes causadores das síndromes de Nager, Miller e disostose acrofacial tipo Guion-Almeida agregam os genes *SF3B4*, *DHODH* e *EFTUD2*, ao rol dos genes responsáveis por síndromes com anomalias pré e pós axiais de membros (Ng et al 2010b, Lines et al 2012 e Bernier et al 2012).

2.5 ESTRATÉGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES

A identificação de genes que causam doenças é o foco central da genética médica e molecular. Isto, em geral, começa com o mapeamento dos genes em locais específicos dos cromossomos. Recentes avanços na tecnologia molecular, acoplados ao importante desenvolvimento na análise estatística de dados genéticos, aumentaram a velocidade do mapeamento gênico (Jorde et al 2004). Com base em estudos de sequenciamento, estima-se que o genoma de mamíferos contém cerca de 21.000 a 22.000 genes, a maioria dos quais identificados como codificadores de proteínas. Estes genes correspondem a cerca de 1 a 2% de todo o genoma (McGraw, Saadi e Robert 2013).

Existem dois tipos principais de mapeamento gênico: o mapeamento físico e o genético. O mapeamento físico situa os genes em determinados locais ao longo de um cromossomo usando medidas que é um reflexo da distância física entre os genes e, o mapeamento genético tem como base a análise de ligação de um determinado genótipo à doença (Teare e Barrett 2005 e Nussbaum et al 2007). O genótipo dos indivíduos é definido por marcadores genéticos, sequências de DNA polimórficas, que podem ser detectados por amplificação pela PCR (reação em cadeia da polimerase) (Nussbaum et al 2007). Atualmente a classe de marcadores molecular mais utilizada para mapeamento genético é o SNP (*single nucleotide polymorphism*), o qual é caracterizado pela variação (substituição, inserção ou deleção) de um único nucleotídeo na sequência de DNA. Estima-se que ocorra um SNP a cada 800 pares de bases (pb) (Dawson 1999) e, portanto, que exista mais de 10 milhões de SNPs no genoma humano (Burton, Tobin e Hopper 2005). O sucesso para mapear o loco de determinada doença consiste em avaliar um grande número de marcadores moleculares em um número significativo de afetados, o que, atualmente, é possível pela tecnologia de *microarray* que utiliza *chips* de DNA, ou seja, lâminas contendo fragmentos de DNA

conhecidos, os quais vão se hibridizar ao DNA de interesse, dando informação sobre o genótipo do indivíduo. A sensibilidade e a natureza abrangente dessa tecnologia oferecem uma plataforma ideal para o mapeamento de locos gênicos, por investigar centenas de milhares de SNPs (em torno de 1 milhão de SNPs, dependendo da plataforma) em um único experimento. Já estão disponíveis no mercado alguns *chips* de SNPs, como o da plataforma *Affymetrix*, que possuem quantidades diferentes de SNP, como por exemplo, os *chips* da *Affymetrix* 10K, 50K, 250K e 6.0, que contém 10.000, 50.000, 250.000 e 1.000.000 de SNPs, respectivamente. A hibridização dos SNPs com o DNA de interesse, o qual é marcado com fluorocromo (sonda de DNA), gera um sinal fluorescente. Para a análise dos dados obtidos é necessário um método estatístico eficiente que combine a intensidade da fluorescência dessas sondas e dê informação correta e segura sobre o genótipo (Xiao et al 2007). Em resumo, o experimento de *microarray* da plataforma *Affymetrix* compreende a digestão do DNA genômico de interesse; a produção de sonda fluorescente de DNA; e a hibridização propriamente dita. O DNA total do indivíduo é digerido com enzima de restrição, gerando fragmentos de 250 a 2000 pb, os quais são ligados a um adaptador que reconhece o sítio de corte das enzimas. Os fragmentos de DNA são amplificados com um primer genérico que reconhece a sequência do adaptador e, novamente, fragmentados em tamanhos menores (100 a 150 pb). Estes fragmentos são marcados com biotina e hibridizados no *chip*. Após o período de hibridização, o fragmento é marcado com fluorocromo e os SNPs, analisados pelo software *Genotyping Analysis Software* (GTYPE).

Figura 6 - Representação esquemática da metodologia de *microarray* de SNP da plataforma *Affymetrix* *Gene Chips mapping* 100K modificado de *Affymetrix* (2004).

Estudos de ligação foram, durante anos, a principal ferramenta para elucidar a genética de doenças mendelianas, no entanto, para doenças extremamente raras ou casos esporádicos causados por mutações de novo podem não ser efetivos. Nos últimos anos, a utilização de aparelhos capazes de sequenciar o genoma inteiro ou todos os éxons (exoma) tem aumentado à possibilidade de identificação de genes causadores de condições monogênicas (Ku, Naidoo e Pawitan 2011). O sequenciamento do exoma se restringe a identificação de variantes encontradas em regiões codificadoras ou em sítios de *splice*, as quais podem afetar a estrutura, a quantidade e/ou a função da proteína. No entanto essa tecnologia não permite identificar variações estruturais na molécula de DNA (modificações epigenômicas) ou variações em regiões não codificadoras, como por exemplo, regiões regulatórias que podem reduzir ou aumentar a expressão gênica (Ng et al 2010b). O sequenciamento do exoma está sendo aplicado para descoberta de novas variantes e de genes candidatos para algumas desordens Mendelianas, incluindo síndromes craniofaciais raras como, por exemplo, a síndrome de Kabuki (OMIM 147920), de Miller (OMIM 263750) e síndrome de Schinzel-Giedion (OMIM 269150) (Hoischen et al 2010 e Ng et al 2010a, 2010b).

3 PROPOSIÇÃO

- Identificar o gene causador da síndrome de Richieri-Costa-Pereira.
- Identificar regiões de homozigose entre indivíduos com SRCP, cadastrados no HRAC-USP, Bauru, utilizando chips de SNPs das plataformas *Affymetrix GeneChips mapping 100K*.
- Restringir as regiões de homozigose nos demais indivíduos da família por meio de análise de ligação, utilizando marcadores do tipo microssatélites.
- Restringir as regiões de homozigose nos demais indivíduos da família por meio de análise de ligação, utilizando SNPs como marcadores.
- Selecionar genes candidatos nas regiões de homozigose.
- Sequenciar os genes candidatos selecionados.

4 INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA

4 INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Fizeram parte desse estudo 26 indivíduos com SRCP e 55 familiares não afetados (pertencentes a 21 famílias aparentemente não relacionadas), incluindo pais e irmãos e, quando possível, avós e tios (heredogramas no Apêndice 1). Dos 26 casos, 22 (indivíduos de 1 a 22) estavam cadastrados no Banco de Dados da Seção de Genética Clínica, Divisão de Sindromologia do HRAC-USP-Bauru. Os indivíduos 23 e 24 (2 irmãos afetados) pertenciam ao Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio Palatal-Curitiba/PR (Souza et al 2011), o indivíduo 25 era do Núcleo de Investigação Molecular Avançada, PUC-Curitiba/PR (Raskin et al 2013) e, o indivíduo 26 era do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (caso não publicado) (heredogramas dos indivíduos de 23 a 26 não foram incluídos). O diagnóstico clínico da SRCP foi realizado por geneticistas clínicos e, teve como critério: presença de microstomia, micrognatia, fusão anormal da mandíbula, fissura de palato/sequência de Robin, anomalias pré e pós axiais de membros e pés tortos. Os principais sinais clínicos dos indivíduos afetados incluídos nesse estudo foram dispostos no Apêndice 2. O critério de inclusão das famílias foi apresentar pelo menos um indivíduo afetado, independentemente da presença, ou não, de consanguinidade parental. Pacientes e/ou responsáveis, bem como seus familiares, foram devidamente esclarecidos sobre o estudo e incluídos nesse, após leitura, concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), devidamente aprovado pelo Comitê de Ética do HRAC-USP-Bauru (Anexo 1).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta de sangue e extração de DNA genômico

A coleta foi realizada durante consultas de rotina dos indivíduos no HRAC-USP ou na residência da família com auxílio de seringa contendo EDTA 6%. A extração do DNA genômico foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do HRAC-USP-Bauru,

utilizando o kit Genomic PrepTM Blood DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech), segundo o protocolo do fabricante.

4.2.2 Estudo molecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento Humano e no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob a orientação e supervisão da Profa. Dra. Maria Rita dos Santos Passos e Bueno.

4.2.2.1 Análise genômica

4.2.2.1.1 Microarray de SNP (Affymetrix GeneChips mapping 100K)

Para definição de regiões em homozigose entre os afetados, foi utilizada a plataforma *Affymetrix GeneChips mapping 100K*, de acordo com o protocolo do fabricante (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Para esta análise foram selecionados sete indivíduos afetados (indivíduo 2 - família 6: VI-5; indivíduo 3 - família 5: IV-17; indivíduo 5 - família 1: V-3; indivíduo 8 - família 8: IV-15; indivíduo 10 - família 5: VII-1; indivíduo 12 - família 8: V-4 e indivíduo 19 - família 6: V-2) e três indivíduos não afetados (grupo controle), pertencentes a três das cinco famílias acima (irmã do indivíduo 3 - família 5: IV-10; irmã do indivíduo 19 - família 6: V-5 e irmão do indivíduo 8 - família 8: IV-12). O critério de seleção para escolha dos afetados foi a presença de consanguinidade parental e/ou recorrência e, para os não afetados foi ter um irmão afetado. Os dados de genotipagem dos indivíduos afetados foram comparados com os dos indivíduos não afetados. As amostras de DNA desses 10 indivíduos (afetado e controle) foram analisadas isoladamente, ou seja, não foi construído *pool* de DNA dos afetados. Foram considerados significativos para análise de homozigose as amostras que tiveram *SNP Call* (número de SNP genotipados/número total de SNPs no *chip*) maior que 90%, ou seja, amostras em que mais que 90% dos SNPs presentes no chip (100.000 para o microarray de 100K e 500.000 para o microarray de 500K) puderam ser genotipados. O valor de *SNP Call* é calculado e fornecido pelo programa *GTYPE*.

Para comprovar a fidelidade do sistema de genotipagem do microarray de SNP (*Affymetrix GeneChips mapping 100K*), foi realizado a genotipagem em duplicata de dois indivíduos com maior valor de *SNP Call*, pois quanto maior o *SNP Call*, menor a ocorrência de erros. Os genótipos de 1000 SNPs obtidos nas duas genotipagens foram comparados manualmente, a fim de calcular a frequência de erros.

4.2.2.1.1.1 Diluição do DNA genômico

A concentração do DNA genômico foi determinada através do espectrofotômetro Nanodrop® ND 1000 UV-Vis e o DNA, diluído em tampão de eluição TE (0.1 mM EDTA e 10 mM Tris HCl, em pH 8,0) para 50 ng/μL.

4.2.2.1.1.2 Digestão com enzimas de restrição

O processo de digestão pelas enzimas *XbaI* e *HindIII* foi realizado separadamente. Para cada enzima preparou-se um *mix* de digestão:

<i>XbaI</i>			<i>HindIII</i>		
Reagente	1 reação	Concentração final na reação	Reagente	1 reação	Concentração final na reação
H ₂ O	10,5 μL		H ₂ O	10,5 μL	
NE 2 10X	2 μL	1X	NE 4 10X	2 μL	1X
BSA 10X (1mg/mL)	2 μL	1X	BSA 10X (1mg/mL)	2 μL	1X
<i>XbaI</i> (20 U/μL)	0,5 μL	0,5 U/ μL	<i>HindIII</i> (20 U/μL)	0,5 μL	0,5 U/μL
Total	15 μL		Total	15 μL	

Para cada indivíduo testado foi necessário 15 μL de *mix* para digestão de 5 μL de DNA (50 ng/μL). A reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
37°C	120 minutos
70°C	20 minutos
10°C	Infinito

4.2.2.1.1.3 Ligação ao adaptador

O processo de ligação do adaptador ao DNA digerido foi realizado separadamente para cada uma das enzimas. Dessa forma, para cada enzima de restrição preparou-se um *mix*, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas. De acordo com a padronização existente no laboratório, o *mix* referente a uma reação foi:

Reagente	1 reação	Concentração final na reação
Adaptador XbaI ou HindIII (5 μ M)	1,25 μ L	0,25 μ M
Tampão T4 DNA Ligase (10X)	2,5 μ L	1X
T4 DNA Ligase	0,625 μ L	250U
<i>H₂O molecular biology-grade (Accugene)</i>	0,625 μ L	
Total	5 μ L	

Para cada 20 μ L de DNA digerido foi adicionado 5 μ L de *mix* de ligação, totalizando 25 μ L. Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
16°C	120 minutos
70°C	20 minutos
10°C	infinito

O produto da reação de ligação (25 μ L) foi diluído para se obter um volume final de 100 μ L, acrescentando-se 75 μ L de *H₂O molecular biology-grade (Accugene)*.

4.2.2.1.1.4 PCR do produto da ligação

A reação da PCR foi realizada separadamente para cada enzima de restrição. Dessa forma, foram preparados dois *mixes* de PCR, um para cada enzima, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas. Nessa etapa, porém, o *mix* foi feito para cada amostra em triplicata, o qual resultou em um produto com os seguintes volumes:

Reagente	1 Reação	3 Reações	Concentração final na reação
H ₂ O molecular biology-grade (Accugene)	44 µL	132 µL	
Tampão Pfx (10X)	10 µL	30 µL	1X
PCR Enhancer (10X)	10 µL	30 µL	1X
MgSO ₄ (50mM)	2 µL	6 µL	1mM
dNTP (2,5 mM cada)	12 µL	36 µL	300 uM cada
PCR primer (10 uM)	10 µL	30 µL	1 uM
Pfx Polimerase (2,5 U/µL)	2 µL	6 µL	0,05 U/µL
Total	90 µL	270 µL	

Para cada tubo da triplicata contendo 10 µL de DNA ligado ao adaptador, específico para cada enzima, foi adicionado 90 µL do *mix*. Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3 minutos	1 vez
94°C	30 segundos	30 vezes
60°C	45 segundos	
68°C	60 segundos	
68°C	7 minutos	1 vez
4°C	Infinito	

Ao término da reação de PCR, foi realizado um gel 1,5% TBE, em corrida de eletroforese de 120V, para excluir possível contaminação na reação controle (isto é, uma reação sem adição de DNA).

4.2.2.1.1.5 Purificação da PCR

O produto de PCR proveniente dos três tubos foi colocado em um único poço de uma microplaca com filtro (*QIAGEN MinElute 96 UF PCR Purification Plate*). Foi aplicado vácuo a essa placa de ~800 mbar (1 milibars corresponde a 100 Pa - pressão atmosférica), até que os poços secassem. Quando secos, lavou-se os poços com 50 µL de H₂O molecular biology-grade (*Accugene*) por três vezes. Depois de removido o excesso de líquido com papel absorvente, foi adicionado 50 µL de tampão EB, agitando-se a placa por 5 minutos em vórtex. A solução contendo o produto da PCR foi retirada e transferida para tubos de 0,2 µL. O produto foi ainda quantificado quanto à concentração de DNA, utilizando-se o

espectrofotômetro Nanodrop® ND 1000 UV-Vis, na absorbância de 260 nm. Nessa etapa, a concentração foi ajustada para 40 µg de produto da PCR em solução final de 45 µL de EB.

4.2.2.1.1.6 Fragmentação

Primeiramente, todo o produto de PCR purificado (45 µL) foi diluído com 5 µL de tampão de fragmentação 10X (*Affymetrix*). A essa solução foi acrescentado 5 µL de um *mix* de fragmentação, feito de acordo com a padronização existente no laboratório, conforme segue:

Reagente	1 reação
<i>GeneChip Fragmentation Reagent</i>	0,48 µL
Tampão de fragmentação (10X)	3 µL
H ₂ O SIGMA	26,52 µL
Total	30 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
37°C	35 minutos
95°C	15 minutos
4°C	Infinito

Com o término do programa foi feito um gel de agarose 4% TBE para checar a eficácia da fragmentação. Os fragmentos gerados devem conter menos que 180 pares de bases.

4.2.2.1.1.7 Marcação com biotina (Labelling)

Nesse processo, o DNA fragmentado foi marcado com biotina para gerar uma sonda de hibridização. Essa etapa foi realizada imediatamente após a fragmentação. Foram realizados *mixes* com os reagentes nos seguintes volumes:

Reagente	1 reação	Concentração final na reação
Tampão TdT (<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i>) (5X)	14 µL	1X
GeneChip DNA Labelling Reagent (7,5 mM)	2 µL	0,214 mM
TdT (30 U/ mL)	3,5 µL	1,5 U/µL
Total	19,5 µL	

Foram misturados 50,5 µL de DNA fragmentado e 19,5 mL de *labelling mix* e levados ao termociclador de acordo com o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
37°C	2 horas
95°C	15 minutos
4°C	Infinito

Com o término do programa seguiu-se para a hibridização dessa sonda ao *chip*.

4.2.2.1.1.8 Hibridização da sonda com o chip de SNPs

Para a hibridização foi feito apenas um *mix* para as duas enzimas, o qual foi produzido com os reagentes nos seguintes volumes:

Reagente	1 reação	Concentração final na reação
MES (12X; 1,22 M)	12 µL	0,066 M
DMSO (100%)	13 µL	5%
Denhardt's Solution(50X)	13 µL	2,5X
EDTA (0,5 M)	3 µL	5,77 mM
HSDNA (10 mg/mL)	3 µL	0,115 mg/mL
de OCR 0100	2 µL	1X
de Cot-1 Humano (1 mg/mL)	3 µL	11,5 ug/mL
Tween-20 (3%)	1 µL	0,0115%
TMACL (5M)	140 µL	2,69 M
Total	190 µL	

Acrescentou-se 190 µL desse *mix* em 70 µL do produto da fragmentação e levou-se para o termociclador de acordo com o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
95°C	10 minutos
48°C	2 minutos

Ao término da reação, 200 µL do produto foi injetado nos *chips* específicos para cada enzima e esses foram colocados para hibridizar no forno de hibridização, por um período de 16 a 18 horas à 48°C.

4.2.2.1.1.9 Lavagem e escaneamento dos chips

Após a retirada do *chip* do forno de hibridização, a sonda que ele continha foi removida com auxílio de uma pipeta e adicionou-se 250 µL de tampão de conservação (*Holding Buffer*), constituído por:

Reagente	Para 10 mL
MES 12X	830 µL
NaCl 5M	1,85 mL
Tween 20 10%	10µL
H ₂ O SIGMA	7,31 mL

Em seguida, o *chip* foi levado para a etapa de lavagem e coloração na estação de lavagem (*Fluidics Station 450* da *Affymetrix*), a qual deve estar devidamente preparada, contendo as três soluções necessárias: tampão de conservação, solução de coloração com SAPE (*Streptavidin Phycoerythrin*) e solução de anticorpo marcado com fluorescência.

Primeiramente foi feita a solução de coloração pura, a qual foi constituída por:

Reagente	1 reação
H ₂ O SIGMA	666,7 µL
SSPE 20X	300 µL
Tween20 3%	3,3 µL
Denhart-s 50X	20 µL
Total	990 µL

Para se obter a solução de coloração com SAPE (*Streptavidin Phycoerythrin*) acrescentou-se 5 µL de SAPE em 495 µL de solução de coloração.

A solução de anticorpo marcado com fluorescência foi composta por 495 µL de solução de coloração e 5 µL de Anticorpo Biotinilado (*Affymetrix*).

Com o término da lavagem, o *chip* foi escaneado no *GeneChip Scanner 3000* (*Affymetrix*).

4.2.2.1.1.10 Análise de dados

A informação do escaneamento dos *chips* e a geração de arquivos foram feitas pelo *GeneChip Operating Software* (GCOS) e *GeneChip® Genotyping Analysis Software* (GTYPE) da *Affymetrix*, respectivamente. A análise dos controles de hibridização, existentes nas bordas e no centro do *chip* de SNPs, foi realizada durante a visualização do escaneamento no GCOS. Os controles de hibridização fornecem informação sobre a ocorrência de hibridização da sonda com os SNPs do *chip*. A qualidade da hibridização da amostra foi avaliada pelo índice de *SNP Call* (número de SNP genotipados/número total de SNPs no *chip*), fornecido pelo programa GTYPE, o qual foi considerado aceito quando >80%. O genótipo dos indivíduos, em relação aos SNPs analisados, foi determinado pelo programa GTYPE como sendo: AA, AB ou BB, onde: A representa o alelo mais frequente na população; B, o alelo menos frequente e AB, o heterozigoto (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Para a análise de resultados os dados gerados foram exportados para o programa *Homozygosity Mapper*, o qual realiza mapeamento de regiões em homozigose entre indivíduos, pertencentes ou não à mesma família. O programa seleciona as regiões de acordo com um *score* de homozigosidade entre os indivíduos afetados, que deve ser maior que 80% do maior valor de *score* obtido, permitindo a visualização dos genótipos de cada região, bem como a genotipagem de cada SNP. As regiões em homozigose, fornecidas pelo *Homozygosity Mapper* são comparadas com o grupo controle para exclusão de regiões em homozigosidade entre irmãos não afetados (grupo controle) (Seelow et al 2009). No presente trabalho foi considerado região informativa, de acordo com o critério utilizado no Laboratório, quando: pelo menos cinco dos sete afetados analisados forem homozigotos (AA ou BB) para os SNPs da região e, ainda, quando pelo menos dois dos três indivíduos do grupo controle apresentarem genótipo diferente dos indivíduos afetados, para a mesma região.

4.2.2.1.2 Análise de ligação com marcadores moleculares e análise de gene candidato

A partir da região de homozigose informativa, foi iniciado estudo de ligação por meio de marcadores moleculares para investigação da região selecionada. O estudo incluiu análise do genótipo de 23 probandos da amostra total (20 deles pertencentes ao HRAC-USP) e de 50 familiares, totalizando 73 indivíduos. Para a realização dessa etapa foram utilizados marcadores microssatélites do painel *ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0; Perkin-Elmer, Applied Biosystem* específicos para a região candidata e disponíveis no Laboratório; marcadores microssatélites escolhidos através do banco de dados *online NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>), que se intercalavam aos demais marcadores, a fim de se aumentar a intensidade de informação e SNPs escolhidos através do banco de dados *online NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

4.2.2.1.2.1 Análise de ligação com marcadores microssatélites do painel ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0; Perkin-Elmer, Applied Biosystem

Inicialmente foram escolhidos quatro marcadores microssatélites do painel *ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0; Perkin-Elmer, Applied Biosystem*, disponíveis no Laboratório e que abrangiam a região de homozigose selecionada deixando uma folga entre os marcadores flanqueadores. Tais marcadores foram: D17S949, D17S785, D17S784 e D17S928 (Tabela 1). Cada marcador possui uma fluorescência específica, sendo o D17S949 com fluorescência FAM (azul); D17S785 e D17S928 com fluorescência NED (preto) e D17S784 com fluorescência HEX (verde).

Tabela 1 - Características dos marcadores microssatélites do painel *ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0*; Perkin-Elmer, Applied Biosystem.

Posição Física	Marcador	Origem	Heterozigosidade	Primer da fita sense	Primer da fita anti-sense	Tamanho produto
68465456-68465676	D17S949	<i>ABI PRISM®</i>	0,8	ATAGAAACTCCACATTTGCATTA	CTTTCCCACNCGTGTC	207-221
74431373-74431569	D17S785	<i>ABI PRISM®</i>	0,83	ATCCCTGGAGAGTGAAAATG	AAGGCCAACCTGAAAATAA	181-207
77802191-77802424	D17S784	<i>ABI PRISM®</i>	0,77	GAGTCTCCTAAATGCTGGGG	AGCTCCTGCACAGTTCTTAAATA	226-238
80252880-80253028	D17S928	<i>ABI PRISM®</i>	0,77	TAAACGGCTACAACACATACA	ATTTCCCCACTGGCTG	135-165

4.2.2.1.2.1.1 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada separadamente para cada marcador. Dessa forma, foram preparados quatro *mixes* de PCR, um para cada marcador, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas, o qual resultou em um produto com os seguintes volumes:

Reagente	1 Reação
H ₂ O Milli Q	5,71 µL
Tampão (10X)	1,0 µL
dNTP (2,5 mM cada)	1,0 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,5 µL
Marcador microsatélite	0.66 µL
Taq polimerase Invitrogen (5U/µL)	0.13 µL
DNA (100ng/µL)	1,0 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1 vez
94°C	15 segundos	30 vezes
55°C	15 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	15 minutos	1 vez
10°C	infinito	

Ao término da reação de PCR, foi realizada uma diluição dos produtos de PCR em água Milli Q, na seguinte proporção:

Marcador Microsatélite	Diluição
D17S949	1:20
D17S785	1:10
D17S784	1:20
D17S928	1:10

Em seguida 1 µL de cada produto de PCR diluído foi adicionado a 9 µL de uma mistura de 9 µL de formamida HiDi e 0.075 µL de Size Standard (GS500 ou GS500 Liz de acordo com a fluorescência de cada marcador).

A genotipagem foi lida no sequenciador automático ABI 3730 da *Applied Biosystem* e analisada pelos programas GeneMapper v4.0 e GeneMarker v1.90 Demo.

4.2.2.1.2.2 Análise de ligação com marcadores microssatélites do Banco de Dados Online NCBI

Após análise da genotipagem dos marcadores microssatélites disponíveis no laboratório, decidiu-se por aumentar a quantidade de marcadores a fim de ampliar a densidade de informação na região selecionada. Dessa forma, foram escolhidos sete novos marcadores microssatélites através do banco de dados online *NCBI*, de forma que estivessem distribuídos ao longo da região de interesse e que se intercalassem aos demais marcadores genotipados. Tais marcadores foram: D17S801, D17S937, D17S802, D17S1847, D17S745, D17S1806, D17S668, cujos primers estão disponíveis no banco de dados *NCBI* (Tabela 2). Nessa etapa, foi utilizada a técnica de marcação com fluorescência FAM, de acordo com protocolo estabelecido no Laboratório (Schuelke 2000).

Tabela 2 - Características dos marcadores microssatélites do banco de dados *online NCBI*.

Posição Física	Marcador	Origem	Heterozigosidade	Primer da fita sense	Primer da fita anti-sense	Tamanho produto
74506659-74506926	D17S801	<i>NCBI</i>	0,85	CCTCAAACCGGACAACCTATTT	CAGAGAGCAAGATCCTACCTC	258-340
75347271-75347415	D17S937	<i>NCBI</i>	0,7	CATGGAGGGACTTGCG	TTCCCAGAACCCGGTTT	125-149
76234610 - 76234787	D17S802	<i>NCBI</i>	0,81	GCCACCTGCCCCTCAA	CTGCCAGCAGAGGCCA	166-188
77024861-77025022	D17S1847	<i>NCBI</i>	0,66	GATCACCAGGAACACCC	TCTTCAGAGCTTGCCAG	144-164
Não informado	D17S745	<i>NCBI</i>	0,84	AAAAAATGGATCTCTCTGTCTCTCT	TTGGGCCAGTAGTGGGGAAGTAG	143-920
77445675-77445787	D17S1806	<i>NCBI</i>	0,72	GATGTGCTTATTTGAAACCTGC	TGTAACGTCCACCAGCAGAG	109-151
80028021-80028175	D17S668	<i>NCBI</i>	0,88	TGACAGAGCGAGACCCTGC	GAACGGGATTGGTTATACTAATGTC	151-174

4.2.2.1.2.2.1 Reação de PCR

Primeiramente, foi feito um *mix* com a fluorescência (M13 100 uM) e os primers de cada marcador microssatélite, da seguinte forma:

Reagente	Quantidade
Primer Reverse (100uM)	3 µL
Primer Forward com calda M13 (33uM)	0.6 µL
Fluorescência M13 (100uM)	3 µL
Água Milli Q	23,4 µL
Total	30 µL

A reação da PCR foi realizada separadamente para cada marcador. Dessa forma, foram preparados sete *mixes* de PCR, um para cada marcador, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas, o qual resultou em um produto com os seguintes volumes:

Reagente	1 Reação
H ₂ O Milli Q	6,3 µL
Tampão GE (10X)	1,0 µL
dNTP (2,5 mM cada)	0,8 µL
Mix de primer	0.2 µL
Taq polimerase GE (5U/µL)	0.2 µL
DNA (100ng/µL)	1,0 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1 vez
94°C	30 segundos	30 vezes
T annealing do primer °C	45 segundos	
72°C	45 segundos	
94°C	30 segundos	8vezes
53°C	45 segundos	
72°C	45 segundos	
72°C	30 minutos	1 vez
8°C	Infinito	

Ao término da reação de PCR, foi realizada uma diluição dos produtos de PCR em água Milli Q na proporção de 1:15.

Em seguida 1,5µL de cada produto de PCR diluído foi adicionado a 9 µL de uma mistura de 9 µL de formamida HiDi e 0,075 µL de Size Standard (GS500).

A genotipagem foi lida no sequenciador automático ABI 3730 da *Applied Biosystem* e analisada pelos programas GeneMapper v4.0 e GeneMarker v1.90 Demo.

4.2.2.1.2.3 Análise de ligação com SNPs do Banco de Dados Online do NCBI

Após análise da genotipagem dos marcadores microssatélites decidiu-se por aumentar a quantidade de marcadores para ampliar a densidade de informação na região selecionada, porém, nenhum marcador microssatélite remanescente da região foi considerado informativo para análise. Dessa forma, foram escolhidos 10 SNPs para serem usados como marcadores. A escolha foi realizada através do banco de dados online *NCBI*, e foi dada atenção para que eles estivessem distribuídos dentro da região de interesse (cromossomo 17, entre os marcadores D17S784 e D17S668). Tais SNPs foram: rs11150824, rs2289534, rs3829612, rs10782008, rs61756263, rs4889865, rs2672871, rs869370, rs899286 e rs8477. Foram, então, desenhados primers específicos, necessários para o processo de sequenciamento da região que contém esses SNPs, utilizando-se o programa *Gene Runner version 3.05* (Copyright® 1994 Hastings Software, Inc.), o programa online *Primer3 Input version 0.4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), o banco de dados online *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) e o banco de dados online *UCSC Genome Browser Home* (<http://genome.ucsc.edu/>) (Tabela 3).

Tabela 3 - Características dos SNPs do banco de dados *online NCBI*, bem como seus primers especificamente desenhados.

Posição Física	Marcador	Origem	Primer da fita sense	Primer da fita anti-sense	Tamanho produto
77925092	rs11150824	<i>NCBI</i>	TGCAGCTCAAAGACCAGGTA	AATAAGGGAAGCCAGCAGGA	395
78032915	rs2289534	<i>NCBI</i>	AGGACACCCGGATTTTAAGG	AGGCCTTCTGTCACCCACTA	263
78161402	rs3829612	<i>NCBI</i>	TCCCTTCCAGCTCTGACTTG	GACAGCAGCCCAAGAGAAAC	311
78305871	rs10782008	<i>NCBI</i>	GCTGTGTGCTCTTGAGTTCG	TCTTCTTCGGGCTCACTCAG	387
78444658	rs12943620	<i>NCBI</i>	TGAAGGACACTCTGGGTGGT	AGGGAGAGAAGAGACGCACA	310
78568447	rs4889865	<i>NCBI</i>	GAGTTCGATACCAGCGTTTC	TTACCATGGAGCCACAGTGC	376
78806313	rs2672871	<i>NCBI</i>	TGGCCACTGGAGCAACATT	CAGTCCTCAGTTGCAGTTGG	329
79165171	rs869370	<i>NCBI</i>	CACACTGGGTCCTGACAACA	CAGTGGTTCATTGCCGTAAGT	309
79417400	rs899286	<i>NCBI</i>	TGCTGTGAGGTTATCGTTGC	ATTCCTCCATCCTCCCTCAG	571
79617489	rs8477	<i>NCBI</i>	TCACAGTCATCTGCCCTTG	GGGCCTGTATCTCCAGATGT	315

4.2.2.1.2.3.1 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada separadamente para cada marcador. Dessa forma, foram preparados dez *mixes* de PCR, um para cada marcador, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas, o qual resultou em um produto com os seguintes volumes:

Reagente	1 Reação
H ₂ O Milli Q	13,8 µL
Tampão GE (10X)	2,0 µL
dNTP (2,5 mM cada)	1,6 µL
Primer F (20uM)	0,7 µL
Primer R (20uM)	0,7 µL
Taq polimerase GE (5U/µL)	0,2 µL
DNA (20ng/µL)	1,0 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 minutos	1 vez
94°C	30 segundos	35 vezes
T annealing do primer°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	1 vez
4°C	Infinito	

O produto de PCR foi, então, submetido a uma purificação enzimática com *Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase (EXO I - SAP)* de acordo com os seguintes volumes:

Reagentes	1 Reação
Produto de PCR	18 µL
SAP (1U/µL)	2,25 µL
Exo I (10U/µL)	1,125 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
37°C	1 hora
80°C	15 minutos
4°C	Infinito

Em seguida foi realizada a reação de sequenciamento de acordo com os seguintes volumes:

Reagentes	1 Reação
Água MilliQ	2 µL
Sequencing Buffer (5X)	1 µL
Primer Forward ou Reverse (5uM)	1 µL
Big Dye Terminator v3.1 Cycle	2 µL
Produto de PCR purificado	4 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
96°C	1 minuto	1 vez
96°C	10 segundos	30 vezes
T aneling do primer °C	5 segundos	
60°C	4 minutos	
10°C	Infinito	

Ao término da reação o produto do sequenciamento foi submetido à purificação física por Sephadex de acordo com o seguinte protocolo:

- Obteve-se um volume de 10 µL de produto final de sequenciamento, dessa forma foi necessário adicionar 5 µL de água MilliQ em cada amostra, pois o volume final deve ser em torno de 15 µL. Foi colocado o Sephadex G-50 no enchedor de colunas *Multiscreen column loader*, o qual tem a função de dosar a quantidade de Sephadex apropriada para cada poço da placa Multiscreen. Depois de distribuído o pó em cada poço da placa foi adicionado 300 µl de água MilliQ, embrulhou-se a placa com filme plástico para evitar evaporação e incubou-se por 3 horas. Uma placa de PCR de 96 orifícios foi colocada embaixo da placa Multiscreen, presa com fita adesiva e centrifugada a 650g (2100rpm) por 5 minutos. Descartou-se o volume que passou para a placa coletora. Foi acrescentado 140 µl de água MilliQ por poço, centrifugado novamente a 650g (2100rpm) por 5 minutos e descartado o volume que passou para a placa coletora. Sem adicionar mais água, centrifugou-se novamente a 650g (2100rpm) por 2 minutos. A placa coletora foi retirada e presa outra placa de PCR limpa na placa Multiscreen. Adicionou-se o produto do sequenciamento ao centro de cada poço da placa (15 µL sobre o Sephadex). A placa foi centrifugada novamente a 650g (2100rpm) por 5

minutos. A placa com o produto do sequenciamento foi colocada no termo a 94°C por 15 minutos para secar.

O produto do sequenciamento foi lido no sequenciador automático ABI 3730 da *Applied Biosystem* e analisado pelo programa *Sequencher 4.9 Demo*.

4.2.2.1.3 *Microarray de SNP (Affymetrix GeneChips mapping 500K)*

Para se obter maior confiabilidade na região que está sendo estudada, foi realizada uma nova análise de *microarray* de SNP com a plataforma 500K em seis indivíduos afetados da amostra (indivíduo 2 - família 6: VI-5; indivíduo 3 - família 5: IV-17; indivíduo 4 - família 4: IV-3; indivíduo 17 - família 15: III-2; indivíduo 19 - família 6: V-2 e indivíduo 23 - sem heredograma). O critério de seleção desses indivíduos foi a presença de consanguinidade parental e/ou recorrência, exceção feita ao indivíduo 17, selecionado por apresentar ótima qualidade de DNA. As amostras de DNA dos seis indivíduos foram analisadas isoladamente, ou seja, não foi construído *pool* de DNA dos afetados. Para a análise dos SNPs foi utilizada a plataforma *Affymetrix GeneChips mapping 500K*, de acordo com o protocolo do fabricante (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA).

4.2.2.1.3.1 Diluição do DNA genômico

A concentração do DNA genômico foi determinada através do espectrofotômetro Nanodrop[®] ND 1000 UV-Vis e o DNA, diluído em tampão de eluição TE (0.1 mM EDTA e 10 mM Tris HCl, em pH 8,0) para 50 ng/μL.

4.2.2.1.3.2 Digestão com enzimas de restrição

O processo de digestão pelas enzimas *NspI* e *StyI* foi realizado separadamente. Para cada enzima preparou-se um *mix* de digestão:

<i>Nsp I</i>			<i>Sty I</i>		
Reagente	1 reação	Concentração final na reação	Reagente	1 reação	Concentração final na reação
H ₂ O	9,75 µL		H ₂ O	9,75 µL	
NE 2 10X	2 µL	1X	NE 4 10X	2 µL	1X
BSA 10X (1mg/mL)	2 µL	1X	BSA 10X (1mg/mL)	2 µL	1X
<i>XbaI</i> (20 U/µL)	1 µL	0,5 U/µL	<i>HindIII</i> (20 U/µL)	1 µL	0,5 U/µL
Total	14,75 µL		Total	14,75 µL	

Para cada indivíduo testado foi necessário 14,75 µL de *mix* para digestão de 5 µL de DNA (50 ng/µL). A reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
37°C	120 minutos
65°C	20 minutos
4°C	Infinito

4.2.2.1.3.3 Ligação ao adaptador

O processo de ligação do adaptador ao DNA digerido foi realizado separadamente para cada uma das enzimas. Dessa forma, para cada enzima de restrição preparou-se um *mix*, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas. De acordo com a padronização existente no laboratório, o *mix* referente a uma reação foi:

Reagente	1 reação	Concentração final na reação
Adaptador <i>NspI</i> ou <i>StyI</i> (50uM)	0,75 µL	1,5 uM
Tampão T4 DNA Ligase (10X)	2,5 µL	1X
T4 DNA Ligase (400U/µL)	2 µL	32 U/µL
Total	5,25 µL	

Para cada 19,75 de DNA digerido foi adicionado 5,25 µL de *mix* de ligação, totalizando 25µL. Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
16°C	180 minutos
70°C	20 minutos
4°C	Infinito

O produto da reação de ligação (25 µL) foi diluído para se obter um volume final de 100 µL, acrescentando-se 75 µL de *H₂O molecular biology-grade (Accugene)*.

4.2.2.1.3.4 PCR do produto da ligação

A reação da PCR foi realizada separadamente para cada enzima de restrição. Dessa forma, foram preparados dois *mixes* de PCR, um para cada enzima, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas. Nessa etapa, porém, o *mix* foi feito para cada amostra em triplicata, o qual resultou em um produto com os seguintes volumes:

Reagente	1 Reação	3 Reações	Concentração final na reação
H ₂ O molecular biology-grade (Accugene)	39,5µL	118,5 µL	
Tampão Clontech TITANIUM Taq PCR (10X)	10 µL	30 µL	1X
G-C Melt (5M)	20 µL	60 µL	1M
dNTP (2,5 mM cada)	14 µL	42 µL	350 uM cada
PCR primer 002 (100 uM)	4,5 µL	13,5 µL	4,5 uM
Clontech TITANIUM Taq DNA Polimerase (50X)	2 µL	6 µL	1X
Total	90 µL	270 µL	

Para cada tubo da triplicata contendo 10 µL de DNA ligado ao adaptador, específico para cada enzima, foi adicionado 90 µL do *mix*. Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3 minutos	1 vez
94°C	30 segundos	30 vezes
60°C	45 segundos	
68°C	60 segundos	
68°C	7 minutos	1 vez
4°C	Infinito	

Ao término da reação de PCR, foi realizado um gel 1,5% TBE, em corrida de eletroforese de 120 V, para excluir possível contaminação na reação controle (isto é, uma reação sem adição de DNA).

4.2.2.1.3.5 Purificação da PCR

O produto de PCR proveniente dos três tubos foi colocado em um único poço de uma microplaca com filtro (*QIAGEN MinElute 96 UF PCR Purification Plate*). Foi aplicado vácuo a essa placa de ~600 mbar (1 milibars corresponde a 100 Pa - pressão atmosférica), até que os poços secassem. Quando secos, lavou-se os poços com 50 μL de *H₂O molecular biology-grade (Accugene)* por três vezes. Depois de removido o excesso de líquido com papel absorvente, foi adicionado 45 μL de tampão EB, agitando-se a placa por 10 minutos em vórtex. A solução contendo o produto da PCR foi retirada e transferida para tubos de 0,2 μL . O produto foi ainda quantificado quanto à concentração de DNA, utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop[®] ND 1000 UV-Vis, na absorbância de 260/280 nm. Nessa etapa, a concentração foi ajustada para 90 ug de produto da PCR em solução final de 45 μL de EB.

4.2.2.1.3.6 Fragmentação

Primeiramente, todo o produto de PCR purificado (45 μL) foi diluído com 5 μL de tampão de fragmentação 10X (*Affymetrix*). A essa solução foi acrescentado 5 μL de um *mix* de fragmentação, feito de acordo com a padronização existente no laboratório, conforme segue:

Reagente	1 reação
<i>GeneChip Fragmentation Reagent</i>	0,7 μL
Tampão de fragmentação (10X)	4 μL
H ₂ O Molecular Biology Grade	35,3 μL
Total	40 μL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
37°C	35 minutos
95°C	15 minutos
4°C	Infinito

Com o término do programa foi feito um gel de agarose 4% TBE para checar a eficácia da fragmentação. Os fragmentos gerados devem conter menos que 180 pares de bases.

4.2.2.1.3.7 Marcação com biotina (Labelling)

Nesse processo, o DNA fragmentado foi marcado com biotina para gerar uma sonda de hibridização. Essa etapa foi realizada imediatamente após a fragmentação. Foram realizados *mixes* com os reagentes nos seguintes volumes:

Reagente	1 reação	Concentração final na reação
Tampão TdT (<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i>) (5X)	14 µL	1X
GeneChip DNA Labelling Reagent (30 mM)	2 µL	0,857 mM
TdT (30 U/ mL)	3,5 µL	1,5 U/µL
Total	19,5 µL	

Foram misturados 50,5 µL de DNA fragmentado e 19,5 mL de *labelling mix* e levados ao termociclador de acordo com o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
37°C	4 horas
95°C	15 minutos
4°C	Infinito

Com o término do programa seguiu-se para a hibridização dessa sonda ao *chip*.

4.2.2.1.3.8 Hibridização da sonda com o chip de SNPs

Para a hibridização foi feito apenas um *mix* para as duas enzimas, o qual foi produzido com os reagentes nos seguintes volumes:

Reagente	1 reação	Concentração final na reação
MES (12X; 1,22 M)	12 µL	0,066 M
DMSO (100%)	13 µL	5%
Denhardt's Solution(50X)	13 µL	2,5X
EDTA (0,5 M)	3 µL	5,77 mM
HSDNA (10 mg/mL)	3 µL	0,115 mg/mL
De OCR 0100	2 µL	1X
de Cot-1 Humano (1 mg/mL)	3 µL	11,5 ug/mL
Tween-20 (3%)	1 µL	0,0115%
TMACL (5M)	140 µL	2,69 M
Total	190 µL	

Acrescentou-se 190 µL desse *mix* em 70 µL do produto da fragmentação e levou-se para o termociclador de acordo com o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
95°C	10 minutos
48°C	2 minutos

Ao término da reação, 200 µL do produto foi injetado nos *chips* específicos para cada enzima e esses foram colocados para hibridizar no forno de hibridização, por um período de 16 a 18 horas à 49°C a 60 rpm.

4.2.2.1.3.9 Lavagem e escaneamento dos chips

Após a retirada do *chip* do forno de hibridização, a sonda que ele continha foi removida com auxílio de uma pipeta e adicionou-se 250 µL de tampão de conservação (*Holding Buffer*), constituído por:

Reagente	Para 10 mL
MES 12X	830 µL
NaCl 5M	1,85 mL
Tween 20 10%	10µL
H ₂ O SIGMA	7,31 mL

Em seguida, o *chip* foi levado para a etapa de lavagem e coloração na estação de lavagem (*Fluidics Station 450* da *Affymetrix*), a qual deve estar devidamente preparada,

contendo as três soluções necessárias: tampão de conservação, solução de coloração com SAPE (*Streptavidin Phycoerythrin*) e solução de anticorpo marcado com fluorescência.

Primeiramente foi feita a solução de coloração pura, a qual foi constituída por:

Reagente	1 reação
H ₂ O SIGMA	800,04 µL
SSPE 20X	360 µL
Tween20 3%	3,96 µL
Denhart-s 50X	24 µL
Total	1188 µL

Para se obter a solução de coloração com SAPE (*Streptavidin Phycoerythrin*) acrescentou-se 6 µL de SAPE em 594 µL de solução de coloração.

A solução de anticorpo marcado com fluorescência foi composta por 594 µL de solução de coloração e 6 µL de Anticorpo Biotinilado (*Affymetrix*).

Com o término da lavagem, o *chip* foi escaneado no *GeneChip Scanner 3000* (*Affymetrix*).

4.2.2.1.3.10 Análise de dados

A informação do escaneamento dos *chips* e a geração de arquivos foram feitas pelo *GeneChip Operating Software* (GCOS) e *GeneChip® Genotyping Analysis Software* (GTYPE) da *Affymetrix*, respectivamente. A análise dos controles de hibridização, existentes nas bordas e no centro do *chip* de SNPs, foi realizada durante a visualização do escaneamento no GCOS. Os controles de hibridização fornecem informação sobre a ocorrência de hibridização da sonda com os SNPs do *chip*. A qualidade da hibridização da amostra foi avaliada pelo índice de *SNP Call* (número de SNP genotipados/número total de SNPs no *chip*), fornecido pelo programa GTYPE, o qual foi considerado aceito quando >80%. O genótipo dos indivíduos, em relação aos SNPs analisados, foi determinado pelo programa GTYPE como sendo: AA, AB ou BB, onde: A representa o alelo mais frequente na população; B, o alelo menos frequente e AB, o heterozigoto (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Para a análise de resultados os dados gerados foram exportados para o programa *Homozygosity Mapper*, o qual realiza mapeamento de regiões em

homozigose entre indivíduos, pertencentes ou não à mesma família. O programa seleciona as regiões de acordo com um *score* de homozigosidade entre os indivíduos afetados, que deve ser maior que 80% do maior valor de *score* obtido. No presente trabalho foi considerado região informativa, de acordo com o critério utilizado no Laboratório, quando: pelo menos quatro dos seis indivíduos afetados testados forem homozigotos (AA ou BB) para os SNPs da região.

4.2.2.1.4 Sequenciamento de genes candidatos

Após a análise inicial dos haplótipos formados pela genotipagem dos marcadores microssatélites foi selecionada uma possível região candidata flanqueada pelos marcadores microssatélites D17S1806 e D17S784, e que contém, entre outros, o gene *CBX8*. Em uma segunda análise, foi selecionada uma região candidata flanqueada pelos marcadores microssatélites D17S784 e D17S668, a qual contém os genes *EIF4A3*, *CARD14* e *NPTX1*. Todos esses genes foram selecionados para serem sequenciados. Dois dos 26 indivíduos afetados (indivíduos 3 e 8) foram, aleatoriamente, selecionados para o sequenciamento dos genes candidatos.

4.2.2.1.4.1 CBX8

Foi realizado o sequenciamento dos 5 éxons, bem como de suas regiões de *splicing*, do gene *CBX8* nos indivíduos selecionados. Os primers necessários para o processo de sequenciamento de todas as regiões codificantes do gene foram desenhados com auxílio do programa *Gene Runner version 3.05* (Copyright © 1994 Hastings Software, Inc. e o programa online *Primer3 Input version 0.4.0*; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), do banco de dados online *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) e do banco de dados online *UCSC Genome Browser Home* (<http://genome.ucsc.edu/>). A Tabela 4 mostra as sequências dos primers utilizados para o sequenciamento.

Tabela 4 - Primers desenhados para sequenciamento do gene *CBX8* e suas características.

Primer	Éxons	Primer da fita sense	Primer da fita anti sense	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento
1	1	CGTCAGCGGGAGAGTATTATG	GTGCATCGCTGCAAGTCTAA	339 pb	58,2°C
2	2, 3 e 4	GGGTTTCGAGCATTTCATCTG	TCAGGGAACCTCCCTCCTACA	719 pb	58,2°C
3	5	CCCAGGCATCATAGGGTAAAG	CTTCCTGCCCTTGAGGTACT	548 pb	58,2°C
4	5	GGTACCAGCAGAGTGGATGA	CCACCACCTTCTCCAGGTTA	547 pb	58,2°C
5	5	AGGGTGCCCTAGATCCCAAT	CAAAAACCTGAGGGGGAGGA	449 pb	58,2°C

4.2.2.1.4.1.1 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada separadamente para cada par de primer. Dessa forma, foram preparados cinco *mixes* de PCR, um para cada primer, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas, o qual resultou em um produto com os seguintes volumes:

Reagente	1 Reação
H ₂ O Milli Q	13,8 µL
Tampão GE (10X)	2,0 µL
dNTP (2,5 mM cada)	1,6 µL
Primer F (20uM)	0,7 µL
Primer R (20uM)	0,7 µL
Taq polimerase GE (5U/µL)	0,2 µL
DNA (50ng/µL)	1,0 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 minutos	1 vez
94°C	30 segundos	35 vezes
T annealing °C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	1 vez
4°C	infinito	

O produto de PCR foi, então, submetido a uma purificação enzimática com *Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase (EXO I - SAP)* de acordo com os seguintes volumes:

Reagentes	1 Reação
Produto de PCR	18 µL
SAP (1U/µL)	2,25 µL
Exo I (10U/µL)	1,125 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
37°C	1 hora
80°C	15 minutos
4°C	infinito

Em seguida foi realizada a reação de sequenciamento de acordo com os seguintes volumes:

Reagentes	1 Reação
Água MilliQ	2 µL
Sequencing Buffer (5X)	1 µL
Primer Forward ou Reverse (5uM)	1 µL
Big Dye Terminator v3.1 Cycle	2 µL
Produto de PCR purificado	4 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
96°C	1 minuto	1 vez
96°C	10 segundos	30 vezes
58,2 °C	5 segundos	
60°C	4 minuto	
10°C	infinito	

Ao término da reação o produto do sequenciamento foi submetido à purificação física por Sephadex de acordo com o seguinte protocolo:

- Obteve-se um volume de 10 µL de produto final de sequenciamento, dessa forma foi necessário adicionar 5 µL de água MilliQ em cada amostra, pois o volume final deve ser em torno de 15 µL. Foi colocado o Sephadex G-50 no enchedor de colunas *Multiscreen column loader*, o qual tem a função de dosar a quantidade de Sephadex apropriada para cada poço da placa Multiscreen. Depois de distribuído o pó em cada poço da placa foi adicionado 300 µl de água MilliQ, embrulhou-se a placa com filme plástico para evitar evaporação e incubou-se por 3 horas. Uma placa de PCR de 96 orifícios foi colocada embaixo da placa Multiscreen, presa com fita adesiva e centrifugada a 650g (2100rpm) por 5 minutos. Descartou-se o volume que passou para a placa

coletora. Foi acrescentado 140µl de água MilliQ por poço, centrifugado novamente a 650g (2100rpm) por 5 minutos e descartado o volume que passou para a placa coletora. Sem adicionar mais água, centrifugou-se novamente a 650g (2100rpm) por 2 minutos. A placa coletora foi retirada e presa outra placa de PCR limpa na placa Multiscreen. Adicionou-se o produto do sequenciamento ao centro de cada poço da placa (15 µL sobre o Sephadex). A placa foi centrifugada novamente a 650g (2100rpm) por 5 minutos. A placa com o produto do sequenciamento foi colocada no termo a 94°C por 15 minutos para secar.

O produto do sequenciamento foi lido no sequenciador automático ABI 3730 da *Applied Biosystem* e analisado pelo programa *Sequencher 4.9 Demo*.

4.2.2.1.4.2 *CARD14*

Foi realizado, nos dois indivíduos selecionados, o sequenciamento dos 20 éxons do gene *CARD14*, cuja sequência referência foi retirada do banco de dados online UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>).

Esse procedimento foi realizado com o mesmo protocolo da seção 4.2.2.1.4.1.1. A Tabela 5 fornece as características dos primers desenhados para sequenciar os éxons do gene em questão.

Tabela 5 - Primers desenhados para sequenciamento do gene *CARD14* e suas características.

Primer	Éxons	Primer da fita sense	Primer da fita anti sense	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento
1	1	ATGCTTCCTCTGCCGTAAAC	GTGGTTCCCTTCAAAGACA	644 pb	63,9°C
2	2	CTTTGCCCTTCTCGAGTCTG	GCCCTTTGCTTGTGTCTCTC	666 pb	63,9°C
3	3	CTTGAGGTCCAGGAGCTTTT	ACAAGGAAGAGGGGAAAGGA	743 pb	65,7°C
4	4	CGCGGTGCCTCATCTATAA	ACAGCAGGAAGGAAGGAGGT	566 pb	64-69°C
5	5	CCTGTGTTCTTCTCCTTGG	GATGAACAGGCCGACAGATT	473 pb	63,9°C
6	6	GAGAGACGAGTGAGAATTGACC	ACTAAATGGCCCACGCTGA	586 pb	63,5°C
7	7	CTCAGCGTGGGCCATTTAGT	ATCCATCACCACACTCCACA	574 pb	63,9°C
8	8	CTGGAAGCTGACGAGAGGAA	AGCCGAAATCACATCACTGC	450 pb	67,8°C
9	9 e 10	TGCCTCCTCTCCAGTCAGTT	CTGCTTCTATCTGCCCTTTCC	687 pb	63,9°C
10	11	AAGGGGTGGAGGAAGAGAAA	TGAAGATGCCCCGTGAGGTT	650 pb	66,8°C
11	12	GTAAGCAGCAGGTGGGAATC	AAAGTGACCACCCAGAGCAG	713 pb	67,8°C
12	13	GAAGGGTTGGCAGTTGACTC	TGATCCTCTCTTGGCTCTGG	478 pb	63,9°C
13	14	GCCAGACTCCATGACCCTTA	CAGTGATCTTGGCAGGCTTC	660 pb	65,7°C
14	15	TGTGTGGAGCTCTAGGTGGA	GGGAGATGATTGGCACTAGG	470 pb	63,9°C
15	16	GCTGCTGATTGGAGGGTAAC	TCCCTCTGTCCTGTACTCCTCT	688 pb	63,9°C
16	17	ATGGCTGAGGAGAAGGGTG	CAGGTGAGTGTGGGAATGTG	642 pb	67,9°C
17	18	CACATTCCCACACTCACCTG	CCCAAGCTGAGGAAACTGAG	571 pb	68,5°C
18	19	TGGCAAGCTCTATTCCCTCA	GCCAAAATCAGGGGAATCTC	464 pb	63,9°C
19	20	GGACCATTTGTAAGGCCAGAA	CCACACCACCTTCTTCTGCT	559 pb	63,9°C
20	20	CTGTGTTTAGGGGTGTTTGG	AAGTGCAGCCCCCATAGATT	692 pb	63,9°C

4.2.2.1.4.3 *CCDC40*

Foi realizado, nos dois indivíduos selecionados, o sequenciamento de 15 dos 20 éxons do gene *CCDC40* (éxons de 5 a 20), cuja sequência referência foi retirada do banco de dados online UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>), devido ao fato de esses éxons estarem dispostos dentro da região previamente selecionada pela análise de ligação.

Esse procedimento foi realizado com o mesmo protocolo da seção 4.2.2.1.4.1.1. A Tabela 6 fornece as características dos primers desenhados para sequenciar os éxons do gene em questão.

Tabela 6 - Primers desenhados para sequenciamento do gene *CCDC40* e suas características.

Primer	Éxons	Primer da fita sense	Primer da fita anti sense	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento
1	5	GGGATGCTTTTGCTGTCAC	TTAGGGTCAGGAGTGGGAGA	410 pb	63,9°C
2	6 e 7	AGAATCCCAAGCAGAAGCAG	GTGCCTTCCCCTCCTAAAAA	669 pb	63,9°C
3	8 e 9	GCAGTTTCCCAGTCTTACCC	GCAGTCACTCATCCAGCAGA	743 pb	63,9°C
4	10	AAGCGGGTACGGGTATCTT	CTCTTCCTCCCCTTCCTTTG	736 pb	63,9°C
5	10	CAAAGGAAGGGGAGGAAGAG	GATTACAGGTGCGAGCCACT	496 pb	71-64°C
6	11 e 12	GCATTGAGTTCGCCTTAGTG	GGAAAGGAGTGAGCACAGGA	747 pb	63,9°C
7	13	GTGGGATTATGGGGACACAA	CGGAATACTCTCTGGCCTTG	750 pb	63,9°C
8	14	TTTCATGACCTCAGGGTTCC	TAAGGCTGCGTGCAAATCC	740 pb	63,9°C
9	15 e 16	TGAAGGGAGCTACAGGGAGA	ACTGGGATATGGGTGTGAGC	726 pb	63,9°C
10	17	GTTTGCATAAGGAGCCCAGT	TGGTAAAAGCTGGGTCAAGG	531 pb	63,9°C
11	18	TCTCCACCTTGCACTGTCTG	GGTTAGCAGAACTGGGGATG	601 pb	63,9°C
12	19	GGATGGAGTGTGTGGAAGGT	AGCCCAGCCCATAACAGATA	487 pb	63,9°C
13	20	CTTTTCAGGCGTAGGTCTCG	GGAGTGCTGCAAACCAAAGT	681 pb	63,9°C

4.2.2.1.4.4 *EIF4A3*

Foi realizado, nos dois indivíduos selecionados, o sequenciamento dos 12 éxons do gene *EIF4A3*, cuja sequência referência foi retirada do banco de dados online UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>).

Esse procedimento foi realizado com o mesmo protocolo da seção 4.2.2.1.4.1.1. A Tabela 7 fornece informações sobre os primers e as temperaturas de anelamento utilizadas.

Tabela 7 - Primers desenhados para sequenciamento do gene *EIF4A3* e suas características.

Primer	Éxons	Primer da fita sense	Primer da fita anti sense	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento
1	1	ACGCCCAGTTCCTTTTCAC	GAATGAAGGACGCTGAGGTG	752 pb	60,2°C
2	2	TCTTTCCACCCCTCTACTGCA	GAGGGTGAGGCAGGAGAATA	724 pb	62,8°C
3	3	GCCTCCTCGCAGTTAAGATG	TCTCACCTTCTGGATCTGCAC	679 pb	56,5°C
4	4	ATAGGTCTCAGTCCGGCACA	AACTACCGAGAGCACACAAGC	740 pb	63,9°C
5	5	TGTCAGAGAAAAGAGCAGGAG	AAGTGACCCAGGTGCAAAAG	408 pb	59,4°C
6	6	CTTTTGACCTGGGTCACTTG	GGTTTCCCTTTGGTGCTTCT	534 pb	63,9°C
7	7	AGAAGCACCAAAGGGAAACC	CGGGTTTTGACACGAGCTT	500 pb	61,8°C
8	8	TGTGTGACGGAAGTGGTGAT	TGGCTGATATCGCTGTTCTG	527 pb	60,7°C
9	9	GAGTGCACCCCAACATTTTC	AATCCACGCTTTCTGACCAC	627 pb	61,8°C
10	10 e 11	TGGAGCACATGACCGAAGTA	GTTGCAGTGAGCCGAAATC	729 pb	61-68°C
11	12	ACAGACACGTGCACCATAGC	GGCAGGCCATTTATGAGAAG	406 pb	61,8°C

4.2.2.1.5 Sequenciamento do exoma

Paralelamente a esses procedimentos, foi realizado, em outra Instituição, o sequenciamento do exoma do indivíduo 17 (família 15: III-2), selecionado por apresentar maior concentração de DNA a 260/280 nm. Esse sequenciamento foi realizado em colaboração com o Dr. Andrew Wilkie do Clinical Genetics Group, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK e de acordo com o protocolo utilizado no referido laboratório.

Os resultados do sequenciamento do exoma, previamente analisados por especialistas em exoma, foram fornecidos pelo Laboratório de Oxford e listavam todas as alterações encontradas.

4.2.2.1.5.1 Sequenciamento de Sanger das alterações encontradas no sequenciamento do exoma

As alterações encontradas no sequenciamento do exoma, que não constituíram SNPs descritos em bancos de dados online (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), foram sequenciadas pelo método de Sanger, nos indivíduos 3 e 8. Paralelamente foi realizada uma análise manual dos dados gerados pelo sequenciamento do exoma, em todo o cromossomo 17, apontado nas análises de ligação como contendo o loco da síndrome. Regiões que continham baixa cobertura pelas sondas utilizadas para o sequenciamento do exoma foram sequenciadas pelo método de Sanger, a saber: éxon 1 do gene *DRG2*, éxon 1 do gene *FBXL20* e região 3' UTR do gene *MED1*. Na Tabela 8 foram dispostas as regiões sequenciadas, os primers e as condições da PCR.

Tabela 8 - Primers desenhados para sequenciamento das alterações obtidas pelo sequenciamento do exoma e suas características.

Gene	Cromossomo	Éxon	Primer da fita sense	Primer da fita anti sense	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento
<i>CRLF2</i>	X	6	CTGGGCAACAGAGTGAGGTT	CCAGGGAAATGACTCTATCAGG	461 pb	63,9°C
<i>USP26</i>	X	1	CATGGCTGCCCTATTCCTAC	AGCAAAGGCATCCTCTGAAG	483 pb	63,9°C
<i>FLNA</i>	X	12	ATGTGGTGATCCTCGGTGTT	CTGTGAACTCTGCTGGCTTG	697 pb	63,9°C
<i>HECTD4</i>	12	24	AGGATGGGTGGATGTGTGAT	ACGAGGACATCAGAGGGGTA	449 pb	59,4°C
<i>PRUNE2</i>	9	8	GTTCTCTGAACTCGGCTTGG	AAGTAGGTGGGGTGGCAGTT	551 pb	63,9°C
<i>PRRC2B</i>	9	20	TCTATCGGGGTTGGTGTGTT	CCCAGGAATTGAGGAAGATG	464 pb	59,4°C
<i>FN3KRP</i>	17	5	CCATGAGACTCCGGTTCCT	GTGGAGTAAGGCTGGGATGA	582 pb	63,9°C
<i>DRG2</i>	17	1	ACGCTGTTCTCTTTGGCTTC	CAGAGTCCTGATTCCCTTGC	609 pb	63,9°C
<i>FBXL20</i>	17	1	GCAGGTGGGGAGTGTTTTT	CCCCTAATTTCTCCCTCAA	724 pb	62,8°C
<i>MED1</i>	17	3'UTR	TCCTATCCCGTTGGTTTCTG	CCCACCCGCTAAAATACTTC	623 pb	62,8°C

4.2.2.1.6 Sequenciamento da região 5' UTR e éxon 1 do gene *EIF4A3*

Como regiões do exoma contendo alta taxa do par de nucleotídeos CG apresentam baixa cobertura no sequenciamento do exoma, os genes considerados candidatos com base no estudo de ligação, foram revisados para verificar se eles continham regiões de baixa cobertura. Apenas a região 5' UTR e parte do éxon 1 do gene *EIF4A3* apresentaram essa característica. Devido à prévia dificuldade de amplificação dessa região, pelo método de Sanger, foi necessário redesenhar os primers dividindo a região em duas partes. Os primers utilizados foram 5'ACGCCAGTTCCCTTTCAC3' e 3'GAACGTGGGGGTCACATC5' gerando um produto de PCR de 424 pb, com temperatura de anelamento de 60,2°C; e 5'AAAGCGGCTGCTCAAAGAG3' e 5'GAATGAAGGACGCTGAGGTG3' gerando um produto de PCR de 407 pb com uma temperatura de anelamento de 60,2°C.

A região 5' UTR e o éxon 1 do gene *EIF4A3* foram sequenciados em todos os afetados da amostra e em seus pais e irmãos não afetados. A região 5' UTR foi investigada por meio da análise do produto da PCR, em gel da eletroforese em 520 controles normais da população. Os indivíduos do grupo controle, que apresentaram banda de tamanho semelhante à dos indivíduos afetados ou de tamanho muito inferior, foram selecionados para o sequenciamento dessa região, a fim de caracterizá-la na população normal.

4.2.2.2 Análise de expressão do gene *EIF4A3*

Foram realizadas análise e quantificação da expressão do gene *EIF4A3* em um indivíduo afetado (indivíduo 11 - família 7: III-1), em sua mãe (família 7: II-9) e em cinco controles normais da população geral, através da técnica de PCR em tempo real.

4.2.2.2.1 Extração de RNA

A extração de DNA foi realizada a partir de sangue total dos indivíduos selecionados, utilizando-se a técnica de TrizolTM (Life Technologies), através do seguinte protocolo:

- Coletou-se 10ml de sangue com 0,4 ml de EDTA 5%, com auxílio de seringa, invertendo o tubo várias vezes para se obter uma solução homogênea. Esse sangue foi separado em duas alíquotas de 5ml cada, os quais foram colocados cuidadosamente em dois tubos *falcon* de 15 ml contendo 5 ml de Ficoll-Paque Amersham Pharmacia cada. Em seguida centrifugou-se a 2000 rpm por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi descartado o plasma e pipetado o anel de linfócitos formado pela centrifugação, o qual foi transferido para um tubo novo *falcon* de 15 ml. Acrescentou-se 10 ml de PBS gelado aos linfócitos, homogeneizou-se, centrifugou-se a 1500 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante.

A partir desse ponto, a extração do RNA realizada com o Kit de Extração NucleoSpin® RNAII da MACHEREY-NAGEL – O6/2009, Rev.10, de acordo com o protocolo do fabricante.

4.2.2.2.2 Síntese de cDNA

Após a extração e quantificação do RNA obtido foi realizada a síntese de cDNA usando SuperScript™ II RT, a qual exige a presença de 1000ng/10 µL de RNA.

Foi preparado um *mix*, com quantidade suficiente de cada produto para o número de amostras testadas, o qual resultou em um produto com os seguintes volumes:

Reagente	1 Reação
RNA	1000 ng
H ₂ O Milli Q	Completar para 10 µL
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500ug/ml)	1,0 µL
dNTP Mix (10 mM cada)	1,0 µL

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
65°C	5 minutos
Gelo	rapidamente

Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados rapidamente e adicionou-se 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 2 µL de 0,1 M DTT e 1 µL de RNase OUTTM (40 unidades/µL). Essa mistura foi incubada a 42°C por 2 minutos. Em seguida foi adicionado 1 µL de SuperScriptTM II RT (200 unidades).

Essa reação foi levada ao termociclador conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo
42°C	50 minutos
70°C	15 minutos
4°C	infinito

Por fim, acrescentou-se 1 µL (2 unidades) de *E. coli* RNase H para a remoção de RNA complementar ao cDNA e incubou-se a 37°C por 20 minutos.

4.2.2.2.3 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

Para a padronização da técnica de qRT-PCR para quantificação do nível de expressão do gene *EIF4A3*, foram desenhados *primers* localizados dentro da região 5' UTR, de forma que ele fosse específico para a isoforma que contém as repetições (Figura 7). Foram utilizados *primers* controles, para os genes referência *HPRT-1*, *SDHA* e *GAPDH* cujas sequências, bem como a padronização da reação, já estavam pré-estabelecidas no laboratório.

Fonte: UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly [homepage]. UCSC Genome Bioinformatic. [cited 2013 02 10]. Available from: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr17:78109013-78120851&hgslid=342884105&knownGene=pack&hgFind.matches=uc010wuc.2>

Figura 7 - Isoformas do gene *EIF4A3*. A segunda isoforma é a que contém as repetições de interesse.

As reações de amplificação em tempo real foram realizadas em cDNA dos indivíduos selecionados (um afetado, sua mãe e os cinco controles normais). Devido à

dificuldade de se obter a quantidade suficiente de RNA foi utilizado 2 µL de cDNA total e 12,5X Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®], EUA) em um volume final de reação igual a 20 µL. Testamos diferentes concentrações de *primers* e as mais adequadas para o nosso ensaio foram aquelas em que a combinação de concentrações permitiu uma razão de gene alvo/gene referência igual a 1 em uma amostra de cDNA controle. Esse índice é calculado usando o método *Delta Ct* (ΔCt) ($\Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ referência}$, onde $Ct \rightarrow$ número de ciclos em que a fluorescência gerada dentro de uma reação de amplificação do DNA ultrapassa um valor limite). *Delta Ct* igual a 0 indica uma razão de 1.

Para permitir comparação de nível de expressão entre afetado e controle, cada conjunto de *primers* (referência e teste) deve ter uma eficiência de amplificação semelhante. Esse importante parâmetro foi verificado através da análise do *slope* de uma curva padrão representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor de ΔCt em comparação ao log da quantidade inicial de ácido nucléico.

Na equação $y = ax + b$. O valor que aparece na posição **a** corresponde ao *slope* da reta e, se a eficiência do alvo e o controle estiverem semelhantes, esse valor deverá ser aproximadamente 2. A fórmula para o cálculo da eficiência ($\mathcal{E}$) é a seguinte:

$$\mathcal{E} = 10^{-1/\text{slope}}$$

Após a padronização da concentração ótima do primer e o cálculo da eficiência apenas com indivíduo controle, foi realizada a reação com os indivíduos afetados, mães e controles para a determinação da expressão, através da seguinte reação:

Reagente	1 Reação
Syber Green	12,5 µL
Primers F+R (100nM cada)	5 µL
DMSO	0,5 µL
cDNA total	2 µL
H ₂ O Milli Q	5 µL

Essa reação foi levada ao termociclador de qRT-PCR Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System conforme o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	10 minutos	1 vez
95°C	15 segundos	40 vezes
66 °C	15 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1 vez
4°C	infinito	

Após o término da reação foi extraída a média dos Ct, calculado o ΔCt e por fim a $\mathcal{E}^{\Delta Ct}$. Com o valor da $\mathcal{E}^{\Delta Ct}$ dos endógenos podemos calcular o fator de normalização (NF) de cada indivíduo para podermos calcular a expressão através da seguinte fórmula:

$$\text{Expressão} = \mathcal{E}^{\Delta Ct} / \text{NF}$$

4.2.3 Estudo funcional do gene *Eif4a3* em modelo animal (*zebrafish*)

A técnica de estudo funcional em *zebrafish* foi realizada pelo aluno de doutorado direto Lucas Alvizi, sob supervisão da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno em colaboração com o Instituto de Biologia Molecular e Celular de Rosário da Universidade de Rosário, Santa Fé, Argentina, sob responsabilidade da Prof. Dra. Nora Calcaterra, de acordo com protocolos previamente padronizados e otimizados pelo respectivo laboratório, conforme publicado (Alvizi et al 2012).

O papel do *Eif4a3* no desenvolvimento embrionário craniofacial foi avaliado no *Knockdown* de *Eif4a3* em embriões de *zebrafish*, por meio da utilização de um morfolino (MO), que bloqueia a tradução das isoformas *eif4a3*. Um *mismatch* do MO (cinco bases não pareadas em relação ao MO *eif4a3*) foi utilizado como um controle de especificidade do ensaio. Para isso, embriões de *zebrafish* no estágio de duas células foram injetados ou com um bloqueador de tradução de *eif4a3* ou com um morfolino *mismatch* controle (*GeneTools*). O desenvolvimento dos embriões foi observado nos períodos de 4, 15, 24 e 48 horas pós fertilização (hpf) e 5 dias pós fertilização (dpf). A expressão dos genes *p53* e *p21* foi avaliada por meio de qRT-PCR usando embriões com 24 hpf para checar os efeitos do morfolino e a ativação pelo *p21* da via apoptótica do *p53*. Para checar a intensidade da caracterização fenotípica produzida pela ação do morfolino, foi realizado hibridização in situ de RNA para expressão dos genes *myoD*, *sox9b* e *col2a1*. Também foi feito a quantificação da expressão de

sox9b, *foxd3*, *cnbp*, *sox10* e *tbx2* em embriões de 24 hpf através de qRT-PCR. Além disso, foi analisada, a formação de cartilagem e de osso através das colorações de azul de alcian e calceína, respectivamente. Finalmente, para detecção dos níveis de apoptose foi utilizada a coloração de laranja de acridina.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO DE LIGAÇÃO POR MICROARRAY DE SNP (*AFFYMETRIX GENECHIPS MAPPING 100K*)

5.1.1 Microarray de SNP com a enzima *XbaI*

Todos os DNAs digeridos com a enzimas de restrição *XbaI* tiveram SNP *Call* maior que 90%. Os dados obtidos para cada indivíduo foram dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de SNP *Call* obtidos para as enzimas *XbaI*.

Indivíduo	SNP <i>Call</i> (%) <i>XbaI</i>
2	90,89
3	92,99
5	97,94
8	93,28
10	95,55
12	91,03
19	94,92
Controle 1	96,25
Controle 2	96,95
Controle 3	98,69

Os genótipos dos indivíduos afetados, gerados pela enzima *XbaI*, foram comparados com aqueles do grupo controle para definição das regiões de homozigose informativas entre os afetados. De acordo com a análise dos dados, feita pelo *Homozygosity Mapper*, as regiões de homozigose evidenciadas pelo programa estão dispostas ao longo dos cromossomos 1, 4, 6, 7, 10, 11, 17 e 20. A localização cromossômica das regiões em homozigose encontradas foi representada na Figura 8 e os detalhes referentes à localização, descritos na Tabela 10.

Cromossomo

Figura 8 - Diagrama representando as regiões de homozigose (traçado vermelho) entre os indivíduos afetados genotipados.

Tabela 10 - Regiões de homozigose dos indivíduos genotipados por *microarray* de SNP (*Affymetrix GeneChips mapping 100K*) encontradas pelo *Homozygosity Mapper*.

Score	Cromossomo	Região cromossômica em pares de bases		Região cromossômica em intervalo de SNP	
292	1	157695412	157916325	rs1999793	rs16827466
291	1	158146532	158368309	rs3021476	rs10489826
311	4	88908136	90146649	rs4128340	rs9307064
291	4	90271978	90506718	rs10516834	rs2172892
304	6	62809771	63439193	rs208977	rs4035843
300	6	63958597	64194784	rs9294140	rs2146149
291	6	63742414	63893492	rs1417693	rs9294122
293	7	86629542	86896568	rs1635007	rs802101
288	7	89622628	89627710	rs10487091	rs259158
287	7	89627710	89635264	rs259158	rs10487094
357	10	58541887	60205780	rs10509061	rs2114562
311	10	58005632	58538600	rs2462443	rs10509058
306	10	57634415	58005632	rs10509043	rs2462443
294	11	39611165	39740619	rs10501215	rs1676681
292	11	56544745	56738678	rs518385	rs7117365
317	17	72699833	80588575	rs10512597	rs2306755
300	17	69386788	69490044	rs10512567	rs2190712
318	20	54235654	54410935	rs850706	rs6069418
289	20	54410935	54535415	rs6069418	rs992635

Com base nos dados obtidos da análise no programa *Homozygosity Mapper* foi possível a seleção de uma região do cromossomo 17 (posição física no cromossomo: 69386788 pb a 80588575 pb) de aproximadamente 11,2 MB, dentre as regiões pré-selecionadas. Essa região foi a que melhor correspondeu aos critérios de seleção, ou seja, que teve *score* maior que 80% do maior valor de *score* obtido (Tabela 10); que pelo menos cinco dos sete afetados testados fossem homozigotos (AA ou BB) e, ainda, que pelo menos dois dos três indivíduos controle tivessem genótipo diferente dos indivíduos afetados. Os genótipos da região do cromossomo 17 foram dispostos na Tabela 11. A seleção dessa região baseou-se inicialmente em dois SNPs, considerados mais informativos (rs10512617 e rs2889529, destacados em vermelho na Tabela 11). A microrregião, onde estão localizados esses dois SNP, se encaixa nos critérios pré-estabelecidos para a seleção de regiões candidatas e, para que tivéssemos uma margem de segurança, foi expandida para a realização da análise de ligação (Tabela 11).

Tabela 11 - Genótipos da região do cromossomo 17, escolhida para ser analisada através de análise de ligação, fornecida pelo *Homozygosity Mapper*. (Observar em destaque vermelho, os dois SNPs informativos).

SNP	Posição física (pares de bases)	Score	2	3	5	8	10	12	19	C1	C2	C3
rs10512567	69386788	220	AB	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AB
rs10512568	69386951	300	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA
rs9302934	69387341	300	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	NI	BB
rs2017682	69428504	300	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	BB
rs1990222	69441277	300	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA
rs4558455	69480532	300	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs2190712	69490044	240	AA	AB	AB	AB	AB	BB	AA	AA	AB	AB
rs10512569	69490873	247	BB	BB	BB	BB	AB	BB	BB	NI	BB	BB
rs10512570	69491103	253	BB	AA	AA	AB	AA	AA	BB	AA	AA	AB
rs10512571	69491179	253	BB	AA	AA	AB	AA	AA	BB	AA	AA	AB
rs10512572	69512099	248	NI	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AA
rs9302939	69661067	251	AA	AA	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AB
rs9302940	69661152	254	BB	BB	BB	NI	BB	BB	BB	BB	BB	NI
rs10512576	69666503	253	AA	AA	AB	NI	AA	AA	AA	AA	AB	AB
rs2430557	69666553	251	AA	AA	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AB
rs7218313	69831308	244	BB	AB	BB	AB	AB	BB	AA	AB	AB	AA
rs7217914	69831434	245	BB	AB	BB	NI	AB	BB	AA	AB	AB	AA

Continua

Continuação

SNP	Posição física (pares de bases)	Score	2	3	5	8	10	12	19	C1	C2	C3
rs7223546	69832043	244	AA	AB	AA	AB	AB	AA	BB	AB	AB	BB
rs9302942	69888533	268	NI	AA	BB	AB	BB	BB	AA	AB	NI	AA
rs10491193	69896515	264	AB	BB	AB	AB	BB	AA	BB	AB	AB	BB
rs10491194	69898010	271	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs918077	70165378	270	NI	BB	AB	NI	BB	BB	BB	AB	BB	BB
rs1010045	70290088	270	AA	AA	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA
rs10512585	70305287	270	AA	AA	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA
rs2016210	70311726	266	AA	AB	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AB	BB
rs4793431	70331665	266	AA	AB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB
rs1008620	70362790	273	BB	AA	AB	AB	NI	AA	BB	BB	AB	BB
rs10512586	70415077	274	AA	AA	AA	AB	AA	BB	AA	AB	AB	AB
rs2302740	70424645	273	AA	BB	AB	AB	AA	BB	AA	AB	BB	AB
rs4793448	70425147	280	AA	AA	AB	NI	AA	AA	AA	AB	AA	AA
rs1035076	70462845	283	AA	AA	BB	BB	AA	BB	AA	NI	BB	NI
rs718072	70584327	283	BB	NI	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs2344989	70924851	283	NI	NI	BB	NI	NI	NI	AA	BB	BB	AA
rs2452932	70926456	280	AA	AA	AB	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA
rs2466510	70962172	283	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs2452930	70963920	283	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs10512592	70964029	258	BB	NI	BB	AB	AB	AA	BB	BB	AB	BB
rs2934226	70964087	259	AA	AA	AB	NI	AB	AA	AA	AB	AA	AA
rs10512593	70980287	264	AA	AA	AB	BB	BB	BB	AA	AB	AB	AA
rs8073204	70986091	264	AA	AA	AB	BB	BB	BB	AA	AB	AB	AA
rs9302952	71064226	265	AB	BB	NI	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs998571	71165292	245	AA	AB	AB	AB	BB	AA	BB	AB	AA	AB
rs1466113	71165318	246	BB	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AB
rs2345420	71424005	242	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AB	AB	AB	AA
rs7207590	71500251	244	AA	NI	AA	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AA
rs2019877	71759960	243	AA	AB	AB	AA	AB	AA	AA	AA	AB	AA
rs2354762	71978969	264	BB	BB	AB	BB	BB	BB	BB	AB	BB	BB
rs10512596	72523224	270	AA	AA	AA	BB	AB	BB	BB	BB	BB	AB
rs783250	72523259	267	BB	BB	BB	AB	AB	BB	AA	AB	AB	AB
rs512100	72648962	285	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs513805	72649120	285	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	NI
rs10512597	72699833	283	AA	AA	AA	AB	AA	BB	AA	AB	AB	AA
rs7420	72765215	316	AA	NI	BB	BB	BB	BB	AA	AB	AB	AA

Continua

Continuação

SNP	Posição física (pares de bases)	Score	2	3	5	8	10	12	19	C1	C2	C3
rs10512602	72774175	316	AA	AB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AB	AA
rs10512601	72801706	309	BB	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs10512600	72812979	313	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs1478785	73222865	313	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA	AA	AA
rs2053158	73393459	313	BB	AA	AA	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB
rs3851021	73721156	313	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs820168	73721365	309	BB	BB	AB	AB	AA	AA	BB	AB	AB	BB
rs3682	73942150	310	AA	NI	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	BB
rs2598424	74149078	309	AA	AA	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AA
rs10512605	74212382	311	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	AB	BB
rs1860351	74609494	311	BB	NI	BB	BB	NI	NI	BB	BB	BB	BB
rs719430	74639530	309	AA	NI	AB	BB	NI	BB	AA	AA	AB	AB
rs2411036	74815685	313	AA	BB	BB	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
rs7405591	75278523	293	BB	AB	BB	BB	AB	BB	BB	BB	AB	BB
rs2411127	75572551	297	BB	AA	BB	AB	AB	BB	BB	AB	BB	AB
rs4789523	76012854	299	AA	AA	BB	NI	AA	BB	AA	AA	AB	AB
rs4129767	76403984	299	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB	AB
rs6501224	76502455	297	AA	BB	AA	AA	AB	AA	AA	AB	AA	AB
rs10512617	76693551	294	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	AB
rs2889529	76897475	306	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AB	AB	AB
rs2707047	77123614	306	AA	BB	AA	AA	AB	AA	AA	AB	AA	AA
rs2007979	77123649	317	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs9302889	77160151	317	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA
rs2045660	77176351	317	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs2377402	77331446	317	BB	NI	BB	BB	BB	BB	BB	AB	BB	BB
rs951126	77632963	317	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs2361701	78066617	317	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs2333990	78784925	317	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs4129124	79156551	317	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	NI	AA
rs2271090	79246605	317	AA	AA	AB	AA	AA	AA	AB	BB	AA	BB
rs9271	80573272	317	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB
rs2306755	80588575	317	BB	AA	BB	BB	AB	BB	AA	BB	BB	AB

AA e BB = homozigoto; AB = heterozigoto; NI = não informativo.

Para verificar a fidelidade do sistema de genotipagem do microarray de SNP (*Affymetrix GeneChips mapping 100K*), foi realizado a genotipagem em duplicata de dois indivíduos com maior valor de SNP *Call* (indivíduo 10 e controle 1). Os valores de SNP *Call* obtidos na primeira genotipagem foram dispostos na Tabela 10 e, os valores obtidos na segunda genotipagem foram de 89,44% para o indivíduo 10 e 99,13% para o controle 1. A frequência de erros foi numa proporção de 5,3 a cada 1000 SNPs para o indivíduo 10 e, 1 a cada 1000 para o controle 1. A frequência baixa de erros (de acordo com parâmetros estabelecidos pelo próprio laboratório), comprovou a fidelidade do sistema de genotipagem do microarray de SNP (*Affymetrix GeneChips mapping 100K*) para a amostra.

5.1.2 Microarray de SNP com a enzima *HindIII*

Após a seleção da região de homozigose utilizando os genótipos gerados pelo *microarray* de SNP com a enzima *XbaI*, foi feita genotipagem com a enzima *HindIII*, em quatro dos sete afetados testados. Três desses quatro indivíduos tiveram valor de SNP *Call* maior que 80% (Tabela 12). A análise feita através do programa *Homozygosity Mapper* indicou homozigosidade para a região do cromossomo 17, confirmando a região previamente selecionada.

Tabela 12 - Valores de SNP *Call* obtidos para as enzimas *HindIII*.

Indivíduo	SNP <i>Call</i> (%) <i>HindIII</i>
5	87,21
10	25,29
12	82,84
19	90,63

5.2 ESTUDO DE LIGAÇÃO POR MARCADORES MOLECULARES

5.2.1 Estudo de ligação por marcadores microssatélites do painel ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0

Com base nos dados obtidos da genotipagem no *microarray* de 100K, a região do cromossomo 17, cujo tamanho era de 11,2 MB, foi considerada forte candidata e, a partir de então, foram estudados marcadores moleculares nessa região. De acordo com a genotipagem dos marcadores microssatélites do painel ABI PRISM® Linkage Mapping Set version 2.0 (D17S949, D17S785, D17S784 e D17S928) (Tabela 1) foi possível montar os haplótipos dos 73 indivíduos selecionados para análise (23 probandos e 50 familiares), porém os resultados fornecidos não foram informativos, ou seja, não foi possível prever uma ligação entre algum marcador e o gene causador da SRCP. Dessa forma foi necessário escolher novos marcadores que estivessem distribuídos ao longo dessa mesma região.

5.2.2 Estudo de ligação com marcadores microssatélites do Banco de Dados Online NCBI

Foram selecionados sete novos marcadores microssatélites através do banco de dados online *NCBI* dispostos na mesma região do cromossomo 17. Dos sete marcadores, seis estavam dispostos entre os marcadores microssatélites D17S785 e D17S784, previamente genotipados (D17S801, D17S937, D17S802, D17S1847, D17S745, D17S1806), e um, entre os marcadores D17S784 e D17S928 (D17S668) (Tabela 2). Dos sete marcadores, dois foram considerados inadequados para análise de alelos, ou seja, não eram informativos (D17S801 e D17S745), portanto foram excluídos durante a construção dos haplótipos. Foram construídos haplótipos para os 73 indivíduos selecionados. No Apêndice 3 foram dispostos os haplótipos dos 23 probandos.

O estudo dos haplótipos das famílias (total de 20) do grupo selecionado permitiu verificar o padrão de segregação dos alelos através das gerações e, assim, detectar, em um primeiro momento, grande probabilidade de ligação na região disposta entre os marcadores D17S1806 e D17S784 (posição física: 77445675 a 77802424 pares de bases), cujo tamanho

era de 0.36 MB. Oito das 20 famílias apresentaram segregação desses marcadores de forma compatível com herança autossômica recessiva, ou seja, pais heterozigotos para o alelo considerado de risco; filhos afetados homozigotos para o alelo de risco e, filhos não afetados heterozigotos para o alelo de risco ou homozigotos para o alelo *aparentemente normal*. Em onze famílias não houve evidência de padrão de herança autossômica recessiva para os alelos desses dois marcadores, mas, não foi excluída a possibilidade de ligação para essa região. Apenas uma família excluiu a possibilidade de ligação para a região por apresentar alelos para o marcador D17S784 discrepante do alelo anteriormente considerado de risco. Análise dos haplótipos mostrou ainda, possível ligação para uma região de 2.2 MB, entre os marcadores D17S784 e D17S668 (posição física: 77802191 a 80028175 pares de bases). Devido ao tamanho dessa região e a quantidade de genes presentes (aproximadamente 70), decidiu-se genotipar novos marcadores para aumentar a confiabilidade da informação.

5.2.3 Estudo de ligação com SNPs do Banco de Dados Online do NCBI

A análise dos haplótipos obtidos dos SNPs do Banco de Dados Online do NCBI selecionados para a região do cromossomo 17, localizados entre os marcadores D17S784 e D17S668 (Tabela 3) mostrou uma região fortemente candidata a estar ligada ao alelo patogênico, disposta entre os marcadores rs2289534 (posição física: 78032915 pares de bases) e rs3829612 (posição física: 78161402 pares de bases), cujo tamanho é de aproximadamente 128,5 kb, contendo quatro genes (*CCDC40*, *GAA*, *EIF4A3* e *CARD14*).

5.3 ESTUDO DE LIGAÇÃO POR MICROARRAY DE SNP (*AFFYMETRIX GENECHIPS MAPPING 500K*)

Para se obter maior confiabilidade na região que estava sendo estudada, foi realizada uma nova análise de *microarray* de SNP com a plataforma 500K em seis indivíduos da amostra (indivíduo 2 - família 6: VI-5; indivíduo 3 - família 5: IV-17; indivíduo 4 - família 4: IV-3; indivíduo 17 - família 15: III-2; indivíduo 19 - família 6: V-2 e indivíduo 23), selecionados conforme exposto na metodologia. Com essa plataforma é possível genotipar 500 mil SNPs, aumentando, assim, em cinco vezes a densidade de marcadores e fornecendo

maior confiabilidade na seleção de uma menor região de homozigose. Esta análise apontou ligação para uma região de aproximadamente 1,1 MB no cromossomo 17 (posição física: 77349720 pb a 78483560 pb), muito próxima da região anteriormente selecionada com o uso da plataforma 100K de *microarray* de SNP, e que, também, confirma a região selecionada pela análise de ligação feita com os SNPs.

Os resultados obtidos com a análise de *microarray* de SNP com a plataforma 500K estão descritos abaixo.

5.3.1 *Microarray* de SNP com a enzima *NspI*

Dos seis indivíduos submetidos ao *microarray* com a enzima *NspI*, cinco tiveram SNP *Call* maior que 90%, considerado significativo para análise de homozigose (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores de SNP *Call* obtidos para as enzimas *NspI*.

Indivíduo	SNP <i>Call</i> (%) <i>XbaI</i>
2	93,81
3	91,48
4	91,85
17	94,71
23	92,95

Os dados da genotipagem por *microarray* de SNP dos indivíduos, que tiveram SNP *Call* > que 90% foram exportados para o programa *Homozygosity Mapper*, o qual evidenciou uma região de homozigose disposta no final do cromossomo 17, confirmando a região candidata previamente estabelecida. A localização cromossômica da região em homozigose encontrada foi representada na Figura 9 e os detalhes referentes à localização, descritos na Tabela 14.

Cromossomo

Figura 9 - Diagrama representando as regiões de homozigose (traçado vermelho) entre os indivíduos afetados genotipados.

Tabela 14 - Regiões de homozigose dos indivíduos genotipados por *microarray* de SNP (*Affymetrix GeneChips mapping 500K*) encontradas pelo *Homozygosity Mapper*.

Score	Cromossomo	Região cromossômica em pares de bases		Região cromossômica em intervalo de SNP	
817	17	77349720	78483560	rs4790015	rs7212223

O programa *Homozygosity Mapper* selecionou uma região do cromossomo 17 (posição física no cromossomo: 77349720 pares de bases a 78483560 pares de bases, aproximadamente 1,1 MB). Os genótipos da região do cromossomo 17 foram dispostos na Tabela 15. Essa região se encaixa nos critérios pré estabelecidos para a seleção de regiões candidatas e foi confirmada após análise manual dos genótipos gerados pela plataforma *Affymetrix*.

Tabela 15 - Genótipos da região do cromossomo 17.

SNP	Posição Física (pares de bases)	Score	3	4	17	2	23
rs4790015	77349720	700	AB	BB	AB	BB	BB
rs12601898	77389101	812	AA	BB	AA	AA	AA
rs872276	77411247	812	BB	BB	BB	BB	BB
rs296142	77483676	810	BB	BB	AB	BB	BB
rs4313838	77698582	810	BB	BB	AB	BB	BB
rs4313839	77698619	810	AA	AA	AB	AA	AA
rs894864	77828790	812	AA	AA	AA	AA	AA
rs894863	77828802	812	BB	BB	BB	BB	BB
rs1285264	77849496	810	BB	BB	AB	BB	BB
rs4243244	77851087	810	AA	AA	AB	AA	AA
rs2587493	77852795	814	BB	BB	BB	BB	BB
rs1620608	77891369	814	AA	AA	AA	AA	AA
rs12940183	77891502	814	AA	AA	AA	AA	AA
rs2291931	77898934	814	AA	AA	AA	AA	AA
rs11657363	78007613	810	BB	BB	AB	BB	BB
rs1467979	78060743	810	BB	BB	AB	BB	BB
rs7567	78093549	811	BB	BB	BB	BB	BB
rs12601192	78136067	810	AA	AA	AB	AA	AA
rs3829611	78161815	817	AA	AA	AA	AA	AA
rs8068452	78165511	817	AA	AA	AA	AA	AA
rs6420487	78207690	817	BB	BB	BB	BB	BB
rs8079641	78212420	817	AA	AA	AA	AA	AA
rs12603583	78244237	817	AA	AA	AA	AA	AA
rs9905727	78272814	817	AA	AA	AA	AA	AA
rs8359	78368051	817	AA	AA	AA	AA	AA
rs7212223	78483560	629	BB	AB	AB	BB	BB

AA e BB = homozigoto; AB = heterozigoto.

5.3.2 Microarray de SNP com a enzima *StyI*

Concomitantemente à seleção da região de homozigose utilizando os genótipos gerados pelo *microarray* de SNP com a enzima *NspI*, foi feito genotipagem com a enzima *StyI*, nos mesmos indivíduos. Cinco deles tiveram valor de SNP *Call* maior que 90% (Tabela 16). A análise feita através do programa *Homozygosity Mapper* indicou homozigidade para

algumas regiões do cromossomo 17, todas localizadas dentro da região previamente selecionada com os genótipos provenientes do *microarray* de SNP com a enzima *NspI*.

Tabela 16 - Valores de SNP *Call* obtidos para as enzimas *StyI*.

Indivíduo	SNP <i>Call</i> (%) <i>StyI</i>
2	90,97
3	92,22
17	92,33
19	91,68
23	93,49

A localização cromossômica das regiões em homozigose encontradas foi representada na Figura 10, os detalhes referentes à localização foram descritos na Tabela 17 e os genótipos de cada indivíduo na respectiva região, na Tabela 18.

Figura 10 - Diagrama representando as regiões de homozigose (traçado vermelho) entre os indivíduos genotipados.

Tabela 17 - Regiões de homozigose dos indivíduos genotipados por *microarray* de SNP (*Affymetrix GeneChips mapping 500K*) encontradas pelo *Homozygosity Mapper*.

Score	Cromossomo	Região cromossômica em pares de bases		Região cromossômica em intervalo de SNP	
391	17	77796437	77878942	rs7218751	rs745603
385	17	77708264	77796437	rs8081537	rs7218751
385	17	78076998	78096086	rs1442314	rs4889970
384	17	78022245	78076998	rs2289529	rs1442314
384	17	78152514	78185527	rs7211994	rs2269376

Tabela 18 - Genótipos da região do cromossomo 17.

SNP	Posição Física (pares de bases)	Score	4	6	24	27	2	29
rs7218751	77796437	382	AA	AA	AB	AA	AA	AA
rs1696757	77800743	391	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs3751952	77813905	391	AA	AA	AA	AA	AA	AB
rs1696762	77839025	391	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs1285257	77864159	391	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs11652759	77870811	391	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs7503434	77872550	391	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs2165996	77873520	391	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs4889922	77874150	391	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs1285253	77876184	391	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs745603	77878942	382	AA	AA	AB	AA	AA	AA
rs1285286	77881777	382	BB	BB	AB	BB	BB	BB
rs11650121	78019780	382	BB	BB	AB	BB	BB	BB
rs2289529	78022245	382	AA	AA	AB	AA	AA	AA
rs4889814	78057851	384	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs715041	78058432	384	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs1442314	78076998	382	AA	AA	AB	AA	AA	AA
rs12600845	78077714	385	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs12452616	78090081	385	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs1800315	78092585	385	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs4889970	78096086	382	BB	BB	AB	BB	BB	BB
rs11150846	78098520	383	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs8065486	78138196	382	BB	BB	AB	BB	BB	BB
rs12451566	78144031	382	AA	AA	AB	AA	AA	AA
rs4889989	78151860	382	BB	BB	AB	BB	BB	BB
rs7211994	78152514	382	BB	BB	AB	BB	BB	BB
rs8065364	78162959	384	BB	BB	BB	BB	BB	BB
rs11655682	78164021	384	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs2269376	78185527	382	BB	BB	AB	BB	BB	BB

AA e BB = homozigoto; AB = heterozigoto.

Essa região, apontada pelo *Homozygosity Mapper*, como candidata (posição física: 77349720 a 78483560 pares de bases) confirma a análise de ligação feita com os SNPs (posição física: 78032915-78161402 pares de bases).

5.4 SEQUENCIAMENTO DE GENES CANDIDATOS

O primeiro gene sequenciado foi o gene *CBX8* (17q25.3) por estar contido na região inicialmente considerada candidata (entre os marcadores microssatélites D17S1806 e D17S784) e pelo fato de ser um componente do complexo multiprotéico *PCRI* do grupo Policômico, o qual é requerido para manutenção do estado de repressão transcricional de muitos genes, incluindo os genes *Hox*, durante todo o desenvolvimento. Entretanto, não foi encontrada nenhuma mutação, excluindo qualquer possibilidade de ser o causador da SRCP.

Com a restrição da região candidata entre os SNPs rs2289534 (posição física: 78032915 pares de bases) e rs3829612 (posição física: 78161402 pares de bases), três (gene *CARD14*, gene *CCDC40* e gene *EIF4A3*) dos quatro genes contidos nessa região foram selecionados para sequenciamento pelo método Sanger por apresentarem características que os enquadravam como candidatos em potencial. O gene *CARD14* codifica uma proteína que contém o domínio de recrutamento de caspase, a qual é um membro da família das proteínas guanilato-quinase (*MAGUK*) associadas a membranas. Os membros desta família de proteínas são proteínas de esqueleto que estão envolvidas num conjunto diversificado de processos celulares, incluindo a adesão celular, a transdução de sinal e de controle da polaridade celular. Esta proteína tem sido demonstrada por interagir especificamente com *BCL10*, uma proteína conhecida por funcionar como um regulador positivo da apoptose celular. O gene *CCDC40* codifica uma proteína necessária para a função dos cílios móveis, os quais atuam na formação correta do eixo axial direito e esquerdo, regulando a montagem do domínio interno da dineína (também chamado como braço interno da dineína) e o complexo regulatório de dineína, os quais controlam o batimento ciliar. Sabe-se, ainda, que a dineína está envolvida no movimento dos cromossomos e no posicionamento dos fusos mitóticos para a divisão celular. O gene *EIF4A3* codifica um membro da família de proteína *DEAD box*. Essas famílias estão implicadas em alguns processos celulares que envolvem alteração da

estrutura secundária de RNA, tal como início da tradução, *splicing* nuclear e mitocondrial e maquinaria do ribossomo e do spliceossomo. Baseado nesse padrão de distribuição acredita-se que alguns membros dessa família estão envolvidos em embriogênese, espermatogênese e divisão e crescimento celular. O quarto gene contido na região, gene *GAA*, foi excluído do sequenciamento pelo fato de estar associado à doença de Pompe (OMIM 232300), uma doença de depósito com grave comprometimento cardiomiopático e hipotonia e, portanto, com fenótipo distinto da SRCP.

O sequenciamento dos 20 éxons e regiões regulatórias do gene *CARD14* em dois indivíduos afetados (indivíduo 3 - família 5: VII-1 e indivíduo 8 - família 8: IV-15) e aparentemente não relacionados não identificou nenhuma alteração patogênica. Apenas o SNP rs2066964 foi encontrado no indivíduo 8.

O sequenciamento de 15 éxons (éxons 5-20) e regiões regulatórias do gene *CCDC40*, os quais estavam contidos na região de homozigose definida pela análise de SNPs, em dois indivíduos afetados e aparentemente não relacionados (indivíduos 3 e 8) não mostrou nenhuma alteração patogênica.

O sequenciamento dos éxons e regiões regulatórias do gene *EIF4A3*, exceto éxon 1 e região regulatória 5' UTR, em dois indivíduos afetados e aparentemente não relacionados (indivíduos 3 e 8) não mostrou nenhuma alteração patogênica.

5.5 ANÁLISE DOS DADOS DO SEQUENCIAMENTO DO EXOMA E SEQUENCIAMENTO DE SANGER DAS REGIÕES ALTERADAS E DE BAIXA COBERTURA

Os resultados do sequenciamento do exoma mostraram 41 alterações homozigotas não sinônimas, as quais estavam distribuídas em 34 genes; 27 alterações homozigotas sinônimas; 1211 alterações heterozigotas não sinônimas e 612 alterações heterozigotas sinônimas (dados não apresentados). A grande maioria dessas alterações eram polimorfismos de bases únicos já descritos em bancos de dados online (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Dentre as 41 alterações homozigotas não sinônimas, consideradas de interesse nesse estudo, sete foram selecionadas por não estarem descritas em bancos de dados do NCBI. O sequenciamento de Sanger dessas sete alterações (genes:

CRLF2, *USP26*, *FLNA*, *HECTD4*, *PRUNE2*, *PRRC2B* e *FN3KRP*), nos indivíduos 3 e 8, não mostrou nenhuma alteração.

O sequenciamento de Sanger nas regiões de baixa cobertura identificada no sequenciamento do exoma, dos genes *DRG2*, *FBXL20* e *MED1*, nos indivíduos 3 e 8, não mostrou alterações.

5.6 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 5' UTR E ÉXON 1 DO GENE *EIF4A3*

O sequenciamento do éxon 1 do gene *EIF4A3* (NM_014740.3), nos indivíduos 3 e 8, não mostrou alteração. O resultado do sequenciamento da região 5' UTR, por sua vez, mostrou que um segmento de 20 nucleotídeos (TCGGCAGCGGCACAGCGAGG), localizado aos 78120821 pares de bases do cromossomo 17 (*GRCh37/hg19*), estava repetido 16 vezes em ambos os alelos do indivíduo 8. O indivíduo 3 apresentou um dos alelos com 16 repetições e o outro, com 15 repetições desse segmento, caracterizando um heterozigoto composto. O sequenciamento dessa região, nos demais indivíduos afetados, mostrou homozigose de 16 repetições em 22 deles e heterozigose composta, para os alelos com 15 e 16 repetições, em outros 2 indivíduos (indivíduo 14 - família 12: III-6 e indivíduo 18 - família 16: IV-1). Todos os pais testados estavam em heterozigose para o alelo de 16 repetições, enquanto que os irmãos não afetados ou eram heterozigotos para o alelo de 16 repetições ou não tinham o alelo expandido (Tabela 19).

Tabela 19 - Genótipo dos indivíduos afetados e familiares quanto à expansão da região 5' UTR do gene *EIF4A3*.

Indivíduos/familiares	Genótipo
1	16/16
Pai	16/9
Mãe	16/10
Irmão	16/9
2	16/16
Pai	16/10
Mãe	16/7
3	16/15
Pai	16/10
Mãe	16/8
Irmão 1	16/10
Irmão 2	16/10
4	16/16
Pai	16/7
Mãe	16/7
Irmão 1	16/7
Irmão 2 (meia-irmã)	16/8
5	16/16
Mãe	16/6
6	16/16
Pai	16/10
Mãe	16/8
Irmão 1	10/8
Irmão 2	16/10
7	16/16
Pai	16/7
Mãe	16/7
Irmão	16/7
8	16/16
Pai	16/8
Mãe	16/5
Irmão 1	16/8
Irmão 2	8/5
9	16/16
Mãe	16/8
10	16/16
Pai	16/8
Mãe	16/3
11	16/16
Mãe	16/7
12	16/16
Pai	16/8
Mãe	16/8
Irmão	16/8
13	16/16
Mãe	16/7
Irmão	16/7
14	16/15
15	16/16
Mãe	16/7
16	16/16
Mãe	16/9
17	16/16
Pai	16/8
Mãe	16/8
18	16/15
Mãe	16/7
19	16/16
Mãe	16/7
Irmão 1	16/7
Irmão 2	16/7
20	16/16
Pai	16/7
21	16/16
22	16/16
23	16/16
24	16/16
Pai	16/8
Mãe	16/9
25	16/16
26	16/16

Cerca de 88% dos indivíduos afetados mostrou padrão de organização da região repetida caracterizado por CACA-20-nt inicial, seguido de 13 repetições de CGCA-20-nt, um CACA-20-nt e um CA-18-nt final (número total de repetições = 16) em homozigose. Os outros 12% apresentaram um padrão caracterizado por um alelo de 16 repetições (igual ao alelo anterior) e um alelo de 15 repetições caracterizado por CACA-20-nt inicial, seguido de 12 repetições de CGCA-20-nt, um CACA-20-nt e um CA-18-nt final (Figura 11). A análise do padrão de organização dos alelos nos pais mostrou que todos apresentavam o alelo padrão de 16 repetições em heterozigose, incluindo os pais dos 3 indivíduos (indivíduos 3, 14 e 18) que apresentaram um dos alelos com 15 repetições. O outro alelo presente nos pais tinha padrão de organização como os observados na população controle e, foi, portanto considerado normal.

Em relação ao grupo controle, a análise do produto da PCR da região 5' UTR nos 520 indivíduos, por meio do gel de eletroforese, mostrou que nenhum deles apresentava o mesmo tamanho de banda presente nos indivíduos afetados, conforme exemplificado na Figura 12. O sequenciamento dos 70 controles que apresentaram banda com tamanho muito próximo ou muito inferior ao observado nos indivíduos afetados mostrou variabilidade no padrão de alelos, tanto no tamanho quanto na organização dos motivos. Em relação ao tamanho, os motivos eram de 18 ou de 20 nucleotídeos (nt) e, na organização, três tipos foram observados: I) 20-nt, TCGGCAGCGGCACAGCGAGG, denominado CACA-20-nt; II) 18-nt, TCGGCAGCGGCAGCGAGG, denominado CA-18-nt; III) 20-nt com substituição do G>A na posição 12, TCGGCAGCGGCGCAGCGAGG, denominado CGCA-20-nt. A sequência do padrão alélico mais prevalente entre os controles (97%) foi caracterizada por: CACA-20-nt (repetido de 2 a 9 vezes); CA-18-nt (1 vez), CACA-20-nt (1 vez) e CA-18-nt (1 vez), totalizando de 5 a 12 repetições (Figura 11). Um dos 70 indivíduos do grupo controle selecionado apresentou a menor banda observada no gel de eletroforese e o sequenciamento mostrou um alelo raro, com apenas três repetições e com padrão de organização de motivo distinto (Figura 11). Esse mesmo padrão de banda e de alelo raro foi observado, também, em um dos alelos da mãe do indivíduo 10 (Tabela 19).

Figura 12 - Gel de agarose do indivíduo 3 e de 16 controles normais.

5.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *EIF4A3*

O efeito das 16 repetições dos 20 nucleotídeos na transcrição da isoforma 2 do gene *EIF4A3* foi avaliado por meio da PCR em tempo real com RNAm obtidos de leucócitos. Foram testados um indivíduo afetado (indivíduo 11), sua mãe e cinco controles normais da população. Um nível de expressão muito menor de RNAm foi observado no indivíduo 11 (homozigoto para as 16 repetições) quando comparado com a mãe (heterozigota para a repetição) e com os controles normais (Figura 13). No entanto, observou-se que a expressão do gene *EIF4A3* foi muito variável entre os indivíduos do grupo controle. Para verificar se esse resultado era indicativo de redução na expressão do *EIF4A3* foi calculado a média da razão obtida entre os controles, a qual foi comparada com os níveis de expressão da mãe e do afetado. Os dados obtidos foram apresentados na Tabela 20.

Figura 13 - Gráfico representativo da expressão do gene *EIF4A3* no indivíduo afetado, na mãe e em 5 controles normais.

Tabela 20 - Valores de expressão do gene *EIF4A3*.

Média controles	Mãe de indivíduo 11	Indivíduo 11
0,913913659	0,265362443	0,006087543

5.8 ESTUDO FUNCIONAL DO GENE *EIF4A3* EM MODELO ANIMAL (*ZEBRAFISH*)

A análise dos embriões com morfolino no estágio de 24 hpf com corante laranja de acridina mostrou apoptose acentuada, principalmente nos primórdios craniofaciais (Figura 14). Entretanto, a injeção de MO *eif4a3* não aumentou significativamente a expressão da proteína *p53* ou *p21*, excluindo um efeito off-target pela ativação da via apoptótica *p53* (Figura 15).

Figura 14 - A coloração com laranja de Acridina revelou um processo massivo de apoptose em morfantes *eif4a3* 24 hpf (**A.** vista lateral, anterior para a direita) em comparação ao grupo controle (**B.** vista lateral, anterior para a direita).

Figura 15 - Expressão de *p53* e *p21*.

Em larvas cinco dias pós-fertilização (dpf), os primórdios craniofaciais estavam gravemente afetados apresentando mandíbula reduzida e ausência de rosto. Embora a somitogênese parecessem estar normal, todos os morfantes apresentaram uma redução ântero-posterior do tamanho do eixo axial (Figura 16).

Figura 16 - Vista lateral do controle (A) e do morfante *eif4a3* (B) em 24 hpf. Regiões da retina e mesencéfalo-rombencéfalo mostraram uma pigmentação escura (linhas pontilhadas), sugerindo a presença de células em apoptose. Seta em B indica o subdesenvolvimento das proeminências frontais cranianas no morfante *eif4a3*.

A coloração de azul de Alcian revelou que a mandíbula inferior das larvas morfantes *eif4a3* (1° e 2° arcos faríngeos) estava atrofiada e com uma retração total quando comparada com o controle morfante mismatch. Os primeiro e segundo arcos faríngeos não estavam apenas subdesenvolvidos, mas apresentavam inversão e fenda, respectivamente. Outros arcos faríngeos (3° a 5°) estavam ausentes ou deformados e em total desarranjo. A placa etmoidal exibiu ausência de fusão e uma fenda na parte anterior nos morfantes *eif4a3*, caracterizando uma fenda palatina (Figura 17).

Figura 17 - A coloração de azul de Alcian (A e B, vista lateral, anterior para a direita; (C-F, vista ventral) revelou hipoplasia de numerosas cartilagens craniofaciais. Hipoplasia craniofacial é evidente nos elementos frontais, pré-maxilar e maxilar (asteriscos). A, C e E: controles. B, D e F: morfantes *eif4a3*.

Como o desenvolvimento da cartilagem é seguido pela formação de osso em peixes, foi estudada a ossificação de larvas 5dpf com a coloração de Calceína. Os morfantes *EIF4A3* tinham apenas os ossos do ouvido interno em processo típico de ossificação, enquanto os morfantes mismatch controle exibiram uma formação óssea típica de todas as estruturas craniofaciais dessa fase (Figura 18), isto é, em no mínimo 5dpf, os morfantes *EIF4A3* não desenvolveram os ossos palatinos (placa etmoidal) nem os ossos da mandíbula inferior (1º e 2º arcos faríngeos).

Figura 18 - Coloração de Calceína mostra esqueleto ósseo de larvas 5dpf (vista dorsal, anterior à direita). Exceto para os ossos do ouvido interno (seta em **B**), não há evidências de processo de ossificação normal em morfantes *EIF4A3*. **A**: controle. **B**: morfante *EIF4A3*.

Análise da expressão do gene *COL2A1* nos morfantes mismatch controle, mostrou que a sua expressão não estava presente nos morfantes *EIF4A3* em 4dpf. A expressão de *MyoD* foi usada como um controle de hibridização endógeno e a sua expressão estava normal em ambos morfantes *EIF4A3* e controle mismatch, confirmando somitogênese normal.

Para verificar se o *knockdown EIF4A3* estava interferindo na apoptose de células derivadas da crista neural foi quantificado a expressão de cinco marcadores de células da crista neural (*SOX9B*, *SOX10*, *TBX2*, *FOXD3* e *CNBP*) em embriões *knockdown EIF4A3* afetados. Exceto para *CNBP*, todos os outros genes analisados apresentaram significativa diminuição de expressão nos morfantes *EIF4A3*, quando comparados aos controles em 24hpf (Figura 19).

Figura 19 - Marcadores de crista neural. Expressão de marcadores da crista neural, *foxd3*, *sox10*, *sox9b* e *tbx2* estão significativamente reduzidos em morfantes *eif4a3* de *zebrafish* (MO) em comparação com o controle (*mismatch* morfante CTRL) ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A SRCP é um quadro genético raro, com alto índice de casamentos consanguíneos e com a maioria dos afetados concentrados em uma região restrita do Brasil, sugerindo herança autossômica recessiva sob influência de efeito do fundador (Richieri-Costa e Pereira 1992). Entretanto, até o início do presente estudo o gene causador permanecia desconhecido.

Tentativa prévia de identificação do gene responsável pela SRCP foi realizada por Lima et al (2003). Análise de ligação com microssatélites e sequenciamento de genes candidatos relacionados ao desenvolvimento craniofacial e de membros foram realizados, porém sem sucesso. Nesta última década, com o advento da tecnologia de *microarray*, tornou-se possível avaliar um grande número de marcadores moleculares em um número significativo de afetados, aumentando a probabilidade de sucesso no mapeamento do loco de determinada doença. A possibilidade de uso de tecnologias inovadoras, como *microarray* de SNP e exoma, associada ao conhecimento prévio da etiologia da síndrome SRCP e ao representativo número de famílias informativas com o quadro, deu subsídios para a realização do presente estudo, o qual tinha como objetivo identificar o gene causador dessa condição. Por meio do uso da tecnologia de *microarray* de SNP foi possível mapear com sucesso a região cromossômica para a banda 17q25.3. Análise de ligação por microssatélites e SNPs inseridos no intervalo dessa banda cromossômica restringiu a região candidata para 128,5 kb. Sequenciamento de três dos quatro genes contidos nessa região, em indivíduos afetados, permitiu identificar uma expansão atípica, em homozigose, na região 5' UTR do gene *EIF4A3*, caracterizando essa alteração como responsável pela SRCP.

De acordo com a sequência publicada nos bancos de dados UCSC e NCBI, a estrutura da região 5' UTR do gene *EIF4A3* é caracterizada pela sequência dos motivos CACA-20-nt (repetido 4 vezes), CA-18-nt (1 vez), CACA-20-nt (1 vez) e CA-18-nt (1 vez). Já, o sequenciamento dessa região no grupo controle, do presente trabalho, mostrou que a repetição do primeiro motivo (CACA-20-nt) é variável (2 a 9 vezes) e, ainda, a existência de um alelo raro cuja estrutura (Figura 12a) mostrou-se distinta do apresentado nos bancos de dados, indicando a existência de alelos polimórficos para o gene *EIF4A3*, variáveis tanto na estrutura quanto no número de repetições na região 5' UTR. Nos indivíduos afetados, da presente casuística, o sequenciamento da região 5' UTR mostrou estrutura distinta com variação no número de repetição do motivo CACA-20-nt (1 vez) e substituição do motivo

CA-18-nt pelo motivo CGCA-20-nt (Figura 12 d-e), o qual foi repetido de 12 a 13 vezes. Dessa forma, os achados mostraram a existência de dois alelos de risco: um com um total de 15 repetições e, outro com 16. Dentre os 26 indivíduos afetados da amostra, 23 apresentavam o alelo com 16 repetições em homozigose e, os outros três eram heterozigotos compostos para os alelos de 16 e de 15 repetições. A segregação desses alelos nas genealogias foi compatível com o modelo de herança autossômica recessiva, isto é, ambos os pais apresentavam o alelo de risco em heterozigose. O fato de ambos os genitores dos três indivíduos com alelo com 15 repetições apresentarem somente o alelo com 16 repetições aponta para a perda de material genético durante a segregação. Uma das possibilidades é que o alelo com 15 repetições tenha sido originado por *crossing over* desigual, tal como sugerido nas desordens com expansão de polialanina (Warren 1997). Dessa forma, os alelos com 16 e 15 repetições tem origem genética comum, reforçando a hipótese prévia de efeito do fundador sugerida para os indivíduos brasileiros com a RCPS (Richieri-Costa e Pereira 1992). Possivelmente, o alelo com 16 repetições, presente no ancestral comum, teria migrado da região do Vale do Ribeira para as regiões Sul e Sudeste do Brasil, com o fluxo de expedições exploratórias de portugueses e de espanhóis, de acordo com o sugerido por Favaro et al (2011).

O gene *EIF4A3* faz parte do complexo de Junção de Éxons (EJC), uma multiproteína que funciona como um importante locus de sinalização em uma grande rede de proteínas fundamental para o processamento de RNA, incluindo regulação da tradução, localização subcelular do RNA mensageiro e *nonsense mediated decay* (NMD). Acredita-se que o *EIF4A3* seja o componente do EJC que entra em contato com o RNA (Haremak et al 2010). Para o nosso conhecimento, não há, até o momento, relatos de alterações fenotípicas em humanos, decorrentes de alteração no gene *EIF4A3*. De acordo com dados do NCBI e UCSC, deleção ou duplicação da região cromossômica 17q23.5, a qual contém o gene *EIF4A3*, tem sido relacionada a fenótipos alterados que incluem micrognatia, anomalias cardíacas, deficiência intelectual, entre outras (Firth et al 2009 e Nguyen et al 2013). Haremak et al (2010) em estudo com modelo animal (*Xenopus*) demonstrou que a redução da proteína *eif4a3* resulta em alteração cardíaca, alteração de melanócitos e paralisia. A comparação da sequência de nucleotídeos da região 5' UTR do gene *EIF4A3* humano com o *Eif4a3* dos mamíferos ortólogos (UCSC) mostra que apenas os primatas antropóides, os quais apresentam fusão de mandíbula, partilham uma sequência repetitiva altamente semelhante ao motivo humano CA-18-nt. Portanto, é possível que a maioria dos alelos antigos em seres humanos tenha um ou poucos motivos CA-18-nt e que o motivo de 20 nt tenha surgido mais

recentemente, pela inserção de um CA ou, mais raramente, de um CG. Uma possibilidade a ser considerada é que aumento na instabilidade da região, conduzida pelo motivo CGCA-20-nt no alelo de risco para SRCP, tenha levado à expansão que resultou no fenótipo.

Um mecanismo potencial pelo qual a expansão de uma região de repetição não-codificante pode levar a doença é interferir na expressão normal da proteína codificada. Os resultados da análise quantitativa de *EIF4A3* em linfócitos, realizada no presente estudo, mostraram redução significativa da expressão do gene no indivíduo 10, homozigoto para o alelo com 16 repetições, quando comparado com grupo controle e com um indivíduo heterozigoto para o alelo de risco (mãe do indivíduo 10). Assim, é provável que a expansão leve a uma redução significativa dos níveis de transcrição de *EIF4A3* no estado homozigótico, sugerindo que a redução na expressão do gene *EIF4A3* poderia estar resultando no fenótipo da SRCP.

Estudo funcional em embriões de *zebrafish* mostrou comprometimento dos arcos faríngeos. Subdesenvolvimento da cartilagem craniofacial, alterações ósseas e fissuras da maxila inferior foram similares às alterações de primeiro e segundo arcos faríngeos, observadas na SRCP. Ausência de fusão mandibular evidenciada no *zebrafish*, *knockdown* para o *eif4a3*, é sinal patognomônico da SRCP. A ausência ou subdesenvolvimento dos terceiro, quarto e quinto arcos faríngeos, mostra a importância do gene *Eif4a3* para o desenvolvimento normal das estruturas derivadas desses arcos, podendo-se inferir que alterações de epiglote e laringe, presentes na SRCP, estejam relacionadas à deficiência do gene *EIF4A3*. Baixo nível de expressão em genes que se expressam nas células da crista neural, precursoras dos arcos faríngeos, sugerem que a disfunção de *eif4a3* durante a embriogênese do *zebrafish* pode desregular a transcrição desses genes e consequentemente interferirem diretamente na progressão do desenvolvimento da crista neural normal. É possível que a depleção de *eif4a3* resulte em incapacidade de se manter níveis adequados de componentes complexos específicos de junção de éxons, causando redução da expressão de genes da crista neural, promovendo, assim, a morte celular de células da crista neural, precursores dos arcos faríngeos, os quais estão comprometidos nos indivíduos com RCPS. Embora os dados obtidos no modelo animal *zebrafish* não permitam qualquer inferência em relação às anomalias de membros observadas na SRCP, é altamente sugestivo que essas sejam decorrentes da depleção do *EIF4A3*.

No seu conjunto, os resultados do presente trabalho sugerem que o fenótipo da SRCP é causado pela depleção de *EIF4A3*, quer como resultado dos baixos níveis de transcrição ou

devido à geração de uma proteína não funcional (mecanismo de perda de função), levando a um desenvolvimento deficiente da maioria dos arcos faríngeos e de membros. RCPS, portanto, pertence à lista crescente de síndromes com defeitos craniofaciais e/ou de membros causados por mutações em genes que codificam proteínas envolvidas no processamento de RNA, como *TCOF1* (síndrome de Treacher-Collins) (Dauwerse et al 2011), *SF3B4* (síndrome Nager) (Bernier et al 2012) e *EFTUD2* (Disostose mandibulofacial com microcefalia) (Lines et al 2012), e parece representar a primeira desordem craniofacial com expansão em uma região não-codificante. *EIF4A3*, embora previamente associado apenas com funções cardíacas e do sistema nervoso central (Haremake et al 2010 e Nguyen et al 2013), parece ser um gene com papel crítico na morfogênese da mandíbula, da sínfise mandibular e dos membros.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- O gene *EIF4A3*, localizado no cromossomo 17q25.3, na posição física 78109289 - 78120760 pb (GRCh/37hg19) é o gene causador da SRCP;
- A depleção de *EIF4A3* resulta no fenótipo da SRCP;
- O gene *EIF4A3* está envolvido no desenvolvimento dos arcos faríngeos;
- O comprometimento de membros nos indivíduos com SRCP sugere a importância do gene *EIF4A3* no desenvolvimento normal dos membros;
- O gene *EIF4A3* tem papel crítico na morfogênese da mandíbula e na fusão mandibular;
- Os resultados obtidos abrem perspectivas para a investigação da etiologia em síndromes com envolvimento da linha média mandibular e arcos faríngeos, associado ou não a anomalias de membros.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN. *Fgf8* is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development*. 2002; 129:4613-25.
- Alvizi L, Weiner A, Favaro FP, Zechi-Ceide RM, Richieri-Costa A, Guion-Almeida ML, et al. A Zebrafish model for Richieri-Costa-Pereira Syndrome: knockdown of *eif4a3* gene results in craniofacial development disorder [on line]. In: Annual Meeting American Society of Human Genetics; 2012 Nov6-10; San Francisco, United States of American. Maryland; 2012. [poster]. [Cited 2013 March 22]. Available from: <http://www.ashg.org/2012meeting/abstracts/fulltext/index.shtml>
- Ansart-Franquet H, Houfflin-Debarge V, Ghoumid J, Pasz N, Devisme L, Manouvrier-Hanu S, et al. Prenatal diagnosis of Nager syndrome in a monochorionic-diamniotic twin pregnancy. *Prenat Diagn*. 2009; 29:187-9.
- Arcos-Burgos M, Muenke M. Genetics of population isolates. *Clin Genet*. 2002; 61:233-47.
- Balic A, Adams D, Mina M. *Prx1* and *Prx2* cooperatively regulate the morphogenesis of the medial region of the mandibular process. *Dev Dyn*. 2009; 238(10):2599-613.
- Bernier FP, Caluseriu O, Ng S, Schwartzentruber J, Buckingham KJ, Innes AM, et al. Haploinsufficiency of *SF3B4*, a component of the Pre-mRNA spliceosomal complex, causes Nager syndrome. *Am J Hum Gen*. 2012; 90:925-33.
- Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Genetic Epidemiology 1: Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*. 2005; 366:941-51.
- Chai Y, Maxson RE. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*. 2006; 235(9):2353-75.
- Cobourne MT, Sharpe PT. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch of Oral Biol*. 2003; 48:1-14.
- Cobourne MT. Construction of the modern head: current concepts in craniofacial development. 2000; 27:307-14.
- Cohen MMJ. Embryonic, developmental, and postnatal perspectives. In: Cohen MMJ. *Perspectives on the face*. New York: Oxford University Press. 2006. p. 36-63.

Czeschik JC, Voigt C, Alanay Y, Albrecht B, Avci S, Fitzpatrick D, et al. Clinical and mutation data in 12 patients with the clinical diagnosis of Nager syndrome. *Hum Genet.* 2013; DOI 10.1007/s00439-013-1295-2

Dauwerse JG, Dixon J, Seland S, Ruivenkamp CA, van Haeringen A, Hoefsloot LH, et al. Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. *Nat Genet.* 2011; 43(1):20-2.

Dawson E. New collaborations make pharmacogenomics a SNP. *Mol Med Today.* 1999; 5(7):280.

Dimitrov B, Balikova I, Jekova N, Vakrilova L, Fryns J-P, Simeonov E. Acrofacial dysostosis type Rodríguez. *Am J Med Genet.* 2005; 135(1):81-5.

Dixon J, Dixon MJ. Genetic background has a major effect on the penetrance and severity of craniofacial defects in mice heterozygous for the gene encoding the nucleolar protein treacle. *Dev Dyn.* 2004; 229(4):907-14.

Dixon J, Trainor P, Dixon MJ. Treacher Collins syndrome. *Orthod Craniofacial Res.* 2007; 10(2):88-95.

Donnai D, Hughes HE, Winter RM. Postaxial acrofacial dysostosis (Miller) syndrome. *J Med Genet.* 1987; 24:422-5.

Favaro FP, Zechi-Ceide RM, Alvarez CW, Maximino LP, Antunes LFBB, Richieri-Costa A, et al. Richieri-Costa-Pereira syndrome: A unique acrofacial dysostosis type. An overview of the Brazilian cases. *Am J Med Genet.* 2011; 155(A):322-31.

Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009; 84(4):524-33.

Frank DU, Fotheringham LK, Brewer JA, Muglia LJ, Tristani-Firouzi M, Capecchi MR, et al. An *Fgf8* mouse mutant phenocopies human 22q11 deletion syndrome. *Development.* 2002; 129:4591-603.

Fukuhara S, Kurihara Y, Arima Y, Yamada N, Kurihara H. Temporal requirement of signaling cascade involving endothelin-1/endothelin receptor type A in branchial arch development. *Mech Dev.* 2004; 121:1223-33.

Galante-Severini JMB, Dalben GS, Richieri-Costa A, Ozawa TO. Dental anomalies in Richieri-Costa-Pereira syndrome. *Oral and Max Path.* 2012; 114:99-106.

Garcia SML, Fernández CG. Sistema articular e sistema esquelético. Garcia SML, Fernández CG. In: Embriologia. Porto Alegre: Artmed; 2001. p. 381-90.

Golbert MB, Dewes LO, Philipsen VR, Wachholz RS, Deutschendorf C, Leite JC. New clinical findings in the Richieri-Costa/Pereira type of acrofacial dysostosis. Clin Dysmorphol. 2007; 16(2):85-8.

Gorlin RJ, Cohen MMJ, Hennekan RCM. Branchial arch and oral-acral disorders. In: Gorlin RJ, Cohen MMJ, Hennekan RCM. Syndromes of the Head and Neck. New York: Oxford University Press; 2001. p. 790-849.

Graham A, Smith A. Patterning the pharyngeal arches. BioEssays. 2001; 23(1):54-61.

Graziadio C, Rosa RFM, Zen PRG, Flores JAM, Paskulin GA. Richieri-Costa and Pereira form of acrofacial dysostosis: First description of an adult with mesomelic shortness of the lower limbs. Am J Med Genet Part A. 2009; 149A:2886-8.

Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A. Brief clinical report: autosomal recessive short stature, Robin sequence, cleft mandible, pre/postaxial limb anomalies and clubfeet: report of a patient with polydactyly of the halluces. Braz J Dysmorphol Speech Hear Disord. 1998; 1:27-30.

Guion-Almeida ML, Vendramini-Pittoli S, Passos-Bueno MR, Zechi-Ceide RM. Mandibulofacial syndrome with growth and mental retardation, microcephaly, ear anomalies with skin tags, and cleft palate in a mother and her son: autosomal dominant or X-linked syndrome? Am J Med Genet A. 2009; 149A(12):2762-4.

Guion-Almeida ML, Zechi-Ceide RM, Vendramini S, Tabith Júnior A. A new syndrome with growth and mental retardation, mandibulofacial dysostosis, microcephaly, and cleft palate. Clin Dysmorphol. 2006; 15:171-4.

Gurrieri F, Kjaer KW, Sangiorgi E, Neri G. Limb Anomalies: Developmental and evolutionary aspects. Am J Med Genet. 2002; 115:231-44.

Harembaki T, Sridharan J, Dvora S, Weinstein DC. Regulation of vertebrate embryogenesis by the Exon Junction Complex core component *Eif4a3*. Dev Dyn. 2010; 239:1977-87.

Hoischen A, van Bon BW, Gilissen C, Arts P, van Lier B, Steehouwer M, et al. De novo mutations of *SETBP1* cause Schinzel-Giedion syndrome. Nat Genet. 2010; 42:483-5.

Jabs EW, Müller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, et al. A mutation in the homeodomain of the human *MSX2* gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell*. 1993; 75(3):443-50.

Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev*. 2004; 18:937-51.

Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2003; 40:399-407.

Jorde LB, Carey, JC, Bamshad, MJ, White, RL. Mapeamento gênico e clonagem. In: Jorde LB, Carey, JC, Bamshad, MJ, White, RL. *Genética Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda; 2004. p. 183-213.

Junqueira LCU, Zago D. Sistema alimentar e respiratório. In: Junqueira LCU, Zago D. *Genética médica e comparada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. p. 110-51.

Kennedy SJ, Teebi AS. Newly recognized autosomal recessive acrofacial dysostosis syndrome resembling Nager syndrome. *Am J Med Genet*. 2004; 129A(1):73-6.

Kjaer KW, Hansen L, Eiberg H, Utkus A, Skovgaard LT, Leicht P, et al. A 72-year-old Danish puzzle resolved--comparative analysis of phenotypes in families with different-sized *HOXD13* polyalanine expansions. *Am. J. Med. Genet*. 2005; 138A:328-39.

Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet*. 2011; 129:351-70.

Lima RLLF, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Murray JC. Identity by descent and candidate gene mapping of Richieri-Costa and Pereira syndrome. *Am J Med Genet*. 2003; 122A(1):56-8.

Lines MA, Huang L, Schwartzenruber J, Douglas SL, Lynch DC, Beaulieu C, et al. Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by *EFTUD2* causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am J Hum Genet*. 2012; 90:369-77.

Luquetti DV, Hing AV, Rieder MJ, Nickerson DA, Turner EH, Smith J, et al. Mandibulofacial dysostosis with microcephaly" caused by *EFTUD2* mutations: expanding the phenotype. *Am J Med Genet A*. 2013; 161A: 108-13.

- Macatee TL, Hammond BP, Arenkiel BR, Francis L, Frank DU, Moon AM. Ablation of specific expression domains reveals discrete functions of ectoderm- and endoderm-derived *FGF8* during cardiovascular and pharyngeal development. *Development*. 2003; 130:6361-74.
- Masotti C, Armelin-Correa LM, Splendore A, Lin CJ, Barbosa A, Sogayar MC, et al. A functional SNP in the promoter region of *TCOF1* is associated with reduced gene expression and YY1 DNA-protein interaction. *Gene*. 2005; 359:44-52.
- McGraw S, Saadi HAS, Robert C. Meeting the methodological challenges in the molecular mapping of the embryonic epigenome. *Molec Hum Reprod*. 2013; doi: 10.1093/molehr/gat046.
- McKeown SJ, Bronner-Fraser M. Saving face: rescuing a craniofacial birth defect. *Nat Med*. 2008; 14(2):115-6.
- Miguel HC, Carneiro CG, Tabith A, Zechi-Ceide RM, Genaro KF. Laryngeal malformation in Richieri-Costa Pereira syndrome: New findings. *Am J Med Genet Part A*. 2012; 158A:1967-70.
- Miller M, Fineman R, Smith DW. Postaxial acrofacial dysostosis syndrome. *J Pediat*. 1979; 95:970-5.
- Mina M. Morphogenesis of the medial region of the developing mandible is regulated by multiple signaling pathways. *Cells Tissues Organs*. 2001a; 169(3):295-301.
- Mina M. Regulation of mandibular growth and morphogenesis. *Rev Oral Biol Med Crit Rev Oral Biol Med*. 2001b; 12(4):276-300.
- Moore KL, Persaud TVN. Aparelho faríngeo (branquial). In: Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 207-46.
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, et al. Exome sequencing identifies *MLL2* mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*. 2010a; 42:790-3.
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat Genet*. 2010b; 42:30-5.
- Nguyen LS, Kim HG, Rosenfeld JA, Shen Y, Gusella JF, Lacassie Y, et al. Contribution of copy number variants involving nonsense-mediated mRNA decay pathway genes to neurodevelopmental disorders. *Hum Mol Gen*. 2013; 22(9):1816-25.

- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Mapeamento genético humano e identificação das doenças genéticas. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson: Genética médica. Baltimore: Saunders Elsevier; 2007. p. 215-41.
- Ozeki H, Kurihara Y, Tonami K, Watatani S, Kurihara H. Endothelin-1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mech Dev.* 2004; 121:387-95.
- Passos-Bueno MR, Ornelas CC, Fanganiello RD. Syndromes of the first and second pharyngeal arches: a review. *Am J Med Genet.* 2009; 149A:1853-9.
- Raskin S, Souza MB, Medeiros MC, Manfron M, Chong-Silva DC. Richieri-Costa and Pereira syndrome: case report of a severe phenotype. *Am J Med Genet A.* In press 2013.
- Richieri-Costa A, Brandão-Almeida IL. Short stature, Robin sequence, cleft mandible, pre/postaxial hand anomalies, and clubfoot: another affected Brazilian patient born to consanguineous parents. *Am J Med Genet.* 1997; 71(2):233-5.
- Richieri-Costa A, Pereira SCS. Autosomal recessive short stature, Robin sequence, cleft mandible, pre/postaxial hand anomalies, and clubfeet in male patients. *Am J Med Genet.* 1993; 47(5):707-9.
- Richieri-Costa A, Pereira SCS. Short stature, Robin sequence, cleft mandible, pre/postaxial hand anomalies, and clubfoot: a new autosomal recessive syndrome. *Am J Med Genet.* 1992; 42(5):681-7.
- Rieder MJ, Green GE, Park SS, Stamper BD, Gordon CT, Johnson JM, et al. A human homeotic transformation resulting from mutations in *PLCB4* and *GNAI3* causes auriculocondylar syndrome. *Am J Hum Gen.* 2012; 90:907-14.
- Sadler TW. Cabeça e pescoço. In: Sadler TW. Langman: Embriologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001a. p. 223-47.
- Sadler TW. Sistema esquelético. In: Sadler TW. Langman: Embriologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001b. p. 103-18.
- Sato T, Kawamura Y, Asai R, Amano T, Uchijima Y, Dettlaff-Swiercz DA, et al. Recombinase-mediated cassette exchange reveals the selective use of Gq/G11-dependent and -independent endothelin 1/endothelin type A receptor signaling in pharyngeal arch development. *Development.* 2008a; 135:755-65.
- Sato T, Kurihara Y, Asai R, Kawamura Y, Tonami K, Uchijima Y, et al. An endothelin-1 switch specifies maxillo- mandibular identity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008b; 105:18806-11.

- Satokata I, Maas R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994; 6:348-56.
- Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol.* 2000; 18(2):233-4.
- Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. Homozygosity Mapper – an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37:593-9.
- Sobotta J. Atlas de anatomia humana. 21a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- Souza J, dal Vesco K, Tonocchi R, Closs-Ono MC, Passos-Bueno, Silva-Freitas R. The Richieri-Costa and Pereira syndrome: report of two Brazilian siblings and review of literature. *Am J Med Genet.* 2011; 155A(5):1173-7.
- Splendore A, Silva EO, Alonso LG, Richieri-Costa A, Alonso N, Rosa A, et al. High mutation detection rate in *TCOF1* among Treacher Collins syndrome patients reveals clustering of mutations and 16 novel pathogenic changes. *Hum Mutat.* 2000; 16(4):315-22.
- Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science.* 1995; 270:1995-99.
- Strachan T, Read AP. Identificando genes de doenças humanas. In: Strachan T, Read AP. *genética molecular humana*. Porto Alegre: ArtMed; 2002. p. 351-75.
- Tabith A, Bento-Gonçalves CGA. Laryngeal malformation in the Richieri-Costa-Pereira acrofacial dysostosis: description of two new patients. *Am J Med Genet.* 2003; 122A(2):133-8.
- Tabith A, Bento-Gonçalves CGA. Laryngeal malformations in the Richieri-Costa and Pereira form of acrofacial dysostosis. *Am J Med Genet.* 1996; 66(4):399-402.
- Teare MD, Barrett JH. Genetic epidemiology 2: genetic linkage studies. *Lancet.* 2005; 366:1036-44.
- ten Berge D, Brouwer A, Korving J, Martin JF, Meijlink F. *Prx1* and *Prx2* in skeletogenesis: roles in the craniofacial region, inner ear and limbs. *Development.* 1998; 125:3831-42.
- ten Berge D, Brouwer A, Korving J, Reijnen MJ, van Raaij EJ, Verbeek F, et al. *Prx1* and *Prx2* are upstream regulators of sonic hedgehog and control cell proliferation during mandibular arch morphogenesis. *Development.* 2001; 128:2929-38.

Ten Cate AR, Nanci A. Embryology of the head, face, and oral cavity. In: AR, Nanci A. Oral histology developmental structure and function. Missouri: Mosby; 2003. p. 30-50.

Ten Cate AR. General Embryology. In: AR, Nanci A. Oral histology developmental structure and function. Missouri: Mosby; 2003. p. 17-29.

Thomas T, Kurihara H, Yamagishi H, Kurihara Y, Yazaki Y, Olson EN, et al. A signaling cascade involving endothelin-1, *dHAND* and *msx1* regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme. *Development*. 1998; 125:3005-14.

Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JL, Bishop JM, Martin GR. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that *FGF8* is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev*. 1999; 13:3136-48.

Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of *BMP* signaling. *Science*. 1998; 282:1136-8.

Tucker AS, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*. 2004; 5:499-508.

van der Hoeven F, Zákány J, Duboule D. Gene transpositions in the *HoxD* complex reveal a hierarchy of regulatory controls. *Cell*. 1996; 85:1025-35.

Walter-Nicolet E, Coëslie A, Loriot S, Kacet N, Moerman A, Manouvriei-Hanum S. The Richieri-Costa and Pereira Form of Acrofacial Dysostosis: First Case in a Non-Brazilian Infant. *Am J Med Genet*. 1999; 87(5):430-3.

Warren ST. Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of *HOXD13*. *Science*. 1997; 275:408-9.

Whiting J. Craniofacial abnormalities induced by the ectopic expression of homeobox genes. *Mut Res*. 1997; 396:97-112.

Wieczorek D, Gener B, González MJ, Seland S, Fischer S, Hehr U, et al. Microcephaly, microtia, preauricular tags, choanal atresia and developmental delay in three unrelated patients: a mandibulofacial dysostosis distinct from Treacher Collins syndrome. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A: 837-43.

Wieczorek D. Human facial dysostosis. *Clin Genet*. 2013; 83:499-510.

Xiao Y, Segal MR, Yang YH, Yeh R-F. A multi-array multi-SNP genotyping algorithm for Affymetrix SNP microarrays. *Genome Anal.* 2007; 23(12):1459-67.

Zákány J, Duboule D. *Hox* genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res.* 1999; 296:19-25.

Zhao X, Sun M, Zhao J, Leyva JA, Zhu H, Yang W, et al. Mutations in *HOXD13* underlie syndactyly type V and a novel brachydactyly-syndactyly syndrome. *Am J Hum Genet.* 2007; 80:361-71.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Heredogramas

Indivíduo 11

Indivíduo 13

Indivíduo 14

Indivíduo 15

Indivíduo 16

Indivíduo 17

Indivíduo 18

Indivíduo 20

Indivíduos 21 e 22

- Fissura de lábio e palato
- Fissura de lábio
- Fissura de palato
- Pé torto
- Pé anormal

- Anomalia de membro
- Ataxia de marcha
- Múltiplas anomalias congênicas
- Malformação inespecífica
- Polidactilia pós axial
- Síndrome de Down

- Assimetria de face
- Perda auditiva
- Onfalocele
- Defeito de tubo neural
- Anomalia intestinal
- Dificuldade respiratória

APÊNDICE 2 - Achados clínicos, radiológicos e de linguagem dos pacientes com síndrome Richieri-Costa-Pereira

Achados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Idade na última avaliação	27a	26a	29a	22a6m	19a	19a	19a	17a	17a5m	16a	16a8m	9a9m	5a11m	4a3m	3a11m	2a9m	1a6m	9m	48a	14d	10a	7a11m	5a	5m	NI	4m	
Sexo	F	F	M	F	F	F	F	F	F	M	M	F	M	M	F	F	M	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
Mora no Vale do Ribeira	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
Recorrência	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	
Consanguinidade	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	NI	+	
Atraso no desenvolvimento	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	NA	-	NA	-	NA	NA	-	
Dificuldade de aprendizagem	+	+	+	+	+	-	+	+	NA	+	-	+	NA	+	-	+	+	-	NA	NA	-	NA	-	NA	NA	NA	
Atraso/desordem de linguagem	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	NA	+/-	-	+/-	+/+	+/+	-	+/-	+/-	-	NA	NA	-	NA	-	NA	NA	NA	
Obstrução das vias aéreas	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	+	+	+	-	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	
Dificuldades de alimentação	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	
Craniofacial																											
Microstomia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Micrognatia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fissura de palato/ Sequência de Robin	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	+	
Fissura de mandíbula	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ausência de incisivos centrais inferiores	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	NA	+	NA	+	+	+	NA	
Anomalias pequenas das orelhas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	+	NI	+	
Membros																											
Hipoplasia de polegar	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hipoplasia tenar /hipotenar	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	+	+	NA	+	+	+	+	-	+	-	NA	NA	+	+	NA	NA	
Implantação proximal do polegar	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	NA	NA	+	+	NA	NA	
Hipoplasia de 5º dígito	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	NA	+	+	
Clinodactilia de 5º dígito	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	NA	+	+	+	+	
Pés tortos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hipoplasia do hálux	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	NA	+	+	+	+	+	
Desvio tibial dos artelhos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	NA	NA	NA	+	+	NA	+	
Mesomelia de membros superiores	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mesomelia de membros inferiores	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
Achados Radiológicos																											
Fusão anormal/fissura de mandíbula	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	+	+	NA	NA	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+	
Hipoplasia de rádio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	NA	+	+	+	+	
Hipoplasia e/ou displasia de ulna	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	NA	NA	NA	NA	+	+	
Hipoplasia de 5º raio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	NA	NA	+	
Sinostose de 4º e 5º metacarpos	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	NA	NA	-	-	NA	-	
Encurtamento/anomalia de tibia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Encurtamento/anomalia de fíbula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hipoplasia e/ou displasia de calcâneo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA	

+: presença; -: ausência; NA: não avaliado; NI: não informado

APÊNDICE 3 - Haplótipos

		Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5	
68465456-68465676	D17S949	219	215	219	225	229	231	221	229	225	229
74431373-74431569	D17S785	177	183	175	175	171	183	175	175	183	177
75347271-75347415	D17S937	158	158	158	158	156	158	160	160	158	160
76234610 - 76234787	D17S802	186	190	192	192	190	196	196	196	186	186
77024861-77025022	D17S1847	178	180	180	180	178	180	180	180	180	180
77445675-77445787	D17S1806	145	156	143	143	143	137	143	143	143	143
77802191-77802424	D17S784	237	237	241	241	241	241	241	241	241	241
77925092	rs11150824	T	T	A	A	A	A	A	A	T	A
78032915	rs2289534	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78161402	rs3829612	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78305871	rs10782008	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G
78440633	rs12943620	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
78568447	rs4889865	T	T	T	T	T	T	T	A	T	T
78806313	rs2672871	G	G	G	G	G	G	G	C	G	G
79165171	rs869370	T	T	T	T	C	C	T	T	T	C
79417400	rs899286	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
79617489	rs8477	A	A	A	A	G	G	A	G	G	A
80028021-80028175	D17S668	162	162	162	162	170	170	162	166	162	182
80252880-80253028	D17S928	94	94	94	94	86	86	94	84	86	94

		Indivíduo 6		Indivíduo 7		Indivíduo 8		Indivíduo 9		Indivíduo 10	
68465456-68465676	D17S949	225	225	219	227	229	219	223	225	229	219
74431373-74431569	D17S785	175	179	187	191	177	175	175	177	175	177
75347271-75347415	D17S937	158	158	158	154	160	158	164	158	158	154
76234610 - 76234787	D17S802	192	198	182	196	186	182	198	192	182	186
77024861-77025022	D17S1847	180	176	180	180	180	180	178	178	180	178
77445675-77445787	D17S1806	143	143	141	143	143	143	141	143	143	143
77802191-77802424	D17S784	241	235	241	241	241	241	241	241	241	241
77925092	rs11150824	A	T	A	A	A	A	T	T	A	A
78032915	rs2289534	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78161402	rs3829612	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T
78305871	rs10782008	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
78440633	rs12943620	C	C	C	C	C	C	A	C	C	C
78568447	rs4889865	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78806313	rs2672871	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
79165171	rs869370	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
79417400	rs899286	G	G	G	A	G	A	G	G	G	G
79617489	rs8477	A	A	A	A	A	G	A	A	G	A
80028021-80028175	D17S668	178	170	162	170	162	174	162	162	170	162
80252880-80253028	D17S928	82	86	94	86	94	88	88	94	82	94

		Indivíduo 11		Indivíduo 12		Indivíduo 13		Indivíduo 14		Indivíduo 15	
68465456-68465676	D17S949	229	227	219	229	227	227	223	225	227	227
74431373-74431569	D17S785	177	177	177	177	177	175	185	189	177	183
75347271-75347415	D17S937	160	162	160	160	150	158	158	158	154	158
76234610 - 76234787	D17S802	196	192	186	186	192	182	182	192	196	182
77024861-77025022	D17S1847	176	178	180	180	180	180	176	180	180	180
77445675-77445787	D17S1806	135	143	143	143	141	143	143	145	147	143
77802191-77802424	D17S784	241	247	241	241	241	241	241	241	241	241
77925092	rs11150824	A	T	A	A	A	A	A	A	A	T
78032915	rs2289534	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78161402	rs3829612	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78305871	rs10782008	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
78440633	rs12943620	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
78568447	rs4889865	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78806313	rs2672871	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G
79165171	rs869370	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T
79417400	rs899286	G	G	G	G	G	A	G	A	G	G
79617489	rs8477	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A
80028021-80028175	D17S668	162	170	162	162	162	162	162	166	162	178
80252880-80253028	D17S928	94	90	90	94	94	94	94	90	96	88

		Indivíduo 16		Indivíduo 17		Indivíduo 18		Indivíduo 19		Indivíduo 20	
68465456-68465676	D17S949	?	?	223	219	229	231	229	229	227	219
74431373-74431569	D17S785	?	?	183	177	177	179	175	175	175	183
75347271-75347415	D17S937	158	158	154	158	152	158	158	158	158	158
76234610 - 76234787	D17S802	192	192	192	198	186	192	192	192	186	182
77024861-77025022	D17S1847	180	180	180	174	176	180	180	180	180	180
77445675-77445787	D17S1806	143	143	143	131	143	143	143	143	137	143
77802191-77802424	D17S784	241	241	241	245	241	241	241	241	241	241
77925092	rs11150824	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
78032915	rs2289534	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T
78161402	rs3829612	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78305871	rs10782008	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
78440633	rs12943620	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
78568447	rs4889865	T	T	T	T	T	T	A	T	T	T
78806313	rs2672871	G	G	G	G	G	G	G	C	G	G
79165171	rs869370	T	C	T	C	T	T	T	T	T	T
79417400	rs899286	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
79617489	rs8477	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
80028021-80028175	D17S668	162	178	162	170	162	162	162	166	162	162
80252880-80253028	D17S928	94	84	94	90	94	94	86	92	94	94

		Indivíduo 21		Indivíduo 22		Indivíduo 23	
77925092	rs11150824	A	A	A	A	A	A
78032915	rs2289534	T	T	T	T	T	C
78161402	rs3829612	T	T	T	T	T	C
78305871	rs10782008	G	G	G	G	G	G
78440633	rs12943620						
78568447	rs4889865	T	T	T	T	T	A

ANEXOS

ANEXO 1 - Ofício de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício nº 372/2008-SVAPEPE-CEP

Bauru, 04 de dezembro de 2008.

Prezada Senhora

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado “**Investigação de loco gênico em famílias com síndrome Richieri-Costa-Pereira**”, de autoria de **Francine Pinheiro Favaro** desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de **26 de novembro de 2008**, o parecer do relator **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes para o início da pesquisa. Solicitamos a V. Sa. a gentileza de comunicar o parecer ao pesquisador e anexar o presente ofício ao projeto pois o mesmo será necessário para futura publicação do trabalho.

A pesquisadora fica responsável pela entrega na SVAPEPE – Apoio ao Projeto de Pesquisa dos relatórios semestrais, bem como, comunicar ao CEP todas as alterações que possam ocorrer no projeto.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final para publicação.

Atenciosamente

PROFª DRª IZABEL MARIA MARCHI DE CARVALHO

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

Ilmo(a) Sr(a)

Dra. Maria Leine Guion-Almeida

Genética – HRAC/USP

ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

portador da cédula de identidade _____, responsável pelo paciente
* _____, após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa: **“Investigação de loco gênico em famílias com síndrome Richieri-Costa-Pereira”** realizada pela aluna Francine Pinheiro Favaro (CRBM 14050) sob orientação da Profa. Dra. Maria Leine Guion de Almeida (CRM 30253).

Esse estudo tem como objetivo principal identificar o gene causador da síndrome Richieri-Costa-Pereira. O procedimento inclui coleta de sangue (5ml) do paciente e de seus familiares. A coleta de sangue pode causar desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta. Cada indivíduo participante desse estudo (ou seus responsáveis) será incluído somente com sua permissão e após serem informados dos objetivos (acima citados).

Informamos que, de modo geral, não existe nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo e é pouco provável que o tratamento seja modificado. Porém, essa investigação, poderá contribuir, no futuro, para uma melhor orientação genética às famílias com essa síndrome. Os resultados dos exames estarão disponíveis no prontuário do indivíduo participante e serão fornecidos ao paciente ou seu(s) responsável(is), em consulta previamente agendada no Ambulatório de Genética Clínica do HRAC-USP, Bauru, durante as vindas de rotina ao Hospital. Os resultados dessa pesquisa poderão ser divulgados, para fins científicos, em revistas e em eventos especializados na área, incluindo o uso de imagens, desde que a identidade do indivíduo seja preservada.

"Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8421".

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar dessa pesquisa ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 3º do Código de Ética do Biomédico).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa
ou responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

* A SER PREENCHIDO, SE O SUJEITO DA PESQUISA NÃO FOR O PACIENTE.

Nome do Pesquisador Responsável: Francine Pinheiro Favaro, Dra. Maria Leine Guion de Almeida

Endereço Institucional: Rua Silvio Marchione, 3-10

Cidade: Bauru - **Estado:** SP - **CEP:** 17012-900

Telefone: (14) 3235 8022

E-mail: franfavaro@yahoo.com.br