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

VIVIAN TRAGANTE DO Ó

**Análise por MLPA das regiões subteloméricas de pacientes com
Holoprosencefalia**

**BAURU
2014**

VIVIAN TRAGANTE DO Ó

**Análise por MLPA das regiões subteloméricas de pacientes com
Holoprosencefalia**

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de MESTRE em Ciências da Reabilitação.

Área de concentração: Prevenção e Genética.

Orientadora: Profª Drª Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

**BAURU
2014**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

Rua Silvio Marchione, 3-20

Caixa Postal: 1501

CEP 17012-900 – Bauru/SP – Brasil

Telefone: (14)3235-8000

Prof. Dr. Marco Antônio Zago - Reitor da USP

Prof. Dra. Regina Célia Bortoleto Amantini – Superintendente do HRAC-USP

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

Vivian Tragante do Ó

Bauru, ____ de _____ de _____.

T765a

Tragante, Vivian

Análise por MLPA das regiões subteloméricas de
pacientes com Holoprosencefalia / Vivian Tragante do Ó
– Bauru, 2014.

85 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado – Área de concentração:
prevenção e genética) – Hospital de Reabilitação de
Anomalias Craniofaciais, Bauru-SP. Universidade de São
Paulo.

Orientador: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro
Bicudo

1. Holoprosencefalia. 2.DNA. 3.Região
subtelomérica. 4.MLPA. 5.Deleção.
6.Duplicação

CDD 614.42

Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP
Protocolo nº: **375.234**
Data: **27/08/2013**

FOLHA DE APROVAÇÃO

VIVIAN TRAGANTE DO Ó

Análise por MLPA das regiões subteloméricas de pacientes com
Holoprosencefalia

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de
Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de MESTRE em Ciências da
Reabilitação.

Área de concentração: Prevenção e Genética.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof.(a) Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof.(a) Dr(a). _____

Instituição: _____

Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo – Orientadora

Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP

Prof. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC/USP

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

Vivian Tragante do Ó

Nascimento 08 de Agosto de 1988 – Bauru/SP

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2007-2011 Graduação em Nutrição e Metabolismo pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP, Ribeirão Preto – SP.

2012-2014 Curso de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação, nível Mestrado Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Área de concentração: Prevenção e genética.

ATIVIDADES PROFISSIONAIS

2012 Nutricionista de produção na Prefeitura Municipal de Birigui.

2013 - atual Nutricionista do Programa de Saúde da Família no Município de Bauru, SP. Sorri-Bauru.

“Ganhamos força, coragem e confiança a cada experiência na qual verdadeiramente paramos para enfrentar o medo.”

(Eleanor Roosevelt, You Learn by Living, 1960, p 29)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, sem o qual simplesmente nada seria possível. Por iluminar meus caminhos e minhas escolhas.

À minha orientadora, **Prof. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo**, por me aceitar como aluna, por trazer tranquilidade e serenidade nos momentos em que eu já não imaginava haver uma saída. Pelas conversas e a motivação pela busca de novas aventuras e novos horizontes. Agradeço a orientação deste trabalho.

Aos **Pacientes** e suas famílias, que ao longo da vida, encaram a luta diária pelo seu bem estar, e sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Ao **HRAC**, que cuida, apoia, reabilita e proporciona melhores oportunidades para seus pacientes, incentivando a pesquisa e a descoberta de novas estratégias para a garantia de uma vida saudável.

As Professoras Doutoras **Edi Lúcia Sartorato** e **Nancy Mizue Kokitsu Nakata**, pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Aos meus pais, **Silvia** e **Edson**, que sempre me ensinaram a importância da retidão, dos estudos, de buscar sempre o melhor, com honestidade e lealdade e, que neste momento, devem estar orgulhosos de mim (rs).

Ao meu futuro marido, **Wilian Silveirinha**, pelos cinco minutos de desabafo todos os dias ao telefone, pelas palavras de conforto, pelas broncas mais educadas e serenas que eu já vivenciei, pelo carinho e muito amor, além de todos os sonhos, sonhados juntos, na espera pela realização. Amo você, muito!

Ao co-orientador **Bruno Gamba**, pela importantíssima colaboração para que este trabalho fosse finalizado, pela paciência, disponibilidade, responsabilidade e amizade.

Ao co-co-orientador(não oficial), meu irmão **Vinicius Tragante do Ó**, que me passa uma enorme segurança quando sugere cada passo que eu devo dar. Agradeço cada sugestão, cada crítica, cada bronca e cada “Ô Fera.....”.

À minha irmã, **Vanessa Tragante do Ó**, pelo carinho, apoio, momentos de descontração... Pela companhia de sempre, pela correção às 23h, pela força e pelas broncas também, porque não?

Às amigas **Ana Laís Bignotto, Ana Luísa Gaspar, Juliana Mercado e Priscila Padilha Moura**, pelas boas risadas, pelo apoio, pelas idas ao fumódromo, pelas tapiocas horrorosas... Pela grande torcida!!! “Binaaaaaaaa, chame ela!!! Quero falar com BINA!!!!!!!!!!!!” Ou até mesmo “Vivian, calma.... Vai dar tudo certo.... VAI FICAR LINDO!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!”... senão, “ALGO BOM VAI ACONTECER, ALGO BOM DEUS TEM PARA NÓS!!!!”

Aos amigos da Citogenética, **Rubão, Rô, Tânia, Cris e Cibele**, pelos conselhos e sorrisos carinhosos.

Aos funcionários da SPG, **Andreia, Rogério, Zezé e Tatiana**, pelos vários capítulos de uma eterna novela mexicana... E ao Rafael, da UEP, que sempre me ajudou nos eternos envios de arquivos à Plataforma Brasil.

Aos meus amigos e amigas que sempre me acompanharam: **Silvia, Nicole, Juliane, Ana Paula, Ana Caroline**. Especialmente a **Lidiane**, que me alertou quanto a esta oportunidade junto ao HRAC/USP; e ao **G8**, do qual eu sinto uma saudade imbecensa, obrigada pela paciência e por entenderem a minha falta de tempo, muitas vezes. **Rick**, você, em especial, é um gênio!!!!

Aos amigos e colegas de trabalho do PSF, que também participaram de uma parte desta etapa, meu muito obrigado!

RESUMO

TRAGANTE, V. Análise por MLPA das regiões subteloméricas de pacientes com Holoprosencefalia [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A Holoprosencefalia (HPE) é uma malformação craniofacial decorrente de falhas no processo de formação do sistema nervoso durante o desenvolvimento embrionário. Sua etiologia é heterogênea e complexa, envolvendo fatores ambientais e genéticos. Estudos recentes sugerem que alterações subteloméricas possam ser um dos fatores etiológicos para o aparecimento da HPE. **Objetivos:** Investigar possíveis alterações (microdeleções/duplicações) nas regiões subteloméricas em indivíduos com diagnóstico de HPE. **Metodologia:** Avaliação genética de 25 amostras de DNA de indivíduos matriculados no HRAC-USP, com diagnóstico de HPE através da técnica de MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), segundo protocolo proposto por Schouten et al. (2002). Estes indivíduos já foram previamente triados para mutações/deleções nos genes candidatos à HPE (*SHH*, *ZIC2*, *TGIF*, *GLI2* e *PTCH1*) através do sequenciamento direto de Sanger e da técnica de MLPA, sem resultado positivo para qualquer alteração. **Resultados:** Dentre os 25 indivíduos analisados, o fenótipo predominante foi a microforma da doença. Os principais achados clínicos da amostra estudada foram: hipotelorismo, microcefalia e fissura de lábio e palato (100%), nariz achatado (84%), presença de um incisivo central único (24%) e ponte nasal baixa (64%). Quatro pacientes apresentaram comprometimento no SNC (16%). Nenhum indivíduo apresentou quaisquer alterações, como microdeleções e/ou duplicações nos genes contidos nas regiões subteloméricas, através da análise pela técnica de MLPA. Dessa forma, estes permanecem sem diagnóstico genético definido. **Discussão:** A não detecção de alterações subteloméricas sugere que o fenótipo predominante na amostra, microforma, possa não apresentar alterações subteloméricas relacionadas ao aparecimento da doença. Entretanto, deve-se salientar que o universo amostral é relativamente pequeno, de forma que este possa não ser um exemplo fiel dos casos de microforma da HPE. Reforça-se, ainda, a grande variedade de fatores envolvidos no surgimento desta patologia, bem como o envolvimento de outros genes ainda não estabelecidos, além das causas ambientais, ainda não completamente elucidadas. **Conclusões:** Não foram encontradas alterações subteloméricas nos pacientes com diagnóstico de HPE estudados. A técnica de MLPA consiste em uma metodologia rápida, sensível, eficaz e de baixo custo, quando comparada a outras técnicas, sendo indicada para o uso em laboratórios de diagnóstico genético, uma vez que diversos estudos já mostraram que consiste em um método confiável de diagnóstico. Devido ao tamanho relativamente pequeno da amostra utilizada neste estudo, e os dados ainda inconsistentes da literatura atual, estudos adicionais são necessários para que seja possível a realização de um diagnóstico diferencial, explicando o amplo espectro fenotípico observado nesta doença, conforme sugerido pela hipótese dos múltiplos fatores.

Descritores: Holoprosencefalia. DNA. Região subtelomérica. MLPA. Deleção. Duplicação.

ABSTRACT

TRAGANTE, V. MLPA analysis of subtelomeric regions of patients with holoprosencephaly [dissertation]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: Holoprosencephaly (HPE), a craniofacial malformation, results from flaws in formation process of the nervous system during embryonic development. The etiology is heterogeneous and complex, involving environmental and genetic factors. Recent studies suggest that subtelomeric aberrations could be an etiological factor to the onset of HPE. **Objectives:** Investigate possible changes (microdeletions/duplications) in subtelomeric regions in individuals diagnosed with HPE. **Methodology:** Genetic evaluation of 25 DNA samples from individuals enrolled at HRAC-USP, diagnosed with HPE (performed by Syndromology Division – HRAC/USP) by MLPA technique, as proposed by Schouten et al (2002). Patients were previously screened for mutations/deletions in HPE candidate genes (*SHH*, *ZIC2*, *TGIF*, *GLI2* and *PTCH1*) by direct Sanger sequencing and MLPA technique, without any match. Analyses were performed at the Laboratory of Molecular Genetics, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, HRAC-USP. **Results:** Among the 25 individuals analyzed, the predominant phenotype was HPE microform. The main clinical findings of the study sample were: hypotelorism, microcephaly, and cleft lip/palate (100%); flat nose (84%); presence of a single central incisor (24%) and low nasal bridge (64%). Four patients had CNS commitment (16%). No subtelomeric mutations were found in our sample, such as microdeletions/duplications of genes analyzed by MLPA technique. Thus, they remain without defined genetic diagnosis. **Discussion:** Subtelomeric changes were not found, suggesting that the predominant sample phenotype, microform HPE, could not be related with subtelomeric changes associated to the disease outbreak. However, it should be noted that the sample universe is relatively small, so this may not be a true example of HPE microform cases. It should also be reinforced the wide variety of factors involved in the onset of this pathology, as well as the involvement of other genes not yet established and environmental causes, not completely understood. **Conclusions:** No subtelomeric mutations were found in the HPE individuals studied. MLPA technique consists in a rapid, sensitive and cost effective methodology, when compared to other techniques being suitable for use in genetic diagnostic laboratories, since several studies have shown that consists of a reliable method of diagnosis. Due to the relatively small sample size used in this study, and even inconsistent data in literature, further studies are needed to make it possible to perform a differential diagnosis, explaining the wide phenotypic spectrum observed in this disease, as suggested by the multiple hit hypothesis.

Descriptors: Holoprosencephaly. DNA. Subtelomeric region. MLPA. Deletion. Duplication.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1</i>	Algumas características fenotípicas em HPE	24
<i>Figura 2</i>	A via de sinalização de Hedgehog	29
<i>Figura 3</i>	Via de sinalização de Hh delineada no site <i>geneMania.org</i>	31
<i>Figura 4</i>	Organização dos telômeros	32
<i>Figura 5</i>	Representação esquemática da localização das deleções de genes da HPE e candidatos de HPE em bandeamento G	36
<i>Figura 6</i>	Etapas da reação de MLPA	39
<i>Figura 7</i>	Perfil normal de análise das sondas em quatro pacientes no <i>software</i> GeneMarker	57

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i>	Classificação da gravidade e características anatômicas nos diferentes tipos de HPE	22
<i>Tabela 2</i>	Sondas do Kit <i>SALSA MLPA</i> P036-E1 Human-telomere-3	50
<i>Tabela 3</i>	Caracterização da casuística estudada	53

LISTA DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1</i>	Grupo amostral e suas formas clínicas de HPE	50
<i>Gráfico 2</i>	Características fenotípicas da amostra estudada	55

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADNPM	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor
arrayCGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
DHCRT	<i>Hypocretin (oregin) neuropeptide precursor</i>
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FAST1	<i>Forkhead Activin Signal Transducer-1</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência)
GAS1	<i>Growth Arrest-Specific 1</i>
GLI2	<i>GLI family zinc finger 2</i>
Hh	Via de sinalização Hedgehog
HPE	Holoprosencefalia
HPE-like	<i>Holoprosencefalia-like</i>
HRAC-USP	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação)
NODAL	<i>Nodal growth differentiation factor</i>
PATCH1/PTCH1	<i>Patched 1</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	<i>Patched gene</i>
RDNPM	<i>Retardo do Desenvolvimento Neuropsicomotor</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SIX3	<i>SIX homeobox 3</i>
SMO	<i>Smoothed</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SUFU	<i>Supressor of Fused Homolog</i>

<i>TDGIF</i>	<i>Putative adenylate cyclase</i>
<i>TGIF</i>	<i>TGFB-induced factor homeobox 1</i>
<i>ZIC2</i>	<i>Zic family member 2</i>
<i>WNT</i>	<i>Wingless type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 EMBRIOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	19
2.2 HOLOPROSENCEFALIA	21
2.3 IMPORTÂNCIA DA VIA DE SINALIZAÇÃO SONIC HEDGEHOG NO DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL E HOLOPROSENCEFALIA	27
2.4 REGIÃO SUBTELOMÉRICA E SUA IMPLICAÇÃO CLÍNICA	31
2.5 TÉCNICA DE MLPA – MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION	37
3. OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 GRUPO AMOSTRAL	43
4.2 ANÁLISE MOLECULAR	44
4.3 MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA ESTUDADA	50
5.2 ANÁLISE DAS REGIÕES SUBTELOMÉRICAS PELA TÉCNICA DE MLPA	57
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	
ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do CEP- HRAC-USP	77
ANEXO 2 - Ofício 289/2006	82
ANEXO 3 – Ofício 111/2011	83
ANEXO 4 – TCLE elaborado para a pesquisa atual	84

1. INTRODUÇÃO

As anomalias craniofaciais resultam de alterações durante o processo de formação do crânio e da face ao longo do desenvolvimento intra-uterino, podendo ou não estar associadas a malformações estruturais e/ou funcionais do SNC. Estas constituem a quarta causa mais frequente dentre as anomalias congênitas em recém-nascidos.

Assim como outros tipos de malformações congênitas, as anomalias craniofaciais apresentam etiologia multifatorial, envolvendo fatores ambientais e genéticos, o que determina uma grande variedade de formas, abrangendo desde quadros de fissura isolada de lábio, com grau mínimo de comprometimento, até quadros sindrômicos altamente complexos com comprometimento cognitivo, anatômico e estético.

Dentre as anomalias craniofaciais, encontra-se a Holoprosencefalia (HPE), caracterizada por uma malformação craniofacial decorrente de problemas no processo de formação do sistema nervoso, durante o desenvolvimento embrionário. Abrange diferentes graus de acometimento, apresentando um espectro fenotípico que varia desde indivíduos aparentemente normais até casos extremamente graves. Sua etiologia também está relacionada a fatores ambientais e genéticos, e a interação entre estes provavelmente seja a causa do amplo e contínuo espectro fenotípico descrito para esta anomalia. Embora sua etiologia permaneça ainda indefinida, avanços nas áreas de neuroimagem, genética e embriologia experimental trouxeram contribuições importantes no entendimento da etiologia desta malformação do cérebro.

Com o avanço das técnicas de citogenética e biologia molecular ao longo das últimas décadas, houve uma melhora importante no entendimento não só da estrutura e função do DNA, como também maiores possibilidades de investigação, detecção e compreensão de diversas doenças e síndromes genéticas. Considerando a questão da hereditariedade envolvida nestas malformações, é de suma importância a investigação das possíveis causas genéticas relacionadas, principalmente para o aconselhamento genético.

A Divisão de Sindromologia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP/Bauru) atende um grande número de pacientes com hipótese diagnóstica de HPE, dos quais grande parte permanece ainda sem diagnóstico genético definido, ou seja: exames de cariótipo de rotina e análises de mutação para os genes candidatos não foram suficientes para se definir a causa genética envolvida.

Atualmente, evidências citogenéticas microscópicas vêm sendo relacionadas como fatores etiológicos para HPE. No intuito de se investigar tais alterações, projetos em execução no HRAC, e em colaboração com o Instituto de Biociências da USP-São Paulo, (Ofício n. 111/2011-SVAPEPE-CEP), possibilitaram a realização de análises genéticas nos principais genes envolvidos na HPE (*TGIF*, *SIX3*, *SHH*, *ZIC2*, *GLI2*, *PTCH* e *GAS1*), e em outras regiões do genoma, na busca por deleções de ponto e/ou microdeleções/duplicações (Processos Fapesp N°06/60973-9 e N° 2011/07012-9). Esses estudos têm contribuído para uma descrição clínica e molecular mais compreensiva da HPE. Entretanto, apesar destes avanços, a etiologia, a patogenia e qualquer explicação para as causas genéticas e ambientais permanecem incompletas. Salienta-se que o Laboratório de Genética Molecular do HRAC/USP possui uma coleção de mais de 150 amostras de DNA de pacientes com diagnóstico clínico da HPE, das quais 33% apresentaram variação no genoma. Portanto, a maior parte permanece sem uma causa genética determinada.

Pesquisas recentes têm associado alterações subteloméricas a casos de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), deficiência intelectual e, mais recentemente, HPE. Sendo assim, a investigação de alterações nestas regiões é importante, pois propõe ampliar o conhecimento do genoma de indivíduos com diagnóstico clínico de HPE, buscando a determinação do possível componente genético contido em sua etiologia.

Devido à escassez de dados na literatura relacionando HPE a alterações nas regiões subteloméricas, este estudo teve como foco a ampliação de dados a respeito das investigações dessas regiões cromossômicas, visando auxiliar a identificação de possíveis alterações que pudessem ser relacionadas à HPE em indivíduos com diagnóstico clínico da doença. Esta abordagem se mostra muito importante para o aconselhamento genético e planejamento familiar de casais em que há um portador da doença.

Sendo assim, o presente estudo sugeriu a investigação de possíveis microdeleções e/ou microduplicações nas regiões subteloméricas de 25 indivíduos diagnosticados como portadores de HPE. Foi possível analisar as regiões subteloméricas obtendo bons resultados na amostra estudada. Os dados deste projeto complementarão dados já obtidos em projetos concluídos e outros ainda em desenvolvimento, pela equipe da Divisão de Sindromologia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Embriologia do sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) é fundamental para o desenvolvimento do complexo craniofacial. Ele é originado a partir da placa neural, uma área espessa composta homogeneamente de células epiteliais diferenciadas a partir do ectoderma, o qual constitui a superfície dorsal do embrião no estágio de gástrula. À medida que a placa neural dobra-se para a formação do tubo neural, a porção anterior alargada se subdivide nas três vesículas encefálicas primordiais: prosencéfalo (encéfalo anterior), mesencéfalo (encéfalo médio) e rombencéfalo (encéfalo posterior) (SOM & NAIDICH, 2014). A crista neural, uma massa celular que se desprende das extremidades da placa neural no momento da fusão, para a formação do tubo neural, é derivada da região do rombencéfalo e dará origem à maior parte do mesênquima do arco faríngeo (CORDERO et al., 2011). A migração das células da crista neural resulta em uma relocação ventral para dentro dos arcos faríngeos. O centro prosencefálico, derivado do mesoderma precordial, após a divisão do prosencéfalo, induz o aparato visual, parte da orelha interna, média e externa, além do terço médio superior da face. Sabe-se que o desenvolvimento das regiões média e baixa do complexo craniofacial está intimamente associado a essas regiões faríngeas, ficando claro, portanto, que a crista neural, derivada do rombencéfalo, é essencial para a formação normal de face e pescoço. Alterações que ocorrem nestas etapas do desenvolvimento embrionário podem resultar em anomalias diversas, envolvendo as fitas olfativas, o desenvolvimento das narinas, o globo ocular, germes dentários, orelhas, entre outras (CHAI et al., 2000; MOORE & PERSAUD, 2008; SANTIAGO, 2006).

As anomalias craniofaciais são alterações do desenvolvimento do crânio e da face, que podem ou não estar acompanhadas de malformações estruturais e/ou funcionais do SNC.

Estas representam a quarta causa mais frequente dentre as anomalias congênitas em recém-nascidos. Durante muito tempo, considerou-se que grande parte dessas alterações resultava da formação insuficiente ou migração inadequada do mesênquima da base do crânio e da face (MAZZOLA, 1976). Entretanto, com o avanço do conhecimento, principalmente no que diz respeito ao domínio da genética molecular, identificou-se que a construção craniofacial resulta de mecanismos diversos dependentes de uma grande quantidade de genes em permanente interação, dentre eles os genes *SHH*, *SIX3*, *TGIF*, *ZIC2*, *GLI2*, *PATCHED 1* (LOWE et al., 2000; MARTI & BOVOLENTA, 2002; MARAZITA & MOONEY, 2004; MERRITT, 2005; HEDLUNG, 2006; SANTIAGO, 2006).

Quando comprometidos, os mecanismos genéticos – que são múltiplos e complexos – envolvidos nos diversos processos do desenvolvimento craniofacial resultam em uma imensa variedade de síndromes, sequências, associações ou mesmo anomalias isoladas. Define-se síndrome como um padrão de anomalias (sinais e sintomas), sendo pelo menos uma delas morfológica, conhecida ou aparentemente relacionada com a causa. Sequências são definidas como uma ou mais anomalias morfológicas conhecidas, resultantes de uma única malformação, perturbação, deformação ou displasia. Já associações se referem a um padrão de anomalias, das quais pelo menos duas são morfológicas, ocorrendo em conjunto, com mais frequência do que seria esperado pelo acaso, porém sem relação causal identificada. Finalmente, anomalias isoladas relacionam-se com um fenótipo anatômico (micro e macroscópico) que representa uma mudança substancial da população de referência. A classificação de pacientes por síndromes específicas é difícil e muitas vezes confusa, resultando em certos quadros dispostos dentro de um espectro contínuo, no qual diferentes mecanismos etiológicos e patológicos também se interpõem (COHEN, 1997; HENNEKAM et al., 2013).

2.2. Holoprosencefalia

Em 1964, DeMeyer et al. propuseram o termo Holoprosencefalia (HPE), definido-a como o comprometimento estrutural e funcional de componentes do prosencéfalo (telencéfalo e diencéfalo), caracterizando o defeito embrionário de linha média, e como sendo o resultado da falha no crescimento ou segmentação da região final anterior do tubo neural, ocorrendo entre o 18° e o 24° dia da gestação (MING & MUENKE, 1998; SWATEK, 2013). A HPE é a malformação craniofacial mais comum em humanos e apresenta uma alta incidência, de 1:250 durante a embriogênese (MATSUNAGA e SHIOTA, 1977), mas devido à letalidade intra-uterina, a frequência é de 1:16.000 nascidos vivos (ROACH et al., 1975; MUSTACCHI & PERES, 2000; DUBOURG, 2007).

De acordo com a gravidade das malformações cerebrais, a HPE pode ser classificada em quatro tipos: 1) HPE alobar, 2) HPE semilobar, 3) HPE lobar e 4) fusão inter-hemisférica média. A classificação dos quatro tipos de HPE, de acordo com seus respectivos achados anatômicos, encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação e características anatômicas dos diferentes tipos de HPE, de acordo com a gravidade (modificado de DUBOURG et al., 2007).

TIPOS DE HPE	CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS
HPE-ALOBAR	Forma mais grave Presença de um único e pequeno ventrículo prosencéfalo Ausência de divisão inter-hemisférica Ausência dos bulbos olfatórios ou de suas vias, tratos ópticos e seio sagital Ausência de corpo caloso Fusão de tálamo Não separação dos núcleos cinzentos profundos
HPE-SEMI LOBAR	Lóbulos frontais e parietais fusionados, ou seja, rudimentares Fissura inter-hemisférica posteriormente incompleta Ausência ou hipoplasia dos bulbos olfatórios ou de suas vias Ausência de corpo caloso Variação da separação dos núcleos cinzentos profundos
HPE-LOBAR	Lóbulo cerebral totalmente desenvolvido Distinta divisão inter-hemisférica Linha média do neocórtex frontal contínua Corpo caloso, tratos e bulbos olfatórios podem estar ausentes, hipoplásicos ou normais Separação dos núcleos cinzentos profundos Associado a manifestações faciais menos graves
FIHM (fusão inter-hemisférica média)	Malformação rara Falha da separação dos lobos frontal e parietal posterior Joelho do corpo caloso e músculo esplênio-cervical normalmente formados Hipotálamo e núcleos lentiformes normalmente separados Massa cinzenta heterotópica

Várias anomalias craniofaciais estão comumente associadas à HPE e, assim sendo, utiliza-se, em genética clínica, o termo “sequência da HPE” para designá-las. Do ponto de vista genético, pode não ser apropriado o uso de uma definição fixa de HPE, pois é sabido que uma mesma causa genética pode trazer como consequência tanto a HPE, em qualquer uma de suas formas, quanto microformas da mesma (SANTIAGO, 2006). Em relação ao fenótipo, a doença é bastante variável, abrangendo um espectro contínuo desde manifestações

graves envolvendo anomalias do cérebro e face, até indivíduos clinicamente normais (COHEN, 1989).

De acordo com DeMeyer et al. (1964), em aproximadamente 80% dos casos mais graves de HPE, “a face prediz o cérebro”. Entretanto, a severidade das malformações faciais nem sempre condiz com as cerebrais. A maior parte dos portadores de HPE possui pelo menos uma anomalia facial; porém, acredita-se que 20% dos indivíduos que apresentam malformações cerebrais podem não apresentar nenhum sinal facial. Indivíduos com desenvolvimento cerebral e cognitivo normal podem gerar filhos com HPE. Desta maneira, é sugestivo que as microformas de HPE sejam indicativas de alerta para avaliação de riscos e precaução para o possível nascimento de filhos afetados (DEMEYER et al., 1963; SANTIAGO, 2006; SAVASTANO et al., 2014b).

Os principais macro/microsinais dentro deste espectro heterogêneo incluem:

- Diminuição do perímetro craniano;
- Agenesia ou hipoplasia da espinha nasal anterior;
- Ausência ou diminuição do ângulo frontonasal;
- Agenesia de pré-maxila;
- Anomalias oculares diversas, como hipotelorismo ocular (aproximação excessiva dos olhos), ciclopia (olho único ou parcialmente dividido na mesma órbita, neste caso caracterizando a sinoftalmia) e coloboma da íris (defeito da íris em forma de buraco de fechadura);
- Maxila, asas nasais e nariz hipoplásicos;
- Probóscide (apêndice tubular situado acima dos olhos);
- Ausência de ponta nasal;
- Estenose da abertura nasal;
- Filtro hipodesenvolvido;
- Incisivo central maxilar único;

- Fissura labiopalatina mediana ou falsa mediana;
- Maloclusão (RICHERI-COSTA & RIBEIRO, 2006 a,b; SANTIAGO, 2006; HENNEKAM et al., 2008; LIPINSKI et al., 2010; SOLOMON et al., 2010; BANO, 2012; JAVAD, 2013; SWATEK et al., 2013).

Alguns destes sinais característicos podem ser ilustrados na Figura 1:

Figura 1. Algumas características fenotípicas em HPE. 1)Ciclopia com sinoftalmia, 2)Hipotelorismo ocular e probóscide entre os olhos, 3)Hipotelorismo ocular e nariz com narina única, 4)Fissura labiopalatina, ausência de filtro nasal, nariz achatado e agenesia de pré-maxila, 5)Leve dismorfismo facial, ponte nasal baixa (SANTIAGO, 2006).

Em 2003, foi descrito ainda um fenótipo singular dentro do espectro holoprosencefálico, o *HPE-like*, também chamado de microforma de HPE que aparece associado ou não a outras anormalidades do processo de separação do prosencéfalo. As características mais comuns são: hipotelorismo isolado, fissura de lábio e/ou palato, presença de incisivo central único e hipoplasia de face média. É importante salientar que associações entre estes sinais, feitas de forma aleatória, são indicativas de que, até o presente momento, não há definição padronizada para este fenótipo. Pacientes diagnosticados com *HPE-like*, na

maior parte dos casos, apresentam desenvolvimento cognitivo e neuropsicomotor normais (RICHIERI-COSTA & RIBEIRO, 2005; SANTIAGO, 2006).

Diversas anomalias, que até há pouco tempo não eram descritas ou relacionadas ao espectro da HPE, foram incorporadas ao diagnóstico após o advento dos exames de neuroimagem, aumentando-se assim o arsenal clínico. Dentre estas anomalias, destacam-se as anomalias estruturais do corpo caloso, marcadamente a agenesia, as anomalias da glândula pituitária, as anomalias dentárias, nasais, oculares, entre outras. Hoje é sabido que a ampliação deste universo dependia apenas de um meio mais simples e eficaz de diagnóstico, pois boa parte destas anomalias estava predita nos modelos experimentais com outros vertebrados ou em achados clínicos descritos, posteriormente, como parte integrante de determinadas mutações (ROESSLER & MUENKE, 2001; RICCOMAGNO et al., 2002; COHEN, 2003; DAKUBO et al., 2003; ROESSLER et al., 2003; SCHIMMENTI et al., 2003; SAVASTANO et al., 2014a,b).

A etiologia da HPE é heterogênea e complexa. Envolve fatores ambientais, tais como o uso materno de ácido retinóico, consumo abusivo de álcool e diabetes gestacional, além do uso de inibidores da biossíntese de colesterol, ou mesmo níveis maternos baixos de colesterol, uso de salicilatos, anticonvulsivantes e sulfassalazina. Infecções por citomegalovírus, toxoplasmose e rubéola vêm sendo postuladas, também, como possíveis causas da HPE (SANTIAGO, 2006; SWATEK, 2013). A etiologia envolve, também, formas sindrômicas (síndrome de Smith-Lemli-Opitz), anomalias citogenéticas (detectadas por cariótipo de rotina de alta resolução), anomalias cromossômicas submicroscópicas (diagnosticadas por metodologias como FISH, MLPA e microarray) e mutações gênicas, tendo como principais genes envolvidos: *SHH* (mutação presente em 12,7% dos casos), *ZIC2* (mutação presente em 9,2% dos casos, associado com face normal), *SIX3* e *TGIF* (JOHNSON & RASMUSSEN, 2010; ROESSLER & MUENKE, 2010; SOLOMON et al., 2010).

Mutações pontuais destes quatro principais genes da HPE são encontradas em aproximadamente 20% dos casos e grandes deleções envolvendo os mesmos genes são detectadas em 8% dos casos (SWATEK, 2013).

Bendavid et al. (2007) realizaram um levantamento, no qual observaram que 45% da etiologia de HPE é cromossômica, diagnosticada através de cariótipo padrão; 15% se relacionam com fatores ambientais evidentes, como diabetes gestacional desde o início da gestação, além de síndromes com múltiplas malformações, como Smith-Lemli-Opitz, Rubinstein-Taybi e Pseudotrissomia 13. Dos 40% dos casos remanescentes, os chamados HPE isolada (não-cromossômica e não-sindrômica), as metodologias de sequenciamento e dosagem gênica dos quatro principais genes identificaram anomalias moleculares em mais de 25%. Assim, aproximadamente 75% dos casos de HPE isolada têm etiologia genética e ambiental a ser determinada (BENDAVID et al., 2007).

A variabilidade fenotípica extrema da HPE pode ser observada em familiares carregando a mesma mutação. O espectro fenotípico varia entre indivíduos não afetados ou com microformas até indivíduos com as características mais graves da doença, indicando que uma simples mutação pode não ser o suficiente para provocar o fenótipo de HPE e, conseqüentemente, sua gravidade depende de uma série de fatores genéticos e ambientais acumulados, a chamada “hipótese dos múltiplos fatores” (the multiple-hit hypothesis) (COHEN, 1989; MUENKE et al., 1994; MING & MUENKE, 2002; MERCIER et al., 2011; SWATEK et al., 2013).

O principal modelo relacionado com a HPE refere-se à rede sinalizadora do gene *Sonic Hedgehog* (*SHH*), o qual controla decisões celulares críticas em relação ao destino de múltiplos sistemas, particularmente nas células tronco e a partir delas, funcionando como um “interruptor” – inibidor ou facilitador – ditando o destino celular desde etapas iniciais do embrião até a vida adulta (NANNI et al., 1999; LAI et al., 2004; RYAN & CHIANG, 2012).

Os genes mais conhecidos relacionados à rede sinalizadora do *SHH* compreendem *ZIC2*, *TGIF*, *PATCH*, *GLI2*, *FAST1*, *TDGIF*, *SUFU* e o *DHCRT*. Outros genes não pertencentes a esta rede incluem o gene *SIX3* e uma série de outros candidatos, até o presente, apenas com regiões identificadas. Diversas regiões cromossômicas também estão supostamente implicadas na etiologia da HPE (PETEK et al., 1998; STASHINKO et al., 2004; KAMNASARAN et al., 2005).

2.3. Importância da via de sinalização Sonic Hedgehog no desenvolvimento craniofacial e Holoprosencefalia

O funcionamento da via Hedgehog (Hh) foi descrito, inicialmente, em estudos com *Drosophila*, sendo grande parte dos componentes preservados em humanos (GOODRICH et al., 1997). Mutações em componentes da via Hedgehog e outras, como TGF/b/NODAL, WNT e BMP, podem trazer como consequência o fenótipo de HPE (LIPINSKI et al., 2010; RYAN & CHIANG; 2012).

A ativação da via é realizada por três proteínas homólogas: Sonic Hedgehog (SHH), Desert Hedgehog (DHH) e Indian Hedgehog (IHH). O gene *SHH* se expressa como uma proteína sinalizadora na notocorda e células da placa neural, tendo como função a regulação dos centros organizadores do prosencéfalo e rombencéfalo. Este participa do desenvolvimento de somitos e do tubo neural; IHH é responsável pelo desenvolvimento de condrócitos, enquanto DHH participa do desenvolvimento de células germinativas (SANTIAGO, 2006; SALES, 2012; PAN et al., 2013;).

Os membros da família Hh são proteínas secretadas que agem sobre sinais intercelulares em uma série de processos distintos. O gene Hedgehog desempenha um papel crucial no desenvolvimento embrionário normal de órgãos como pulmões (GRINDLEY et al., 1997) e sistema nervoso, e permanece ativo no indivíduo adulto, no qual está envolvido na

manutenção de células estaminais. Além disso, no adulto, um padrão de sinalização aberrante nos membros da família Hh pode levar a algumas formas de câncer (COHEN, 2003; WETMORE, 2003).

Geralmente, somente o termo “via de sinalização de Hh” é comumente usado. Entretanto, esta via é extremamente complexa, englobando muitas outras, o que resulta em fenótipos muito diferentes, advindos de vários tipos de mutações em diversos componentes das vias. Os fenótipos incluem, dentre outros, HPE, Cefalopolisindactilia de Greig, Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide, Síndrome de Pallister-Hall, Meduloblastoma etc (COHEN, 2003).

A via de sinalização Hh é composta de duas proteínas transmembrana: Patched (Ptc), uma proteína composta por 12 canais de passagem, que se une ao ligante de Hh; e Smoothed (Smo), uma proteína transdutora de sinal composta por sete canais de passagem. Na ausência do ligante, Ptc interage com Smo e o inibe, direta ou indiretamente. Esta repressão culmina no fator de transcrição agindo como um repressor da transcrição. Este fator de transcrição existe em três diferentes formas nos vertebrados, sendo chamados de Gli e apresenta funções transcricionais distintas. Quando Hh se liga à Ptc, sua interação com Smo se altera de forma que Smo não seja mais inibida. Assim, a proteína Gli adentra o núcleo da célula e age como um ativador de transcrição para os mesmos genes que esta inibe quando Ptc está livre para interação, inibindo Smo, conforme ilustrado na Figura 2. Estudos em vertebrados indicam que a determinação do destino da célula por vias de sinalização Hh ocorra pela combinação dos genes Gli expressos nesta célula (GOODRICH & SCOTT, 1998; JOHNSON & SCOTT, 1998; KALDERON, 2000; MCMAHON, 2000). Mamíferos podem expressar pelo menos duas proteínas Ptc: Patched-1 (Ptc-1) e Patched-2 (Ptc-2), sendo que ambas se ligam à Hh com uma afinidade similar (CARPENTER et al., 1998; KALDERON, 2000).

Figura 2. A via de sinalização de Hedgehog envolve duas proteínas transmembrana, Patched (Ptc) e Smoothened (Smo). Ptc liga-se à Shh, ao passo que Smo atua como um transdutor de sinal. Na ausência do ligante, Pct interage com Smo e a inibe. Esta inibição ativa Gli, o repressor de transcrição. Na presença do ligante, a interação de Pct e Smo é alterada de forma que Smo deixa de ser inibida. A proteína Gli entra no núcleo celular e age como ativador de transcrição (MCMAHON, 2000).

A importância da via de sinalização Hh no desenvolvimento embrionário humano se tornou evidente pela descoberta de que mutações nesta via causam HPE. O sinal de SHH é necessário para a manutenção da notocorda, a indução da placa ventral e de neurônios motores e indução do esqueleto axial. A proteína SHH, secretada a partir do mesoderma pré-cordal, normalmente sinaliza para inibir a formação de olhos centrais rudimentares, e quando este sinal se apresenta defeituoso, o resultado é a formação de um olho cíclope (CHIANG et al., 1996; MOORE & PERSAUD, 2008).

A função da proteína SHH foi determinada em estudos experimentais prévios por meio da indução de ciclopamina em cultura celular, uma substância alcaloide-esteroidal (análoga ao colesterol) advinda da planta *Veratrum californicum*. A ciclopamina foi descrita pela primeira vez na década de 1960, por causar defeitos associados à HPE em ovelhas, e

desde então tem sido utilizada em estudos de teratogênese envolvendo diferentes vertebrados. Esta substância atua como antagonista da atividade morfogenética da via Hh, pela inibição da ligação e consequente prevenção da ativação de proteínas transmembrana Smo. Na ausência do ligante de Hh, o seu receptor Ptc-1 inibe a atividade de Smo, provavelmente através de uma pequena molécula mediadora. Após a ligação de Hh com Ptc1, desfaz-se a inibição de Smo, provocando a ativação de uma complexa cascata *downstream* que culmina na expressão do gene alvo, através da família dos fatores de transcrição Gli (LIPINSKI et al., 2010; RYAN & CHIANG; 2012).

Atualmente, existem bancos de dados disponíveis online, que inter-relacionam vias de sinalização, gerando mapas que permitem visualizar a interação entre redes de genes que participam de atividades metabólico-celulares específicas. Neste caso, a via de sinalização de Hh, relacionada com o desenvolvimento do SNC, pôde ser delineada no site geneMANIA.org, e observada abaixo, na Figura 3.

Figura 3: Via de sinalização de Hh, delineada no site *geneMANIA.org*.

2.4. Região subtelomérica e sua implicação clínica

Os telômeros (do grego, *telos* = término + *meros* = parte) correspondem às regiões terminais dos cromossomos, sendo complexos e ricos em genes. Já os subtelômeros, são regiões excepcionais do genoma, formando a zona de transição entre as sequências cromossômicas de cópia única e as repetições teloméricas (TTAGGG)_n de cada cromossomo. São estruturas dinâmicas e tem como funções: garantir a estabilidade dos cromossomos; garantir a replicação completa do genoma; regulação do ciclo celular; controle do envelhecimento celular, garantindo sua longevidade; movimentação e localização de

cromossomos dentro do núcleo e regulação transcricional de genes subteloméricos (BLASCO et al., 1999; FEUERBACH et al., 2002; MARTINS, 2010).

Em todos os cromossomos eucarióticos, as regiões subteloméricas contêm sequências repetidas *in tandem* (TTAGGG), com extensão variável de 2 a 15 Kb, sendo um domínio distal subtelomérico composto de famílias complexas de DNA repetitivo, com diferentes padrões de homologia dentro dos cromossomos, como mostrado na Figura 4. Algumas sequências subteloméricas incluem genes não funcionais e, além disso, sem a sequência terminal repetitiva, os cromossomos são instáveis e passíveis de fusões terminal-terminal e de degradação exonucleolítica, representando sítios de instabilidade genômica (D'ANGELO, 2009; MARTINS, 2010).

Figura 4: Organização dos telômeros (adaptado de KNIGHT & FLINT, 2000).

As regiões adjacentes aos telômeros possuem várias características que as tornam candidatas à ocorrência de rearranjos, tais como a quase ausência de histonas e nucleossomos, riqueza de genes e ilhas CpG, e alta probabilidade de recombinação (SACCONI et al., 1992; KNIGHT & FLINT, 2000). Embora os rearranjos subteloméricos descritos em muitos estudos envolvam regiões específicas, é provável que a grande interação entre sequências subteloméricas homólogas inicie o processo de recombinação nessas regiões. Apesar do mecanismo de duplicação e separação das regiões cromossômicas terminais ainda não estar totalmente elucidado, já se sabe que erros podem ocorrer e que mutações envolvendo essas regiões podem ser herdadas, com ou sem consequências clínicas (MEFFORD & TRASK, 2002).

O emparelhamento errôneo de telômeros entre cromossomos não homólogos é uma das principais causas de rearranjos cromossômicos, tais como deleções e duplicações, embora o mecanismo exato não seja totalmente compreendido (MEFFORD & TRASK, 2002).

Rearranjos cromossômicos envolvendo telômeros ou extremidades dos cromossomos podem ser uma provável causa de deficiência intelectual idiopática, acometendo de 5 a 10% dos casos (FLINT & KNIGHT, 2003). Os telômeros são relativamente ricos em genes e, desta maneira, rearranjos nestas regiões podem, possivelmente, resultar em anormalidades clínicas. Deleções subteloméricas específicas podem resultar em síndromes conhecidas como Síndrome da alfa-Talassemia/Síndrome da deleção 16pter, Síndrome de Miller-Dieker (del17pter), síndrome de Wolf-Hirschhorn (del4pter) e síndrome do Cri-du-chat (del5pter). No entanto, a maioria das deleções das extremidades dos cromossomos não é clinicamente reconhecível. Devido à sua importância clínica, muitos laboratórios analisam as regiões subteloméricas em indivíduos com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) de causa desconhecida (MEDINA et al., 2014).

Considerando o aspecto multigênico envolvido na HPE, a investigação nos *loci* conhecidos de HPE e a busca constante por novos *loci* candidatos devem continuar. Uma ótima estratégia para se identificar *loci* candidatos para afecções genéticas é através da investigação das alterações cromossômicas.

A análise cromossômica constitui uma excelente ferramenta para a identificação das causas das síndromes genéticas, particularmente aquelas envolvidas com malformações do SNC (SHAFFER et al., 2007). As primeiras alterações citogenéticas encontradas em HPE foram trissomia 13, trissomia 18 e triploidias (NORMAN, 1995; ROESSLER & MUENKE, 1998). Alterações citogenéticas em HPE permitiram a identificação de 12 *loci* candidatos, a partir dos quais foram identificados os quatro principais genes associados (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3* e *TGIF*) (BELLONI et al., 1996; BROWN et al., 1998; WALLIS et al., 1999; GRIPP et al., 2000; BROWN et al., 2001).

Bendavid et al. (2006a, b) demonstraram que técnicas como Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR), são ferramentas úteis na busca por alterações nos *loci* conhecidos para HPE.

O desenvolvimento da reação de amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação (MLPA) na busca por rearranjos submicroscópicos permitiu a realização de *screening* genético com maior praticidade e menor tempo, uma vez que consegue analisar múltiplas amostras em uma mesma reação, além de ser pouco onerosa. Sendo assim, é uma importante ferramenta na investigação de possíveis arranjos associados às malformações congênitas (HOGERVORST et al., 2003; ROOMS et al., 2004; BENDAVID et al., 2007; BENDAVID et al., 2010). Atualmente, existem vários kits de sondas para este tipo de análise, disponíveis comercialmente (MRC-Holland, 2008).

A análise das regiões subteloméricas em indivíduos com ADNPM de causa desconhecida, algumas síndromes conhecidas, bem como em indivíduos com HPE deve ser

estimulada. Koolen et al. (2004) demonstraram que alterações subteloméricas estão relacionadas ao ADNPM. Evidências deste trabalho levantaram a hipótese de que alterações subteloméricas poderiam estar atuando como causa para HPE. Assim, Bendavid et al. (2007) observaram que, dos 12 *loci* candidatos previamente descritos, oito situavam-se em regiões subteloméricas, inclusive os genes *SHH* e *TGIF*, atualmente os mais importantes relacionados à HPE. Além disso, acreditava-se que um *screening* das regiões subteloméricas poderia refinar os genes candidatos já conhecidos, além de identificar novos. Bendavid et al. (2007), analisaram 181 casos de HPE, os quais apresentavam cariótipo normal e não possuíam mutações em nenhum dos quatro principais genes de HPE, através da técnica de MLPA. Os resultados mostraram rearranjos em *loci* candidatos para HPE conhecidos (1q, 20p e 21q), bem como a identificação de novos *loci* subteloméricos (1p, 5q, 8p, 17q, 18q, 22q e Xq) e um subcentromérico (15q). Associações entre ganho e perda subtelomérica também foram encontradas e podem ser herdadas por translocação parental equilibrada, o que é importante para o aconselhamento genético. Estes achados reforçam a teoria de múltiplos fatores para a origem da HPE, contribuindo para a explicação da grande variabilidade do espectro fenotípico, descrito nesta doença. Dos 181 pacientes, oito apresentaram anormalidades subteloméricas, o que caracterizou 4,4% da amostra analisada, mostrados em verde na Figura 5 (BENDAVID et al., 2007).

Em 2010, Bendavid et al. publicaram uma revisão acerca da HPE e as anormalidades citogenéticas já descritas na literatura. Neste artigo, foi desenhado um mapa cromossômico – mostrado na Figura 5 – em que foram documentadas as mudanças e descobertas recentes, esquematizando as posições de genes já validados para HPE e regiões citogenéticas anormais em que nenhum gene candidato específico havia sido identificado.

Figura 5: Representação esquemática da localização das deleções de genes da HPE e candidatos de HPE em bandeamento G. Barras marrom-caqui, na lateral esquerda, representam deleções detectadas por cariótipo de rotina. Barras verdes, do lado direito, representam rearranjos identificados pela técnica de MLPA subtelomérica, em que linhas tracejadas identificam deleções não delimitadas. Barras azuis do lado direito representam deleções submicroscópicas identificadas pela técnica de hibridização genômica comparativa (array-CGH). O azul escuro denota deleções *de novo*, enquanto o azul claro determina deleções herdadas. Para demonstrar um repertório exaustivo de genes possivelmente envolvidos com a HPE, foram posicionados os principais em vermelho e os menores, em laranja (BENDAVID et al., 2010).

Baseado no trabalho de Bendavid et al (2007), com o intuito de se investigar possíveis alterações genéticas nos indivíduos com HPE cadastrados no HRAC, para os quais as análises citogenéticas e moleculares prévias foram negativas, utilizamos a técnica de MLPA na expectativa de se determinar a presença de microdeleções/duplicações nas regiões subteloméricas desses indivíduos.

2.5. Técnica de MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

A técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification ou Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação) foi inicialmente descrita por Schouten et al. (2002), em um trabalho no qual foram investigadas, em uma mesma reação, alterações no número de cópias de 50 sequências diferentes de ácidos nucleicos em um único experimento (SCHOUTEN et al., 2002; SORENSEN et al., 2008; KONIALIS et al., 2014).

Esta técnica tem como base a hibridização de sondas específicas em regiões de interesse do genoma. A interpretação dos resultados é feita de acordo com a quantificação dessas sondas, já que após sua hibridização no DNA, estas sofrem amplificação pela técnica de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR). Os fragmentos finais são separados e lidos em aparelho de eletroforese capilar, sendo possível a quantificação relativa de cópias gênicas determinando se há maior número de cópias, de forma a ser caracterizada uma duplicação ou menor número, caracterizando uma deleção da sequência alvo (MRC-Holland, 2008; ÁVILA, 2009).

A empresa holandesa MRC-Holland patenteou a técnica e as possibilidades de aplicação são variadas: verificação de alterações no número de cópias (deleções ou duplicações), busca de mutações, análise de metilação do DNA (imprinting e epigenética), quantificação relativa de mRNA, detecção de pontos de mutação conhecidos e SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único), identificação de aberrações cromossômicas em

linhagens celulares e amostras tumorais, pesquisa de síndromes relacionadas à microdeleções e de distrofias musculares e triagem subtelomérica. Segundo a fabricante, as vantagens dessa técnica, em relação a outras utilizadas na identificação de alterações genômicas, compreendem a detecção de muitas sequências do DNA genômico em uma mesma reação utilizando apenas 20ng de DNA (alto rendimento), a disponibilização de resultados em 24 horas empregando um termociclador e um sistema de eletroforese capilar (alta praticidade e rapidez), a possibilidade de inclusão de muitas amostras em um mesmo ensaio (reprodutibilidade), a capacidade de detectar sequências que diferem em apenas um nucleotídeo e o uso de protocolo único para muitas aplicações diferentes, com custo relativamente baixo. Entretanto, a técnica não permite identificar rearranjos cromossômicos equilibrados ou alterações externas à região de anelamento das sondas (MRC-Holland, 2008).

O termo “SALSA” (Selective Adaptor Ligation, Selective Amplification), do kit de MLPA, refere-se ao adaptador seletivo de ligação e amplificação, aplicado para estudos em regiões subteloméricas, que permite o teste simultâneo de todas as suas regiões, necessitando de uma menor quantidade de DNA, sendo uma técnica de mais fácil análise, quando comparado à técnica de FISH (BENDAVID et al., 2007).

As principais etapas da reação de MLPA são: desnaturação e hibridização das sondas, reação de ligação, reação de PCR e análise de dados, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6: Etapas da reação de MLPA: ilustração esquemática do mecanismo de hibridização do DNA alvo por sondas de MLPA, seguido de amplificação. Em preto, são apresentadas as sequências de *primer* universal; em verde, a sequência *stuffer*, responsável pela produção do fragmento em tamanho pré-definido, e em azul, a sequência complementar ao DNA alvo (MRC-Holland, 2008; ÁVILA, 2009).

Inicialmente, o DNA sofre desnaturação e incubação com um mix de sondas. Cada sonda é composta por dois oligonucleotídeos separados, sendo que cada uma contém uma das sequências dos *primers* da PCR. Sequências alvo imediatamente adjacentes são hibridizadas pelos dois oligonucleotídeos de cada sonda. Dessa forma, somente as sondas que foram hibridizadas sofrem a reação de ligação e, conseqüentemente, serão amplificadas durante a reação de PCR. Seus produtos são separados por eletroforese capilar. As sondas que

não hibridizaram e, por consequência, não sofreram reação de ligação, apresentam apenas um *primer*, não sofrendo amplificações e não gerando nenhum sinal. Uma das grandes facilidades observadas na execução da técnica do MLPA é que não há necessidade de remoção das sondas que não sofreram ligação (SCHOUTEN et al., 2002; PALOMARES et al., 2006; MRC-Holland, 2008).

Atualmente, são encontrados na literatura diversos estudos demonstrando que a técnica de MLPA possui vantagens, quando comparada a outras metodologias moleculares, pelo fato de permitir que múltiplos fragmentos sejam analisados em um mesmo ensaio, apresentando menor custo relativo; ser uma técnica de rápida execução, com alto grau de especificidade e confiabilidade; apresentar baixa taxa de falso-positivos e ser apropriada para uso em rotinas de laboratórios de diagnóstico genético e de pesquisas (HOGERVORST et al., 2003; SLATER et al., 2003; ROOMS et al., 2004; PALOMARES et al., 2006; BENDAVID et al., 2007). Em comparação ao método de FISH, por exemplo, a MLPA é uma boa ferramenta diagnóstica, cerca de 1/15 de seu valor, e facilmente usada em grandes grupos de pacientes, já que pode ser realizado um *screening* de amostras de 13 pacientes por corrida, em apenas 48 horas. O *screening* subtelomérico por FISH precisa de 15 preparações multicores por paciente, tornando difícil a análise de mais de dois pacientes em 48 horas. No futuro, o kit de FISH subtelomérico poderá ser usado como uma segunda linha de testes, orientado pelos resultados obtidos pela MLPA, podendo ser aplicado nos pais de indivíduos acometidos, buscando detectar anomalias cromossômicas que não puderem ser detectadas pela técnica de MLPA (BENDAVID et al., 2007).

Palomares et al. (2006) compararam as técnicas de FISH e MLPA no estudo de regiões subteloméricas de pacientes com deficiência intelectual idiopática. De 50 pacientes analisados, apenas um paciente apresentou resultados distintos na comparação entre as duas técnicas, demonstrando um alto nível de concordância entre as duas metodologias estudadas.

Ressaltam ainda que a técnica é recente e até aquele momento, havia sido utilizada em apenas um número limitado de estudos. Desta forma, os pesquisadores sugeriram que qualquer resultado anormal deveria ser interpretado com cuidado e verificado com ferramentas alternativas de diagnóstico, como a própria técnica de FISH.

A validação dos resultados da MLPA, por meio de *array CGH*, por exemplo, possibilita encontrar outras possíveis alterações no genoma, que neste caso poderiam também estar associadas ao fenótipo, conforme a hipótese dos múltiplos fatores, que prevê a possibilidade de ocorrência simultânea de múltiplas alterações genéticas para a HPE, dado o amplo espectro fenotípico observado (BENDAVID et al., 2007; BENDAVID et al., 2009).

No presente estudo, pacientes com diagnóstico clínico para Holoprosencefalia com causa ainda desconhecida foram analisados através da técnica de MLPA, com kit específico delineado para o estudo de regiões subteloméricas, com o intuito de se determinar possíveis alterações genéticas que possam estar relacionadas ao fenótipo da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a presença de microdeleções/duplicações nas regiões subteloméricas em indivíduos com diagnóstico de Holoprosencefalia.

3.2. Objetivos específicos

- 1- Identificar novas etiologias para HPE de causa desconhecida;
- 2- Identificar novos genes responsáveis pela HPE;
- 3- Fazer correlação genótipo/fenótipo dos casos envolvidos no estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo/Bauru-SP (HRAC/USP-Bauru), aprovado sob o protocolo nº 375.234 – UEP-CEP (ANEXO 1).

4.1. Grupo Amostral

O grupo amostral foi composto por 25 amostras de DNA de indivíduos matriculados no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo – HRAC/USP - Bauru/SP com hipótese diagnóstica de Holoprosencefalia, tendo como critério de inclusão a triagem prévia para mutação/deleção/duplicação dos genes candidatos à HPE (*SHH*, *ZIC2*, *TGIF*, *GLI2* e *PTCH1*) através do sequenciamento direto de Sanger e da técnica de MLPA, com o uso do kit P187.

Estes pacientes fizeram parte de um projeto anterior (Fapesp Proc N° 06/60973-9), para o qual foram coletados 2mL de sangue para a extração do DNA, segundo protocolo da Qiagen[®], tendo o mesmo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC (Ofício nº 289/2006-SVAPEPE-CEP - ANEXO 2). Na ocasião, estes pacientes foram avaliados pelos profissionais do Setor de Genética Clínica do HRAC e diagnosticados como pertencentes ao espectro fenotípico da HPE.

A casuística selecionada para o presente trabalho inclui amostras de DNA de indivíduos com diagnóstico de HPE clássica e microforma da HPE provenientes do projeto citado anteriormente, sem restrição a nenhum fenótipo específico da HPE. Essas mesmas amostras foram utilizadas em outro projeto intitulado: “Análise genética em indivíduos com holoprosencefalia através das técnicas de MLPA e *ArrayCGH*” (Ofício n. 111/2011-SVAPEPE-CEP - ANEXO 3), onde foi investigada a presença de microarranjos no DNA

destes indivíduos. Assim, foram selecionados para o presente estudo os casos em que não foram detectadas alterações genéticas nos estudos prévios.

Após serem devidamente esclarecidos sobre o novo estudo, os pacientes foram incluídos na casuística mediante a concordância e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido referente ao presente estudo, no momento de um retorno ao hospital (ANEXO 4).

4.2. Análise Molecular

As amostras de DNA foram submetidas à análise molecular através da técnica de MLPA ("*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*", Amplificação Multiplex de Sondas Dependentes de Ligação). Para tal análise, foi utilizado o kit SALSA MLPA KIT P036 Human-telomere-3 (MRC Holland[®], Amsterdam, Holanda), que contém uma sonda para cada região subtelomérica. Na Tabela 2, estão listadas as sondas correspondentes à posição dos fragmentos na região subtelomérica dos cromossomos e seus respectivos tamanhos, contemplados pelo kit.

Tabela 2: Sondas do Kit *SALSA MLPA probemix* P036-E1 Human-telomere-3.

Comprimento	Posição cromossômica	Gene detectado	SALSA MLPA probe	Map View build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity, only visible less than 100ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130 § ±	1p	TNFRSF4	02269-L01761	01-001.14
136	2p	ACP1	02274-L08758	02-000.25
142	3P	CHL1	01721-L01329	03-000.34
151	4P	PIGG (FLJ20265)	02005-L02047	04-000.5
158	5P	PDCD6	01723-L01327	05-000.37
166	6P	IRF4	01724-L02048	06-000.34
172	7p	ADAP1 (CENTA1)	02275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXO25	02397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	01727-L02050	09-000.84
193	10p	DIP2C (KIAA0934)	02277-L01768	10-000.48
202	11p	RIC8A (RIC-8)	03315-L02733	11-000.20
208 ±	12p	SLC6A12	02276-L01767	12-000.17
219 + ±	13q-cen	PSPC1	02399-L01847	13-019.24 (Acrocentric chromosome)
227 +	14q-cen	CONB1IP1 (HEI10)	01732-L01318	14-019.86 (Acrocentric chromosome)
235 +	15q-cen	MKRN3	07291-L08858	15-021.36 (Acrocentric chromosome)
242	16p	POLR3K	01734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	01735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	01736-L02051	18-000.19
265 ±	19p	CDC34	01737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	02396-L01844	20-000.26
283 +	21q-cen	RBM11	01739-L01311	21-014.51 (Acrocentric chromosome)
289 +	22q-cen	BID	01740-L01310	22-016.61 (Acrocentric chromosome)
298	Xp/Yp (PAR1)	SHOX	01148-L01331	X/Y-000.52 (PAR1 region)
307	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	02392-L02149	01-247-08 (0.2 Mb from telomere)
313	2q	CAPN10	01742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH1	02013-L02052	03-198.76 (0.7 Mb from telomere)
330 §	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26 (2.0 Mb from telomere)
337	5q	GNB2L1	03319-L02737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	01746-L01304	06-170.69 (0.5 Mb from telomere)
355	6q	VIPR2	01747-L01303	07-158.60 (0.3 Mb from telomere)
361	7q	ZC3H3 (KIAA0150)	01748-L01302	08-144.69 (1.6 Mb from telomere)
372	9q	EHMT1	08205-L08170	09-139.83 (0.2 Mb from telomere)
379	10q	PAOX (PAO)	09142-L09953	10-135.05 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	NCAPD3 (KIAA0056)	01751-L01299	11-333.60 (1.2 Mb from telomere)
395	12q	ZNF10	02687-L02154	12-132.24 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	01753-L01297	13-112.82 (1.3 Mb from telomere)
411 ±	14q	MTA1	02778-L02201	14-105.00 (1.3 Mb from telomere)
418 ±	15q	ALDH1A3	01755-L01295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS8 (GAS11)	03201-L02669	16-088.63 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	01757-L01293	17-078.45 (0.5 Mb from telomere)
441	18q	RBFA (C18orf22)	01758-L01292	18-075.90 (0.2 Mb from telomere)
450 ±	19q	CHMP2A (BC-2)	09143-L10626	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458 ±	20q	OPRL1	02688-L02884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	PRMT2 (HMT1)	02586-L02059	21-046.89 (0.1 Mb from telomere)
475	22q	RABL2B	01762-L08761	22-049.55 (0.1 Mb from telomere)
483	Xq/Yq (PAR2)	VAMP7 (SYBL1)	01763-L02150	X/Y-154.78 (PAR2; 0.1 Mb from telomere)

4.3. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*

A análise pela técnica de MLPA foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo – Bauru, que conta com a infraestrutura e os equipamentos necessários, conforme protocolo original descrito por Schouten et al. (2002):

I) Desnaturação do DNA e hibridação das sondas: As amostras de DNA foram diluídas (para ser obtida uma concentração de 50 a 200 ng de DNA) em 5 mL de TE (tris-HCl + EDTA). Os DNAs diluídos foram submetidos a uma temperatura de 95°C por cinco minutos e, em seguida, a 25°C, antes de serem retirados do termociclador. Após a desnaturação, foram acrescentados 1,5 µL do SALSA *Probemix* e 1,5 µL do MLPA *buffer* em cada tubo. O *mix* foi incubado a 95°C por um minuto e em seguida permaneceu a 60°C por 16 horas.

II) Reação de ligação: No termociclador, a uma temperatura de 54°C, foram adicionados 32 µL de *mix* ligase-65 às amostras, que foram incubadas a 54°C por 15 minutos e em seguida a 98°C por cinco minutos.

III) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Em um novo tubo foram adicionados 4 µL de SALSA PCR *buffer*; 26 µL de água estéril e 10 µL do produto da reação de ligação. A uma temperatura de 60°C, foi adicionada a enzima (Polymerase *mix*) e, imediatamente, iniciou-se a reação de PCR nas seguintes condições: 35 ciclos da sequência - 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 60 segundos a 72°C. E ao final dos ciclos, 20 minutos a 72°C.

IV) Separação dos produtos amplificados: Em uma placa de sequenciamento foram adicionados de 0,6 a 1,0 µL do produto da PCR, 0,25 mL de ET-550R (*sizer*) e 7 µL de *Tween*-20 0,1%. A leitura dos produtos amplificados foi feita em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

V) Visualização e análise dos resultados: A visualização e análise dos resultados foi realizada com o *software* SoftGenetics GeneMarker[®] V2.2.0 (SoftGenetics LLC) com base em planilhas fornecidas *on line* no site < <http://www.softgenetics.com> >. Este *software* permite a visualização, normalização e comparação de perfis de eletroforese baseados em um tamanho padrão e potência do sinal emitido (BENDAVID et al., 2007).

Diversos estudos já demonstraram a capacidade de detecção da metodologia de MLPA (SCHOUTEN et al., 2002; KOOLEN et al., 2004; ROOMS et al., 2004). Além disso, são escassos na literatura atual, dados que correlacionem alterações em regiões subteloméricas e o aparecimento de HPE, justificando-se, assim, a escolha desta metodologia para a execução deste trabalho.

A técnica de MLPA caracteriza-se por ser uma análise comparativa. Assim, as amostras em estudo foram analisadas concomitantemente entre si. Utilizou-se também um controle negativo (reação sem amostra de DNA), para garantir a ausência de contaminação, assegurando-se, assim, a qualidade da técnica. Alterações esperadas como resultados de análises de MLPA são de dois tipos: **duplicações**, quando os picos referentes à sonda apresentam um valor entre uma vez – para alterações heterozigotas – ou duas vezes o seu tamanho, para alterações homozigotas; **deleções**, quando os picos apresentam a metade do valor do pico de referência – para alterações heterozigotas – ou não apresentam sinal, no caso de alterações homozigotas.

As planilhas *on line* consistem em gráficos com picos correspondentes a cada uma das sondas que constituem o kit SALSA MLPA probemix P036-E1 Human-telomere-3 (MRC Holland[®]) e com duas curvas: uma curva controle e a curva de interesse correspondente ao paciente a ser estudado. Os resultados obtidos com esse tipo de análise permitem verificar se o paciente é portador ou não de alguma alteração nas regiões contempladas pelas sondas do kit a ser utilizado. Se alterações forem detectadas, uma maior precisão no direcionamento em

análises subsequentes pode ser alcançada, a fim de se determinar a alteração em si e suas possíveis consequências.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A HPE, uma anomalia estrutural que acontece durante o desenvolvimento do cérebro anterior e da linha média da face, é a malformação mais comum que acomete seres humanos. Com etiologia complexa e heterogênea, acredita-se que a presença de múltiplos fatores incidindo sobre o aparecimento da doença seja a responsável pelo amplo espectro fenotípico observado, que varia desde olho ciclope e probóscide, até a presença de apenas um incisivo central, com ou sem acometimento do SNC (MING & MUENKE, 1998; RICHIERI-COSTA & RIBEIRO, 2006 a,b; BENDAVID et al., 2010; SOLOMON et al., 2010).

As primeiras alterações citogenéticas encontradas em HPE foram a trissomia do 13 (Síndrome de Patau), trissomia 18 (Síndrome de Edwards), além de triploidias (NORMAN, 1995; ROESSLER & MUENKE, 1998; SWATEK et al., 2013). A partir de então, muitos *loci* e genes candidatos vêm sendo estudados. Até o momento, são quatro os principais genes associados à doença: *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* e *TGIF*, os quais são responsáveis por aproximadamente 25% dos casos (BELLONI et al., 1996; BROWN et al., 1998; WALLIS et al., 1999; GRIPP et al., 2000; BROWN et al., 2001; BENDAVID et al., 2010). Assim, aproximadamente 75% dos casos de HPE continuam sem um diagnóstico genético definido. Dessa forma, a busca por métodos alternativos de análises de regiões cromossômicas pode ser fundamental para a determinação de sua etiologia ou, até mesmo, parte dela. Portanto, uma opção alternativa foi a análise de regiões subteloméricas pela técnica de MLPA, proposta por este trabalho.

5.1. Características da amostra estudada

Fizeram parte deste estudo 25 indivíduos, com idades entre dois e 43 anos, sendo que a idade média entre estes foi de 15,9 anos $\pm$ 11,16. A razão sexual foi de 17 indivíduos do gênero feminino (68%) e oito do gênero masculino.

Dentre os 25 indivíduos estudados, o tipo de HPE diagnosticado não foi um fator de inclusão ou exclusão e, sendo assim, a amostra se apresentou heterogênea: 21 indivíduos (84%) eram portadores da microforma da doença, também chamada de HPE-like; apenas dois indivíduos (8%) apresentaram a forma lobar da doença; e outros dois indivíduos (8%) apresentaram a forma semilobar, como pode ser observado no Gráfico 1.

Gráfico 1: Grupo amostral e suas formas clínicas de HPE.

Algumas características foram observadas em todos os indivíduos, como: microcefalia, hipotelorismo ocular e fissura de lábio/palato. Todos os pacientes que apresentaram a forma lobar e semilobar da doença apresentaram algum comprometimento do SNC, contabilizando 16% da amostra total.

A característica de nariz achatado foi observada em 21 pacientes (84% da amostra), sendo que 17 pacientes (68%) eram portadores da microforma, dois portadores da forma lobar (8%) e outros dois da forma semilobar (8%).

A presença de um incisivo central maxilar único foi observada em 6 indivíduos (24% da amostra), os quais apresentavam a microforma de HPE.

Ponte nasal baixa foi observada em 16 pacientes, caracterizando 64% da amostra. Destes, 12 pacientes (48%) apresentavam a microforma da doença, dois (8%) exibiam a forma semilobar e outros dois (8%), a forma lobar.

Quanto às fissuras de lábio e palato, os grupos apresentaram grande heterogeneidade nos tipos analisados. Neste trabalho, os tipos de fissura somente serão citados.

Nos pacientes com a microforma da doença, cinco apresentaram fissuras do tipo transforame incisivo unilateral esquerda, totalizando 20% do total da amostra, enquanto outros cinco (20%) apresentaram fissura transforame incisivo unilateral direita. Cinco (20%) pacientes foram diagnosticados com fissura transforame incisivo bilateral. Apenas um indivíduo (4%) apresentou fissura transforame incisivo mediana; outro indivíduo (4%) apresentou fissura pré-forame incisivo unilateral esquerda completa. Três pacientes apresentaram fissura pós-forame incisivo incompleta (12%) e apenas um caso (4%) de fissura transforame incisivo bilateral incompleta foi observado.

Pacientes com a forma lobar de HPE apresentaram fissuras transforame incisivo (4%), sendo uma unilateral esquerda e outra da forma mediana (4%).

Indivíduos acometidos com a forma semilobar da doença apresentaram: um, fissura pré-forame incisivo mediana completa (4%), e outro, fissura transforame incisivo bilateral (4%).

A Tabela 3 traz a caracterização dos 25 pacientes contidos no grupo amostral, relacionando seus achados clínicos com o tipo específico de HPE diagnosticado pela divisão de Sindromologia do HRAC-USP.

Tabela 3: Caracterização da casuística estudada.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Classificação da HPE	Hipotelorismo	Microcefalia	Nariz achatado	Fissura lábio e/ou palato	Tipo de Fissura apresentada	Comprometimento do SNC	Incisivo central único	Ponte nasal baixa
1	F	16	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Esquerda	-	-	+
2	F	26	MF	+	+	+	+	FTFI Mediana	-	+	-
3	F	23	MF	+	+	-	+	FTFI Bilateral	-	-	+
4	F	13	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Direita	-	-	-
5	F	24	MF	+	+	+	+	FPósFI Incompleta	-	+	+
6	F	22	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Esquerda	-	-	-
7	M	13	MF	+	+	-	+	FTFI Bilateral Incompleta	-	+	-
8	F	9	MF	+	+	+	+	FTFI Bilateral	-	-	+
9	F	30	MF	+	+	+	+	FTFI Bilateral	-	-	+
10	F	13	MF	+	+	+	+	FTFI Bilateral	-	+	-
11	F	4	L	+	+	+	+	FTFI Unilateral Esquerda	+	-	+
12	M	8	L	+	+	+	+	FTFI Mediana	+	-	+
13	F	20	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Esquerda	-	-	+
14	F	3	SL	+	+	+	+	FPréFI Mediana Completa	+	-	+

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Classificação da HPE	Hipotelorismo	Microcefalia	Nariz achatado	Fissura lábio e/ou palato	Tipo de Fissura apresentada	Comprometimento do SNC	Incisivo central único	Ponte nasal baixa
15	M	5	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Esquerda	-	+	-
16	M	19	MF	+	+	-	+	FTFI Unilateral Direita	-	-	+
17	F	21	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Direita	-	-	-
18	M	14	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Direita	-	+	+
19	F	41	MF	+	+	+	+	FPósFI Incompleta	-	-	-
20	F	2	SL	+	+	+	+	FTI Bilateral	+	-	+
21	M	2	MF	+	+	+	+	FTFI Bilateral	-	-	-
22	M	43	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Direita	-	-	+
23	M	13	MF	+	+	+	+	FTFI Unilateral Esquerda	-	-	+
24	F	6	MF	+	+	+	+	FPósFI Incompleta	-	-	+
25	F	8	MF	+	+	-	+	FPréFI Unilateral Esquerda Completa	-	-	+

F (feminino); M (masculino)
 L: HPE Lobar SL: HPE Semilobar
 FTFI: Fissura Transforame Incisivo

+ = presença de sinal clínico
 MF: HPE-like (Microforma de HPE)
 FPréFI: Fissura Pré-forame Incisivo

- = ausência de sinal clínico
 FPósFI: Fissura Pós-forame

De forma ilustrativa, o Gráfico 2 traz os dados contidos na Tabela 3, referentes à casuística deste trabalho.

Gráfico 2: Características fenotípicas da amostra estudada.

Como pode ser observado, relacionando as características faciais de cada um dos pacientes com a forma de HPE presente, é possível corroborar dados descritos anteriormente na literatura. Em 1964, DeMeyer propôs que “A face prevê o cérebro”. Este relata que, após revisar 75 casos de HPE na literatura e, analisar clinicamente 14 pacientes, não foi encontrada nenhuma exceção para a regra de que os padrões de anomalias faciais predizem o cérebro holoprosencefálico.

Achados clínicos de nossa amostra confirmam o proposto. Neste estudo, observou-se que os quatro indivíduos da amostra, diagnosticados com formas mais graves de

HPE, lobar e semilobar, apresentaram, além de muitas características faciais, o comprometimento do SNC, evidenciando sua maior gravidade. Na amostra estudada, em indivíduos com a microforma, não foi observado comprometimento do SNC. Em contrapartida, apresentaram um incisivo central maxilar único (28,5% da amostra com a microforma da doença), característica frequentemente indicativa ou associada a uma manifestação menor da HPE.

A microforma de HPE tem sido descrita como uma forma leve da doença, em que as principais características fenotípicas estão relacionadas com hipoplasia ou aplasia da espinha nasal anterior, diminuição ou ausência do ângulo frontonasal, hipotelorismo, hipoplasia da pré-maxila e do nariz, asa e ponta nasais achatadas, filtro pouco desenvolvido, incisivo central maxilar único e fissura de lábio/palato, geralmente não relacionadas a comprometimentos do SNC. O fenótipo de microforma da doença geralmente determina um bom prognóstico para os pacientes (RICHERI-COSTA & RIBEIRO, 2010).

Cohen (2001) defendeu que a presença de um único incisivo central como característica fenotípica no indivíduo não deve ser diminuída ou desconsiderada, já que em famílias onde existe um indivíduo gravemente afetado, muitas vezes um dos pais ou até mesmo outros parentes próximos podem apresentar, como única manifestação, a presença de um único incisivo central, evidenciando desenvolvimento mental normal e, sobretudo, um potencial normal de sobrevivência. Assim sendo, a investigação e detecção de anomalias em cariótipos ou mesmo a nível molecular, nestes indivíduos, reforça a necessidade do aconselhamento genético, pois se deve considerar a chance de descendentes serem acometidos por formas mais graves da doença.

5.2. Análise das regiões subteloméricas pela técnica de MLPA

Neste trabalho, após a análise pela técnica de MLPA das 25 amostras de DNA de indivíduos com diagnóstico clínico de HPE, observou-se que nenhuma destas apresentou alterações genéticas nas regiões subteloméricas de interesse, contempladas pelo kit SALSA MLPA P036 Human-telomere-3. A Figura 7 mostra histogramas de quatro indivíduos, escolhidos aleatoriamente, como exemplo da interpretação dos dados gerados pelo *software* GeneMarker[®]. Nestes histogramas, quando algum gene encontra-se alterado, os pontos verdes ultrapassam a área delimitada: para cima se forem encontradas duplicações, e para baixo se forem observadas deleções. Salienta-se que, nos casos apresentados, não foram encontradas alterações nos picos entre pacientes e o padrão de referência.

Figura 7: Perfil normal de análise das sondas, escolhidas ao acaso, em quatro pacientes no painel de análise de fragmentos do *software* GeneMarker. Os pontos verdes dentro das linhas demarcadas correspondem às sondas com padrão normal, ou seja, sem alterações genéticas nas regiões subteloméricas analisadas.

As regiões subteloméricas são reconhecidamente importantes, uma vez que atuam na garantia da replicação completa do genoma, na estabilidade dos cromossomos e no

envelhecimento e longevidade celular (KNIGHT & FLINT, 2000). Entretanto, são regiões de alta instabilidade genômica, onde ocorrem, com frequência, interações intercromossômicas (D'ANGELO, 2009).

Ledbetter, em 1992, foi pioneiro ao especular uma relação entre rearranjos subteloméricos submicroscópicos e malformações congênitas múltiplas, além da deficiência intelectual. A arquitetura genômica complexa nas regiões subteloméricas, associada ao alto índice de recombinação meiótica destes *loci* e à grande concentração gênica nas bandas cromossômicas mais distais poderiam levar a rearranjos patogênicos (LEDBETTER, 1992; D'ANGELO, 2009).

Em 1995, Flint et al. demonstraram a contribuição destes rearranjos subteloméricos críticos na etiologia da deficiência intelectual, de forma que aproximadamente 2,5% dos casos foram relacionados como sendo decorrentes destes.

Depois desta constatação, inúmeros trabalhos descritos na literatura vêm demonstrando forte associação entre alterações no desenvolvimento do SNC e rearranjos em regiões subteloméricas. Abaixo, serão discutidos alguns destes estudos, que incluem deficiência intelectual e ADNPM.

Koolen et al. (2004) analisaram 210 pacientes com diagnóstico de deficiência intelectual idiopática, empregando o SALSA P036 Human Telomere Kit, mesmo kit utilizado no presente estudo. Este foi delineado para realização de um *screening* de regiões subteloméricas, na busca por alterações cromossômicas que poderiam estar relacionadas com o aparecimento da deficiência intelectual nos pacientes estudados. Dos 210 pacientes analisados, 14 pacientes (6,7%) apresentaram anormalidades subteloméricas: 10 deleções e quatro duplicações. Aberrações submicroscópicas clinicamente relevantes foram identificadas em nove pacientes (4,3%): sete alterações *de novo* (cinco deleções e duas duplicações) e duas duplicações herdadas de pais fenotipicamente afetados, como seus filhos. Nos grupos de

pacientes com deficiência intelectual leve, moderada e grave, anomalias relevantes aconteceram em 6,3%, 5,1% e 1,7% dos casos, respectivamente. Curiosamente, um indivíduo com deleção em 12qter, além da deficiência intelectual idiopática, foi diagnosticado também com HPE semilobar, através de ressonância magnética, com fusão dos lóbulos frontais e agenesia do corpo caloso. Os autores confirmam a confiabilidade do método de MLPA para a detecção de rearranjos subteloméricos. No caso de deficiência intelectual, estes defendem que a triagem através desta metodologia deve ser oferecida a todos os pacientes, apesar de uma pré-seleção clínica aumentar a porcentagem das anomalias detectadas. Para a correta exclusão de polimorfismos, os autores orientam que a interpretação dos resultados deve sempre incluir testes nos pais dos indivíduos estudados, além da comparação de características clínicas destes pacientes, com as de pacientes previamente relatados, contendo rearranjos subteloméricos. Além disso, defendem que o método de MLPA detecta duplicações subteloméricas puras, que podem facilmente deixar de serem detectadas pelas análises de rotina, como FISH (KOOLEN et al., 2004).

Bendavid et al. propuseram, em 2007, um estudo de regiões subteloméricas através da utilização da técnica de MLPA, visando a identificação ou mesmo o refinamento de *loci* cromossômicos que poderiam conter novos genes candidatos para HPE. Com a publicação de Koolen et al., em 2004, descrita acima, ficou claro que as regiões subteloméricas demonstravam ser de grande importância para desordens no desenvolvimento, como a deficiência intelectual. Consequentemente, Bendavid et al. supuseram que um *screening* subtelomérico em amostras de pacientes com diagnóstico de HPE, com cariótipos normais poderia identificar microrrearranjos nos oito *loci* descritos previamente (*HPE1* – 21q22.3; *HPE6* – 3p24-pter; *HPE7* – 13q12-q14; *HPE8* – 14q13; *HPE9* – 20p13; *HPE10* – 1q42-qter; *HPE11* – 5pter e *HPE12* – 6q26-qter), ou mesmo em outras regiões subteloméricas. De fato, dos 181 pacientes analisados pelo grupo de pesquisa, oito

apresentaram anormalidades subteloméricas, caracterizando 4,4% da amostra analisada. A amostra envolveu fetos e nascidos vivos com diagnósticos de HPE nas formas clássica e microforma, sem alterações de cariótipo. Interessantemente, neste trabalho, novos *loci* subteloméricos foram encontrados (1p, 5q, 8p, 17q, 18q, 22q e Xq), ressaltando a importância de sua análise (BENDAVID et al., 2007).

Recentemente, pesquisadores indianos publicaram um estudo em que foi analisada a utilidade clínica da técnica de MLPA na identificação da etiologia da deficiência intelectual idiopática. No estudo, Boggula et al. (2014) utilizaram diferentes kits de MLPA na busca por explicações etiológicas: P070 e P036 para análise de regiões subteloméricas, P245-A2 para microdeleções e microduplicações comuns e P106 para cromossomos X. Dentre os 203 indivíduos analisados, 19 (9,35%) apresentaram alterações subteloméricas, incluindo deleções de 1p36.33, 4p, 5p, 9p, regiões teloméricas 13q e duplicações em 9pter. Estes defendem que os kits utilizados apresentam bom rendimento e diagnóstico e, apesar da MLPA não poder analisar todo o genoma – como técnicas de microarranjos – devido sua facilidade de execução, e sendo menos onerosa, é uma importante ferramenta para avaliação de casos de deficiência intelectual (BOGGULA et al., 2014).

Com relação aos resultados encontrados no presente trabalho, um importante aspecto a ser evidenciado é o fato de o grupo amostral ser pequeno, demonstrando ser um fator limitante para o estudo, através de teste binomial ($p=0,28$). Dessa forma, presumivelmente, esperou-se que fosse encontrada pouca ou nenhuma alteração subtelomérica. No estudo de Bendavid et al (2007), supracitado, foi necessária uma amostra composta por 181 indivíduos para que fossem encontradas 8 alterações subteloméricas, possivelmente relacionadas ao fenótipo descrito.

Os resultados apresentados neste trabalho não revelaram alterações genéticas nas regiões subteloméricas de interesse, como deleções e/ou duplicações, muito provavelmente

devido ao pequeno universo amostral (25 indivíduos). Ressalta-se que os mesmos já foram analisados por meio de outras metodologias, como sequenciamento por Sanger e MLPA de regiões não subteloméricas (kit P187), reforçando ainda mais que a origem da HPE é determinada por múltiplos fatores.

O fato dos pacientes da amostra apresentarem fenótipo correspondente à HPE, mas sem alterações nos genes já descritos, sugere a existência de fatores etiológicos adicionais, como genéticos ou ambientais, no surgimento desta patologia. O presente estudo foi realizado com pacientes brasileiros, oriundos das mais diversas regiões do país, já que o HRAC-USP é um centro de referência nacional no tratamento de anomalias craniofaciais. Portanto, em nossa amostra há uma grande heterogeneidade étnica implicada. Assim, alterações gênicas podem estar contidas em outras regiões cromossômicas importantes que possam contribuir para o aparecimento da doença, mas ainda desconhecidas para a patogênese da HPE. De fato, Ribeiro et al. (2012) encontraram alterações polimórficas, como expansão de histidina, em uma coorte brasileira de HPE, demonstrando considerável diferença na frequência alélica entre diferentes grupos étnicos, provavelmente resultado da miscigenação.

No que tange a exposição a fatores ambientais, é sabido que diversas situações maternas, como diabetes gestacional, alcoolismo e exposição a patógenos, são causas do aparecimento de HPE (SWATEK, 2013). Além disso, hábitos e estilos de vida maternos também devem ser levados em consideração, já que estes também podem resultar em alterações cromossômicas no feto, culminando no aparecimento da doença. Dentre estes, tem sido demonstrado que o uso materno de anticonvulsivantes; presença de diabetes mellitus insulino-dependente; a realização de dietas restritivas, com aporte calórico reduzido visando perda de peso; além de situações de pobreza e consumo excessivo de álcool durante a gestação são fatores predisponentes ao surgimento do fenótipo de HPE (CROEN et al., 1996; COHEN, 2006).

Devido ao fato da literatura conter poucos relatos acerca do uso da técnica de MLPA em HPE e, sobretudo, de alterações subteloméricas relacionadas ao aparecimento da doença, o presente trabalho contribui no sentido de demonstrar que microarranjo subtelomérico não é um fator comum na etiologia da HPE. Evidentemente, há de ser considerado o pequeno tamanho da amostra, que demonstrou ser um fator limitante. De qualquer forma, era esperada pelo menos uma alteração subtelomérica, se levarmos em consideração uma média de 5% de alterações encontradas nos trabalhos analisados. Outro fator a ser observado é o fenótipo preponderante da amostra, constituído pela microforma da HPE, em 84% dos casos. Apesar da dificuldade em se estabelecer correlação entre genótipo e fenótipo na HPE, é possível que os microarranjos subteloméricos estejam mais associados aos fenótipos clássicos da HPE do que às microformas.

Finalmente, na medida em que forem descobertas outras alterações no genoma, juntamente com fatores ambientais que possam também estar associados ao fenótipo da doença, conforme sugerido pela hipótese dos múltiplos fatores, seja possível a realização de um diagnóstico diferencial, que possa explicar o amplo espectro fenotípico observado nesta doença, além de oferecer aconselhamento genético adequado para os pacientes e familiares.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- O número relativamente pequeno de pacientes analisados neste trabalho pode ter impedido a observação de alterações subteloméricas em pacientes com diagnóstico de HPE;
- Novos estudos, com um maior número de pacientes, são necessários para que as conclusões sejam definitivas quanto à relação entre regiões subteloméricas e HPE;
- Não há, até o momento, um critério único e adequado para a investigação de rotina da etiologia de HPE, já que esta envolve múltiplos fatores, genéticos e ambientais, muitos destes ainda desconhecidos;
- A técnica de MLPA é um método rápido, sensível e relativamente de baixo custo para nossa realidade. Esta demonstrou confiabilidade, oferecendo uma excelente alternativa para a investigação de microarranjos, como deleções e duplicações, pois permitiu a análise concomitante de múltiplas regiões.
- Devido ao fato de que nenhum microarranjo foi detectado nas regiões analisadas, não é possível inferir a presença de novos *loci* ou genes que pudessem ser associados à HPE.

Perspectivas futuras para a elucidação dos fatores etiológicos envolvidos na patogênese de HPE incluem a seleção de um conjunto de genes candidatos, baseada em vias e redes de sinalização, em que poderá ser criado o “holoprosencefaloma”, ou “HPEome”, de forma que, através do uso um chip contendo aproximadamente 800 genes, seja realizada uma nova estratégia de mapeamento genômico, o Next Generation Sequencing, ou sequenciamento de segunda geração, de forma a serem identificados novos genes associados à doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA MS. Rearranjos subteloméricos em doentes com atraso mental idiopático. Mestrado, Faculdade de Ciências da **Universidade de Lisboa – DQB**. 2009.
- BANO S, CHAUDHARY V, YADAV S. Congenital malformations of the brain, **Neuroimaging: Clinical Applications**. 2012. Disponível em: http://cdn.intechopen.com/pdfs/31404/InTech-Congenital_malformation_of_the_brain.pdf.
- BELLONI E, MUENKE M, ROESSLER E et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. **Nature Genetics**. 1996;(14):353-56.
- BENDAVID C, DUBOURG C, GICQUEL I et al. Molecular evaluation of foetuses with holoprosencephaly shows high incidence of microdeletions in the HPE genes. **Human Genetics**. 2006a; 119(1-2):1–8.
- BENDAVID C, DUBOURG C, PASQUIER L et al. MLPA screening reveals novel subtelomeric rearrangements in holoprosencephaly. **Human Mutation**. 2007;28(12):1189–1197.
- BENDAVID C, DUPÉ V, ROCHARD L, GICQUAL I, DUBOURG C, DAVID V. Holoprosencephaly: an update on cytogenetic abnormalities. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):86-92.
- BENDAVID C, HADDAD BR, GRIFFIN A et al. Multicolour FISH and quantitative PCR can detect submicroscopic deletions in holoprosencephaly patients with a normal karyotype. **Journal of Medical Genetics**. 2006b;43(6):496–500.

- BENDAVID C, ROCHARD L, DUBOURG C, SEGUIN J, GICQUAL I, PASQUIER L et al. Array-CGH analysis indicates a high prevalence of genomic rearrangements in holoprosencephaly: an update map of candidate loci. **Human Mutation**. 2009;30(8):1175-1182.
- BLASCO MA, GASSER SM, LINGNER J. Telomeres and telomerase. **Genes & Development**. 1999; 13:2353–2359.
- BOGGULA VR, SHUKLA A, DANDA S et al. Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: a study in 203 Indian patients. **Indian J Med Res**. 2014;139(1):66-75.
- BROWN J, SARACOGLU K, UHRIG S, SPEICHER MR, EILS R, KEARNEY L. Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). **Nature Medicine**. 2001;7(4):497–501.
- BROWN SA, WARBURTON D, BROWN LY et al. Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. **Nature Genetics**. 1998;20(2):180-183.
- CARPENTER D, STONE DM, BRUSH J, RYAN A, ARMANINI M, FRANTZ G, ROSENTHAL A, DE SAUVAGE FJ. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1998;95(23):13630-4.
- CHAI Y, JIANG X, BRINGAS P et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. **Development**. 2000;127(8):1671-9.

- CHIANG C, LITINGTUNG Y, LEE E et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog gene function. **Nature**. 1996;383:407-413.
- COHEN MMJR. Holoprosencephaly: clinical, anatomic and molecular dimensions. **Birth Defects Research (Part A)**. 2006;76:658-673.
- COHEN MMJR. Perspectives on holoprosencephaly: Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. **Teratology**. 1989;40:211-235.
- COHEN MMJR. Problems in the Definition of Holoprosencephaly. **Am. J. of Medical Genetics**. 2001;103:183-187.
- COHEN MMJR. **The Child with Multiple Birth Defects**. 2nd Edition. **Oxford Monographs on Medical Genetics**. New York – Oxford, Oxford University Press. 1997;31.
- COHEN MMJR. The hedgehog signaling network. **Am J Med Genet A**. 123A:5-28. Review. Erratum in: **Am J Med Genet**. 2003;124A: 439-40.
- CORDERO DR, BRUGMANN S, CHU Y, BAJPAI R, JAME M, HELMS JA. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. **Am J Med Genet A**. 2011;155A(2):270-9.
- CROEN LA, SHAW GM, LAMMER EJ. Holoprosencephaly: epidemiologic and clinical characteristics of a California population. **American Journal of Medical Genetics**. 1996;64:465-472.
- DAKUBO GD, WANG YP, MAZEROLLE C, CAMPSALL K, MCMAHON AP, WALLACE VA. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. **Development**. 2003;130:2967-80.

D'ANGELO CS. Pesquisa dos mecanismos de rearranjos cromossômicos subteloméricos na monossomia 1p36, expansão do espectro da variabilidade fenotípica e comportamental, diagnósticos diferenciais e caracterização de uma região crítica para a obesidade. Tese de doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

DEMEYER W, ZEMAN W, PALMER CG. The face predicts the brain: Diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arhinencephaly). **Pediatrics**. 1964;34:256-263.

DUBOURG C. Holoprosencephaly. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. 2007;2:8.

FEUERBACH F, GALY V, TRELLES-STICKEN E et al. Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. **Nature Cell Biology**. 2002;4:214–221.

FLINT J, KNIGHT S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. **Current Opinion in Genetics & Development**. 2003;13:310-316.

GeneMANIA.org. Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research. **University of Toronto**. 2014. Disponível em: < <http://genemania.org/> >

GOODRICH LV, MILENKOVIC L, HIGGINS KM, SCOTT MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. **Science**. 1997;277(5329):1109-13.

GOODRICH LV, SCOTT MP. Hedgehog and patched in neural development and disease. **Neuron**. 1998;21(6): 1243-57.

- GRINDLEY JC, BELLSCI S, PERKINS D et al. Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. **Dev Biol.** 1997;188(2):337-48.
- GRIPP KW, WOTTON D, EDWARDS MC et al. Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. **Nature Genetics.** 2000;25:205-208.
- HEDLUNG G. Congenital frontonasal masses: developmental anatomy, malformations and MR imaging. **Pediatr Radiol.** 2006;36(7):647-662.
- HENNEKAM RC, BIESECKER LG, ALLANSON JE, HALL JG, OPITZ JM, TEMPLE IK, CAREY JC. Elements of Morphology: General terms for congenital anomalies. **Am J Med Genet Part A.** 2013;161(A):2726-2733.
- HENNEKAM RCM, CORMIER-DAIRE V, HALL JG, MÉHES K, PATTON M, STEVENSON RE. Elements of morphology: Standard terminology for the nose and philtrum. **Am J Med Genet A.** 2009;149A(1):61-76.
- HOGERVORST FB, NEDERLOF PM, GILLE JJ et al. Large genomic deletions and duplications in the *BRCA1* gene identified by a novel quantitative method. **Cancer Research.** 2003;63(7):1449–53.
- JAVAD H, AL-YARUBI S, CHACHO AP et al. Semilobar holoprosencephaly with neurogenic hypernatraemia: two new cases. **SQU Medical Journal.** 2013;13(3):463-66.
- JOHNSON CY, RASMUSSEN SA. Non-genetic risk factors for holoprosencephaly. **American Journal of Medical Genetics Part C.** 2010;154:73–85.

- JOHNSON RL, SCOTT MP. Hedgehog signaling: New players and perplexities join the pathway. **Curr Opin Genet Devel.** 1998;8:450-456.
- KALDERON D. Transducing the hedgehog signal. **Cell.** 2000;103(3):371-4.
- KAMNASARAM D, CHEN CP, DEVRIENDT K, MEHTA L, COX DW. Defining a holoprosencephaly locus on human chromosome 14q13 and characterization of potential candidate genes. **Genomics.** 2005;85:608-621.
- KNIGHT SJL, FLINT J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. **Journal of Medical Genetics.** 2000;37:401–409.
- KONIALIS C, SAVOLA S, KARAPANOU S, MARKAKI A, KARABELA M, POLYCHRONUPOULOU S et al. Routine application of a novel MLPA-based first-line screening test uncovers clinically relevant copy number aberrations in haematological malignancies undetectable by conventional cytogenetics. **Hematology.** 2014;19(4):217-24.
- KOOLEN DA, NILLESEN WM, VERSTEEG MHA et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). **Journal of Medical Genetics.** 2004;41:892–899.
- LAI K, ROBERTSON MJ, SCHAFFER DV. The sonic hedgehog signaling system as a bistable genetic switch. **Biophys J.** 2004;86:2748-57.
- LEDBETTER DH. Minireview: Cryptic translocations and telomere integrity. **Am J Hum Genet.** 1992;51:451-456.

- LIPINSKI RJ, SONG C, SULIK KK, EVERSON JL, GIPP JJ, YAN D, BUSHMAN W, ROWLAND IJ. Cleft lip and palate results from hedgehog signaling antagonism in the mouse: phenotypic characterization and clinical implications. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**. 2010;88(4):232-240.
- LOWE LH, BOOTH TN, JOGLAR JM, ROLLINS NK. Midface anomalies in children. **Radiographics**. 2000;20:907-22.
- MARAZITA ML, MOONEY MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. **Clinics in Plastic Surgery**. 2004;31:125-40.
- MARTI E, BOVOLENTA P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. **Trends Neuroscience**. 2002;25:89-96.
- MARTINS MP. Regiões subteloméricas dos cromossomas: os finais (quase) perfeitos. Programa de Mestrado em Epidemiologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. 2010.
- MATSUNAGA E, SHIOTA K. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. **Teratology**. 1977;16:261-72.
- MAZZOLA HK. Congenital malformations in the frontonasal area: their pathogenesis and classification. **Clinics in Plastic Surgery**. 1976;3:573-609.
- MCMAHON AP. More surprises in the Hedgehog signaling pathway. **Cell**. 2000;100(2):185-8.
- MEDINA A, PIÑEROS L, ARTEAGA C, VELASCO H, IZQUIERDO A, GIRALDO A, ESPINOSA E. Multiplex ligation-dependent probe amplification to subtelomeric

rearrangements in idiopathic intellectual disability in Colombia. **Pediatr Neurol.** 2014;50(3):250-4.

MEFFORD HC, TRASK BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. **Nature Genetics.** 2002;3:91-102.

MERCIER S, DUBOURG C, GARCELON N, CAMPILLO-GIMENEZ B, GICQUEL L, BELLEQUIC M et al. New findings for phenotype-genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. **J Med Genet.** 2011;48(11):752-60.

MERRITT L. Understanding the embryology and genetics of cleft lip and palate. **Advances in Neonatal Care.** 2005;5:64-71.

MING JE, MUENKE M. Holoprosencephaly: from Homer to Hedgehog. **Clinical Genetics.** 1998;53:155-163.

MING JE, MUENKE M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. **American Journal of Human Genetics.** 2002;71:1017-32.

MOORE KL, PERSAUD TVN. **Embriologia básica.** Editora **Guanabara Koogan**, 5ª edição. 2000.

MOORE KL & PERSAUD TVN. **Embriologia Clínica.** 8a ed. Rio de Janeiro: **Elsevier.** 2008.

MRC-HOLLAND. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®): Copy number quantification & methylation detection. Disponível em: <www.mlpa.com> Acesso em: 05 Set. 2013.

- MUENKE M, GURRIERI F, BAY C, YI DH, COLLINS AL, JOHNSON VP et al. Linkage of a human brain malformation, familial holoprosencephaly, to chromosome 7 and evidence for genetic heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. 1994;91:8102-6.
- MUSTACCHI Z & PERES S. Genética baseada em evidências: síndromes e heranças. São Paulo: CID Editora LTDA. 2000.
- NANNI L, MING JE, BOCIAN M et al. The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in Holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. **Hum Mol Genetics**. 1999;8(13):2479-2488.
- NORMAN M. Congenital malformations of the brain: pathological, embryological, clinical, radiological and genetic aspects. **Oxford University Press**. 1995;187-221.
- PALOMARES M, DELICADO A, LAPUNZINA P et al. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. **Clin Genet**. 2006;69:228-233.
- PAN A, CHANG L, NGUYEN A, JAMES AW. A review of hedgehog signaling in cranial bone development. **Front Physiol**. 2013;4(61).
- PETEK E, KROISEL PM, WAGNER K. Isolation of a 370 kb YAC fragment spanning a translocation breakpoint at 3p14.1 associated with holoprosencephaly. **Clin Genet**. 1998;54:406-12.
- RIBEIRO LA, ROESSLER E, HU P, PINEDA-ALVAREZ et al. Comparison of mutation findings in *ZIC2* between microform and classical holoprosencephaly in a Brazilian cohort. **Birth Defects Research (part A): Clinical and Molecular Teratology**. 2012;94(11):912-917.

- RICCOMAGNO MM, MARTINU L, MULHEISEN M, WU DK, EPSTEIN DJ. Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. **Genes Dev.** 2002;15:2365-78.
- RICCHIERI-COSTA A, RIBEIRO LA. Phenotypic variability, associated findings and the changing phenotype in holoprosencephaly (HPE) due to *SHH*, *SIX3* and *TGIF* mutations: a short summary. **Am J Hum Genet.** 2005.
- RICCHIERI-COSTA A, RIBEIRO LA. Holoprosencephaly-like phenotype: Clinical and genetics perspectives. **American Journal of Medical Genetics, Part A.** 2006a;140:2587-2593.
- RICCHIERI-COSTA A, RIBEIRO LA. PTCH mutations in four Brazilian patients with holoprosencephaly and one with holoprosencephaly-like features and normal MRI. **American Journal of Medical Genetics, Part A.** 2006b;140:2584-2586.
- ROACH E, DEMYER W, CONNEALLY PM, PALMER C, MERRITT AD. Holoprosencephaly: birth data, genetic and demographic analyses of 30 families. **Birth Defects Orig Artic Ser.** 1975;11:294-313.
- ROESSLER E, DU YZ, MULLOR JL et al. Loss-of-function mutations in the human *GLI2* gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2003;11:13424-9.
- ROESSLER E, MUENKE M. Holoprosencephaly: A paradigm for the complex genetics of brain development. **Journal Inheritance of Metabolism Diseases.** 1998;21:481–497.
- ROESSLER E, MUENKE M. Midline and laterality defects: left and right meet in the middle. **Bioessays.** 2001;23:888-900.

- ROESSLER E, MUENKE M. The molecular genetics of holoprosencephaly. **American Journal of Medical Genetics**, Part C. 2010;154:52–61.
- ROOMS L, REYNIERS E, VAN LUIJK R et al. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). **Human Mutation**. 2004;23(1):17-21.
- RYAN KE, CHIANG C. Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. **J Biol Chem**. 2012;287(22):17905-13.
- SACCONE S, DE SARIO A, DELLA VG, BERNARDI G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1992;89:4913-4917.
- SALES CBS. Expressão de componentes da via de sinalização *Sonic hedgehog* (HHL,PTCH1 e SHH) e VEGF-A em carcinoma escamocelular: associação com imunomarcagem de VEGF-A e microdensidade vascular. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, 2012.
- SANTIAGO G. Holoprosencefalia: Clínica e Linguagem. Dissertação para a obtenção do título de Mestre, HRAC/USP, Bauru-SP, 2006.
- SAVASTANO CP, BERNARDI P, SEUÁNEZ HN, MOREIRA MA, ORIOLI IM. Rare nasal cleft in a patient with holoprosencephaly due to a mutation in a *ZIC2* gene. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**. 2014a;100(4):300-6.
- SAVASTANO CP, EL-JAICK KB, COSTA-LIMA MA, ABATH CM, BIANCA S, CAVALCANTI DP et al. Molecular analysis of holoprosencephaly in South America. **Genet Mol Biol**. 2014b;37:250-62.

- SCHIMMENTI LA, DE LA CRUZ J, LEWIS RA, KARKERA JD, MANLIGAS GS, ROESSLER E, MUENKE M. Novel mutation in sonic hedgehog in non-syndromic colobomatous microphthalmia. **Am J Med Genet A**. 2003;30:215-21.
- SCHOUTEN JP, McELGUNN CJ, WAAIJER R, ZWIJNENBURG D, DIEPVENS F, PALS G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Research**. 2002;30(12):e57.
- SHAFFER LG, BEJJANI BA, TORCHIA B et al. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. **Am J Med Genet C: Seminars in Medical Genetics**. 2007;145C(4):335-345.
- SLATER HR, BRUNO DL, REN H et al. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). **J Med Genet**. 2003;40:907-12.
- SOLOMON BD, MERCIER S, VÉLEZ JI et al. Analysis of genotype-phenotype correlations in human holoprosencephaly. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**. 2010;154C(1):133-41.
- SOM PM, NAIDICH TP. Illustrated review of the embryology and development of the facial region, part 1: Early face and lateral nasal cavities. **AJNR Am J Neuroradiol**. 2013;34(12):2233-40
- SØRENSEN KM, ANDERSEN PS, LARSEN LA, SCHWARTZ M, SCHOUTEN JP, NYGREN AO. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. **Anal Chem**. 2008;80(23):9363-8.

- STASHINKO EE, CLEGG NJ, KAMMANN HA, SWEET VT, DELGADO MR, HAHN JS, LEVEY EB. A retrospective survey of perinatal risk factors of 104 living children with holoprosencephaly. **Am J Med Genet A**. 2004;128:114-9.
- SWATEK J, SZUMILO J, BURDAN F. Alobar holoprosencephaly with cyclopia – Autopsy-based observations from one medical center. **Reprod Toxicol**. 2013;41:80-5.
- WALLIS DE, ROESSLER E, HEHR U et al. Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. **Nature Genetics**. 1999;22:196-198.
- WETMORE C. Sonic Hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animals models. **Curr Opin Genet Dev**. 2003;13(1):34-42.

Anexo 1

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP relativo à aprovação do presente projeto de pesquisa, intitulado ‘Análise por MLPA das regiões subteloméricas de pacientes com Holoprosencefalia’.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise por MLPA das regiões subteloméricas de pacientes com Holoprosencefalia

Pesquisador: Vivian Tragante do Ó

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15311813.2.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 375.234

Data da Relatoria: 27/08/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de dissertação de Mestrado, no qual a pesquisadora pretende determinar a causa genética de indivíduos com diagnóstico clínico de holoprosencefalia (HPE), até agora, sem etiologia definida. Importante ressaltar que esse projeto faz parte de um estudo anterior (Fapesp Proc nº 06/60973-9; Ofício nº 289/2006 SVAPEPE-CEP), para o qual foram coletados 2ml de sangue para extração do DNA. O presente estudo contemplará 30 amostras de DNA desses indivíduos, as quais serão submetidas à análise molecular, por meio da técnica de MLPA, no Laboratório de Genética Molecular do HRAC-USP, que conta com toda infra-estrutura e equipamentos necessários.

O projeto estava sob pendência para correções e adequações do mesmo.

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho tem por objetivo geral, identificar microdeleções/duplicações nas regiões subteloméricas que possam estar relacionadas com a patogênese da HPE, através da técnica de MLPA e, como objetivos específicos, identificar novas etiologias para a HPE de causa desconhecida; identificar novos genes responsáveis pela HPE e fazer correlação genótipo/fenótipo dos casos envolvidos no estudo.

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA **CEP:** 17.012-900

UF: SP **Município:** BAURUR

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: usp_projeto@centrinho.usp.br

Continuação do Parecer: 375.234

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo as autoras, no presente projeto não será realizada coleta de material biológico ou qualquer tipo de intervenção invasiva. Sendo assim, uma vez realizados a partir das normas preconizadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisas em Seres Humanos, obedecendo às normas de biossegurança e guardando o sigilo ético, pode-se afirmar que os riscos são próximos de zero.

Quanto aos benefícios, as autoras mencionam que os resultados advindos do projeto em questão poderão trazer a população-alvo o benefício verificado em projetos de pesquisa na área de genética molecular básica, como a descoberta de genes candidatos a etiologia da doença; desta forma, ensejam bases mais sólidas para um aconselhamento genético mais eficaz.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo que contribuirá com a ampliação dos conhecimentos sobre a etiologia da holoprosencefalia, bem como com o aconselhamento genético adequado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os anexos referentes à "Análise Crítica dos Riscos e Benefícios" e "Critérios para Suspender ou Encerrar a Pesquisa" foram revistos e ajustados ao trabalho proposto, conforme solicitado por este CEP.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme os questionamentos deste CEP, as autoras mencionam que a hipótese do estudo é trazer uma melhor compreensão acerca das bases moleculares envolvidas na HPE. Realizaram modificações na metodologia proposta, incluindo a forma com que os sujeitos participantes serão informados acerca de sua possível participação no presente projeto. As autoras optaram pela diminuição da amostra de 50 para 30 para melhor adequação ao tempo restante da pesquisa. Fizeram esclarecimentos de que a etapa experimental poderá ser realizada no período de um mês e, portanto, com tempo hábil para a coleta dos termos de consentimento e a realização de experimentos e análise dos resultados obtidos, garantindo que a defesa seja realizada dentro do período proposto. E, finalmente, quanto ao questionamento deste CEP sobre a semelhança deste projeto com outro anterior, as autoras esclarecem que "[...] existem diversos kits comerciais para a técnica de MLPA disponíveis no mercado, cada um direcionado para uma região específica do DNA. Ocorre que, no projeto anterior [...] foi utilizado outro kit também para análise de regiões subteloméricas e, desta forma, os títulos de ambos os projetos são semelhantes. Sendo assim,

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
 Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP: 17.012-900
 UF: SP Município: BAURU
 Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: usp_projeto@centrinho.usp.br

Continuação do Parecer: 375.234

este projeto visa analisar regiões subteloméricas diferentes das estudadas no projeto anterior. Desta maneira, resultados obtidos nesta pesquisa serão associados aos dados já obtidos em outros projetos, permitindo que tenhamos uma expansão da análise da região de Interesse, possibilitando um maior esclarecimento acerca da etiologia envolvida na HPE".

Considerando que as autoras esclareceram todas as pendências, sugiro a este CEP, parecer "aprovado".

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acatou o parecer do relator em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 466/12 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Ressaltamos que, conforme a Resolução CNS 466/12, o pesquisador é responsável por "desenvolver o projeto conforme delineado" e por informar ao CEP as emendas, ou seja, "todos os fatos relevantes que alterem o curso normal dos estudos por ele aprovados e, especificamente, nas pesquisas na área da saúde, dos efeitos adversos e da superioridade significativa de uma intervenção sobre outra ou outras comparativas" (alterações que envolva métodos, critérios éticos, mudança de pesquisadores/entrevistadores e instrumental), tais emendas devem ser entregues na Seção de Apoio à Pesquisa do SVAPEPE, bem como anexadas na Plataforma Brasil. O CEP avaliará e emitirá o parecer das emendas.

O pesquisador também fica responsável pela entrega dos relatórios semestrais e final, bem como notificá-los pela Plataforma Brasil.

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

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
 Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP: 17.012-900
 UF: SP Município: BAURUR
 Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: uep_projeto@centrinho.usp.br

<p>HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS DA USP</p>	<p>HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS DA USP</p>
---	--	---

Continuação do Parecer: 375.234

BAURU, 28 de Agosto de 2013

Assinador por:
Marcia Ribeiro Gomide
(Coordenador)

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20			
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA	CEP: 17.012-900		
UF: SP	Município: BAURU		
Telefone: (14)3235-8421	Fax: (14)3234-7818	E-mail: usp_projeto@centrinho.usp.br	

Anexo 2

O ofício (Nº 289/2006) apresentado a seguir é relativo à aprovação do projeto “Análise mutacional dos genes SHH, TGIF, SIX3, ZIC2, PTCH e GLI2 nas anomalias craniofaciais e alterações do desenvolvimento do sistema nervoso central.” (Fapesp Proc Nº 06/60973-9) pelo SVAPEPE-CEP.

Ofício nº 289/2006-SVAPEPE-CEP

Bauru, 31 de outubro de 2006.

Prezado(a) Senhor(a)

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado “*Análise mutacional nos genes SHH, TGIF, SIX3, ZIC2, PTCH e GLI2 nas anomalias craniofaciais e alterações do desenvolvimento do sistema nervoso central.*”, de autoria de V.Sª, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 25/10/2006 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes para início da pesquisa. Solicitamos a V.Sª a gentileza de anexar o presente ofício ao projeto, pois o mesmo será necessário para futura publicação do trabalho.

A pesquisadora fica responsável pela entrega no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão 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

PROF. DR. ALCEU SERGIO TRINDADE JUNIOR

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

Ilmo(a) Sr(a)

Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

Genética - HRAC/USP

Rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru SP Brasil
Caixa Postal 1501 - CEP 17.012-900
Tel. 55 14 3235 8421 Fax: 55 14 3234 7818
E-mail: anag@usp.br

Anexo 3

O ofício (Nº 111/2011) apresentado a seguir é relativo à aprovação do projeto “Análise genética em indivíduos com Holoprosencefalia através das técnicas de MLPA e arrayCGH.”.

Ofício nº 111/2011-SVAPEPE-CEP

Bauru, 27 de abril de 2011

Prezado(a) Senhor(a)

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado “**Análise genética em indivíduos com holoprosencefalia através das técnicas de MLPA e arrayCGH**”, de autoria de **BRUNO FAULIN GAMBA** desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de **26 de abril de 2011**, o parecer do relator **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes para início da pesquisa. Solicitamos a V.Sa. a gentileza de comunicar o parecer ao(a) pesquisador(a).

O(A) pesquisador(a) 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 do trabalho.

Atenciosamente,

 PROFA. DRA. MÁRCIA RIBEIRO GOMIDE
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

Ilmo(a). Sr(a).

DRA. LUCILENE ARILHO RIBEIRO BICUDO
 Genética – HRAC/USP

Rua Sílvio Marchioni, 3-20 Bauru - SP - Brasil
 Caixa Postal 1501 CEP 17.012-900
 Tel. 55 14 3235 8421
 E-mail: cep@caerfhrac.usp.br

Anexo 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido elaborado para a pesquisa atual:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TITULO DO ESTUDO: ANÁLISE POR MLPA DAS REGIÕES SUBTEMOLÉRICAS DE PACIENTES COM HOLOPROSENCEFALIA

NOME DO PESQUISADOR: VIVIAN TRAGANTE DO Ó

NOME DA RESPONSÁVEL: DRA. LUCILENE ARILHO RIBEIRO BICUDO

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: "Análise por MLPA das regiões subteloméricas de pacientes com Holoprosencefalia" realizada por: Vivian Tragante do Ó, RG 43.467.272-5, sob orientação da Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo, nº do Conselho: CRM 4400, que tem como objetivo investigar a ocorrência de alterações genéticas recentemente associadas à holoprosencefalia em pacientes cuja malformação não tem causa genética determinada até o momento. Para tal serão utilizadas as amostras de DNA já coletadas e armazenadas no banco de DNA do Laboratório de Genética Molecular do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC/USP - Bauru).

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. 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 desta 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 e que a participação não é obrigatória.

"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, **poderá**, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e **deixar de participar desta pesquisa** e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 20 do Código de Ética de Biologia).

Por estarem de acordo, assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa ou
Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

* CAMPO A SER PREENCHIDO PELO REPRESENTANTE LEGAL DO MENOR OU INCAPAZ.

Nome do Pesquisador Responsável: Vivian Tragante do Ó

Endereço Institucional (Rua, Nº): Rua Silvio Marchione, 3-20. Vila Universitária

Cidade: Bauru

Estado: São Paulo

CEP: 17012-900

Telefone: (14) 3235-8412

E-mail: vivian.o@usp.br