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

ANA LAÍS BIGNOTTO DA ROCHA

**Sequenciamento direto dos genes *SIX3*, *SHH*, *TGIF1*, *ZIC2* e
array-CGH no estudo de pacientes com holoprosencefalia**

**BAURU
2013**

ANA LAÍS BIGNOTTO DA ROCHA

**Sequenciamento direto dos genes *SIX3*, *SHH*, *TGIF1*, *ZIC2* e
array-CGH no estudo de pacientes com holoprosencefalia**

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

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e
Anomalias Relacionadas
Orientadora: Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

**BAURU
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

Rua Silvio Marchione, 3-20

Caixa Postal: 1501

17012-900 - Bauru – SP – Brasil

Telefone: (14) 3235-8000

Prof. Dr. João Grandino Rodas – Reitor da USP

Dra. Regina Célia Bortoleto Amantini – Superintendente do HRAC /USP

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

Ana Laís Bignotto da Rocha

Bauru, ____ de _____ de _____.

Rocha, Ana Laís Bignotto da

R582s Sequenciamento direto dos genes *SIX3*, *SHH*,
TGIF1, *ZIC2* e array-CGH no estudo de pacientes com
holoprosencefalia / Ana Laís Bignotto da Rocha. Bauru,
2013.

122p.; il.; 30cm.

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

Orientadora: Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

1. Sequenciamento Direto. 2. CGH-array. 3.
Holoprosencefalia.

CDD 573.21

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Laís Bignotto da Rocha

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação. Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo - Orientadora

Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - USP

Profa. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP

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

DEDICATÓRIA

Ao meu companheiro **Fernando**.

À minha irmã **Narauédn**.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo** pela oportunidade de aprender tanto sobre a genética molecular, pela orientação e o apoio.

À **Mestre Rosana Maria Candido de Souza Sandri** pela paciência e pela amizade.

Aos funcionários do laboratório de Citogenética por todo o carinho com que sempre me trataram, o chefe **Mestre Rubens Matias Rodrigues**, a **Dra. Tânia Yoshico Kamiya**, e as queridas funcionárias **Tereza Cristina Marquez da Silva** e **Cibele Nazaré Alves Pereira Pires**.

A todos que fizeram parte da equipe do laboratório de Genética Molecular **Ingrid Yoshico Kamiya**, **Mestre Ana Luisa Camolezi Gaspar**, **Mestre Chiara Legnaro**, **Dr. Rodrigo Quezi**, **Mestre Bruno Gamba**, **Caroline Bessao**, **Mestre Juliana Marino**.

Às funcionárias do setor de Genética Clínica que me receberam com muita atenção **Dra. Nancy Mizue Kokitsu Nakata**, **Dra. Rosely Maria Zechi Ceide** e **Dra. Siulan Vendramini Pitoli**.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação **Andréia Cristina da Silva**, **Rogério da Silveira** e **Maria José Bento Lopes** por toda a paciência e carinho.

A todos os funcionários do **Setor de Documentação**.

Aos funcionários da Unidade de Ensino e Pesquisa, especialmente a **Rose Meire Aparecida Gimenes Botelho**, **Rafael Mattos de Deus**, **Denise Aparecida Giacheti Gillio** e **Ricardo Pimentel Nogueira**.

Às amigas que estiveram ao meu lado durante todo o mestrado **Juliana Mercado**, **Cíntia Dalastti**, **Priscila Padilha Moura** e **Daniele Vera Cruz**.

Às minhas caras amigas que mesmo de longe puderam me dar tanto apoio **Carla Lopes**, **Tamíris de Paula Borges** e **Melina Beraldo**.

E aos amigos **Mestre Frederico Godoy** e **Mestre Guilherme Salomão**.

À **Julia Del Mando Lucchesi** e a **Jaime Santos Lucchesi** por todo o apoio que sempre me deram.

Aos meus avós **Linês Poletto Bignotto** e **Hermes Bignotto** por todo apoio e amor que sempre me dedicaram.

Aos meus pais, **Ana Maria Bignotto da Rocha** e **Luiz Frederico Barbosa da Rocha** por sempre me incentivarem na carreira acadêmica.

Ao **Fernando Del Mando Lucchesi** meu companheiro, sem o qual esta dissertação não seria possível.

“Não é o bastante ver que um jardim é bonito sem ter que acreditar também que há fadas escondidas nele?”

Douglas Adams

RESUMO

Rocha ALB da. Sequenciamento direto dos genes *SIX3*, *SHH*, *TGIF1*, *ZIC2* e array-CGH no estudo de pacientes com holoprosencefalia [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2013.

Objetivos: Analisar por meio da técnica de sequenciamento direto a presença de alterações moleculares nos genes *SHH*, *SIX3*, *ZIC2* e *TGIF1* em indivíduos com diagnóstico clínico de HPE. Analisar por meio da técnica de CGH-array a presença de alterações moleculares em indivíduos com diagnóstico clínico de HPE previamente submetidos à análise por sequenciamento direto. **Local:** Laboratório de Genética e Citogenética Humana HRAC/USP, Bauru-SP. **Casuística e metodologia:** Foram selecionados 50 indivíduos, de ambos os sexos com idades entre 03 meses a 50 anos com diagnóstico clínico para HPE. Todos foram analisados por meio da técnica de sequenciamento direto para os genes *SHH* e *TGIF1* completamente e para os genes *ZIC2* e *SIX3* parcialmente. Dentre os indivíduos que não apresentaram alterações na técnica de sequenciamento oito indivíduos com fenótipo mais grave foram selecionados para a análise por CGH-array. **Resultados e discussão:** Foram analisados 50 indivíduos por meio da técnica de sequenciamento direto dos genes *SHH* e *TGIF1*, foram encontradas duas variantes patogênicas na análise do gene *SHH*, no caso 1 a variante p.24G>P foi identificada, e no caso 2 foi identificada a variante c.1031del C. No gene *TGIF1* foram encontrados cinco polimorfismos já descritos na literatura. Foi identificada uma nova variante silenciosa no éxon 1 do gene *ZIC2* p.Q46Q (c. 431 G>A) e um polimorfismo já descrito na literatura em dois indivíduos no gene *SIX3*. A análise por CGH-array revelou a presença de uma microdeleção no caso 37, de 1,5Mb no cromossomo 17p12 entre as posições genômicas 14,052,279-15,102,307. A mesma deleção foi encontrada na mãe, sendo que esta região nunca foi associada a HPE. **Conclusão:** A técnica de sequenciamento direto é uma ferramenta muito importante no diagnóstico molecular da HPE, a padronização do sequenciamento direto para os genes *ZIC2* e *SIX3* poderá auxiliar em diagnósticos mais precisos em estudos futuros dentro do HRAC/USP. O emprego de novas técnicas como CGH-array pode indicar novas relações entre regiões cromossômicas e os múltiplos fatores envolvidos na formação da HPE.

Descritores: Sequenciamento Direto. CGH-array. Holoprosencefalia.

ABSTRACT

Rocha ALB da. Direct sequencing of the genes *SIX3*, *SHH*, *TGIF1*, *ZIC2* and array-CGH on the study of patients with holoprosencephaly [dissertation]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2013.

Objective: Analyze through direct sequencing technique the presence of molecular changes on the genes *SHH*, *SIX3*, *ZIC2* and *TGIF1* on individuals with clinical diagnosis of HPE. Analyze through array-CGH technique the presence of molecular changes on individuals with clinical diagnosis of HPE previously submitted to the direct sequencing analyzes. **Local:** Genetics and Human Cytogenetics Laboratory, HRAC/USP, Bauru-SP. **Methods:** Were selected 50 individuals from both genders with ages between 03 months and 50 years clinically diagnosed with HPE. Everyone was analyzed through the direct sequencing technique for the genes *SHH* and *TGIF1* completely and for the genes *ZIC2* and *SIX3* partially. From those individuals which did not have shown changes on the direct sequencing technique, eight individuals with more severe phenotype were selected to the analysis through array-CGH. **Results an Discussion:** Were analyzed 50 individuals through the technique of direct sequencing of the genes *SHH* and *TGIF1*, were found two pathogenic variants in the analysis of *SHH* gene, in the case 1, the variant p.G24P was identified, and in the case 2 was identified the variant c.1031delC. On the *TGIF1* gene were found five polymorphisms already described on the literature. Was identified a new silent variant on the exon 1 of the *ZIC2* gene p. Q46Q(c.431G>A) and a polymorphism already described in the literature in two individuals on the gene *SIX3*. The analysis through array-CGH revealed the presence of one microdeletion in the case 37, of 1,5 Mb on the region 17p12 between the genomic positions 14,052,279-15,102,307. The same deletion was detected in the mother, though this region was never associated to the HPE. **Conclusion:** The direct sequencing technique is a very important tool for the molecular diagnosis of the HPE, and the direct sequencing standardization for the genes *ZIC2* and *SIX3* might help in more precise diagnostics on HRAC/USP future studies. The employ of new techniques such as array-CGH may indicate new relations between chromosomal regions and the multiple hit involved in the development of HPE.

Keywords: Direct sequencing. Array-CGH. Holoprosencephaly.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 -	Aspectos anatômicos faciais e cerebrais da holoprosencefalia (HPE)	38
Figura 2 -	Aspectos faciais de indivíduos com holoprosencefalia like (HPE-like).....	41
Figura 3 -	Modelo esquemático do gene <i>SHH</i>	45
Figura 4 -	Modelo esquemático do gene <i>SIX3</i>	46
Figura 5 -	Modelo esquemático do gene <i>TGIF1</i>	48
Figura 6 -	Modelo esquemático do gene <i>ZIC2</i>	49
Figura 7 -	Reações de sequenciamento comparadas	52
Figura 8 -	Técnica de Hibridização Genômica Comparativa em Array (CGH-array)	56
Figura 9 -	Heredograma do indivíduo 1	78
Figura 10 -	Variante missense detectada no gene <i>SHH</i> do caso 1 e em sua mãe, na posição c.137A>C	79
Figura 11 -	Análise da variante p.24G>P por meio do software PolyPhen	80
Figura 12 -	Heredograma do caso 2.....	81
Figura 13 -	Variante frameshift detectada no gene <i>SHH</i> no caso 2.....	82
Figura 14 -	Nenhuma variante detectada no pai do caso 2	82
Figura 15 -	Variante silenciosa c. 431 G>A (p. Q46 Q)	84
Figura 16 -	Polimorfismo rs2229333.....	85
Figura 17 -	Polimorfismo rs2229335.....	85
Figura 18 -	Polimorfismo rs229336.....	86
Figura 19 -	Polimorfismo rs76540437.....	86
Figura 20 -	Polimorfismo rs13829273.....	86

Figura 21 -	Polimorfismo rs182881	87
Figura 22 -	Heredograma do caso 37	92
Figura 23 -	Resultado da análise de CGH-array do caso 37.....	92

- QUADROS

Quadro 1 -	Classificação anatômica dos diferentes tipos de HPE e suas manifestações.....	39
Quadro 2 -	Oligonucleotídeos	68

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Indivíduos da casuística, fenótipos e variantes encontradas na análise por sequenciamento direto	89
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l	Microlitro(s)
μ M	Micromolar
5' à região codificante	Posição anterior à região codificante, relativo a posição do início da sequência
Bmp	Proteína da via de desenvolvimento dos vertebrados
CGH array	<u>C</u> omparative <u>G</u> enomic <u>H</u> ybridization array ((Hibridização Genômica Comparativa em array)
CGH	<u>C</u> omparative <u>G</u> enomic <u>H</u> ybridization (Hibridização Genômica Comparativa)
Cy3-dCTP	Corante fluorescente de cianina com ligação deoxicitosina trifosfato
Cy5-dCTP	Corante fluorescente de cianina com ligação deoxicitosina trifosfato
ddATP	Dideoxiadenosina Trifosfato
ddCTP	Dideoxycitidine Trifosfato
ddGTP	Dideoxiguanosina Trifosfato
ddNTPs	Dideoxynucleotide
ddTTP	Dideoxithymine Trifosfato
de novo	<i>Variante genética não herdada</i>
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTPs	Deoxirribonucleotide
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
FITC	Fluoresceína isothiocyanato avidina verde fluorescente
G	Gravidade(s)

Gandhi	Banco de informações dos pacientes HRAC/USP
Hh	Proteínas da família Hedgehog
HPE 2	Locus 2 da HPE
HPE 3	Locus 3 da HPE
HPE 4	Locus 4 da HPE
HPE 5	Locus 5 da HPE
HPE	Holoprosencefalia
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
Kb	Kilobase(s)
Kda	Kilodaltons
Mb	Megabase(s)
Mers	Determinado(s) número(s) de subunidade(s), um número na frente do sufixo mer significa um determinado número de subunidades quando aplicado ao DNA, especifica o número de bases na molécula
MIHV	<u>M</u> iddle <u>i</u> nter <u>h</u> emispheric <u>v</u> ariant (Variante inter-hemisférica média)
ml	Mililitro(s)
ng	Nanograma(s)
Nodal	Proteína da via de desenvolvimento dos vertebrados
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
pb	Pare(s) de base(s)
PCR	<u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Reação de Cadeia da Polimerase)
pmol	Picomol(es)
SHH	Gene Sonic Hedgehog em humanos
Shh	Gene Sonic Hedgehog em vertebrados

Shh	Proteínas da família Sonic Hedgehog
SHH-C	Proteína Sonic hedgehog com produto c-terminal
SHH-N	Proteína Sonic hedgehog com produto n-terminal
SIX3	Gene Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 3 em humanos
Six3	Gene Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 3 em vertebrados
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Single Nucleotide Polimorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)
Taq DNA polimerase	Enzima de replicação da cadeia da polimerase retirada do organismo <i>Thermus aquaticus</i>
TGIF1	Gene <i>Transforming Growth Factor-Beta-Induced Factor 1</i>
TRITC	Rhodamia antidigoxigenina vermelho-fluorescente
U	Unidade(s)
USP	Universidade de São Paulo
Wnt	Proteína da via de desenvolvimento dos vertebrados
X	Cromossomo sexual feminino
ZIC2	Gene <i>Zinc Finger Protein of Cerebellum 2</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
2.1	HOLOPROSENCEFALIA	34
2.1.1	Sinais clínicos.....	37
2.1.2	<i>Sonic Hedgehog (SHH)</i>	42
2.1.3	<i>Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 3 (SIX3)</i>	45
2.1.4	<i>Transforming Growth Factor-Beta-Induced Factor 1 (TGIF1)</i>	47
2.1.5	<i>Zinc Finger Protein Of Cerebellum 2 (ZIC2)</i>	48
2.2	TÉCNICAS DE ANÁLISE MOLECULAR	49
2.2.1	Técnica de sequenciamento direto	50
2.2.2	Técnica de Hibridização Genômica Comparativa em Array (CGH-array).....	53
3	OBJETIVOS	57
4	INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA	61
4.1	CASUÍSTICA	64
4.1.2	Critérios de inclusão	64
4.2	ANÁLISE MOLECULAR	65
4.2.1	Coleta de sangue e extração de DNA genômico.....	65
4.2.2	Extração de DNA.....	65
4.2.3	Quantificação, diluição e armazenamento das amostras	66
4.2.4	Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação gênica.....	67
4.2.5	Purificação enzimática	69
4.2.6	Sequenciamento direto	69

4.2.7	Leitura das sequências obtidas	70
4.2.8	Análise das sequências obtidas	70
4.3	TÉCNICA DE CGH-array	71
4.3.1	Análise de CGH-array	74
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>SHH</i>	77
5.2	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>ZIC2</i>	84
5.3	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>TGIF1</i>	85
5.4	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>SIX3</i>	87
5.5	CGH-array	91
6	CONCLUSÃO	97
7	REFERÊNCIAS	101
	ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Holoprosencefalia (HPE) (HPE; OMIM#236100) (Johns Hopkins University 2013e) foi o termo proposto por DeMyer, Zeman e Palmer (1963) ao raro fenótipo sequencial de malformações cerebrais e faciais que resultam da divisão incompleta do prosencéfalo durante a divisão embrionária (DeMyer, Zeman e Palmer 1963 e Coleta, Siminel e Gheonea 2011).

A HPE é a anomalia estrutural mais comum do prosencéfalo humano (Dubourg et al 2007 e Marcorelles e Laquerriere 2010) e ocorre devido à falhas ou encurtamento da linha média de clivagem do cérebro em desenvolvimento durante a terceira e quarta semanas de gestação (Lacbawan et al 2009).

A HPE apresenta incidência de 1:250 afetados durante a embriogênese, mas devido a letalidade intrauterina a frequência de nascidos vivos diminui variando de 1:8.000 a 1:16.000 (Leoncini et al 2008, Lacbawan et al 2009, Chabchoub et al 2012 e Gekas, Sergi e Kamnasaran 2012).

A etiologia da HPE é multifatorial, incluindo fatores ambientais, síndromes que incluem a sequência da HPE, anomalias cromossômicas estruturais e mutações heterozigotas em mais de 13 loci diferentes. As alterações genéticas podem ser herdadas ou *de novo* (Cohen Junior 2006, Hahn e Barnes 2010, Kauvar e Muenke 2010, Roessler e Muenke 2010, Solomon et al 2010b e Mercier et al 2011).

Os genes caracterizados como os principais candidatos para HPE são *Sonic Hedgehog* (*SHH*, OMIM*600725, 7q36, HPE3) (Johns Hopkins University 2013m) (Belloni et al 1996, Dubourg et al 2004 e Solomon et al 2010b), *Zinc Finger Protein Of Cerebellum 2* (*ZIC2*, OMIM*603073, 13q32, HPE5) (Johns Hopkins University 2013j) (Brown et al 1998, Brown et al 2001 e Solomon et al 2010b), *Sine Oculis*

*Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 3 (SIX3, OMIM*603714, 2p21, HPE2)* (Johns Hopkins University 2013k) (Wallis et al 1999, Gripp et al 2000 e Lacbawn et al 2009) e *Transforming Growth Factor-Beta-Induced Factor 1 (TGIF1, OMIM*602330, 18p11.3, HPE4)* (Johns Hopkins University 2013g) (Gripp et al 2000 e Aguilera et al 2003) (Lacbawan et al 2009, Paulussen et al 2010 e Roessler e Muenke 2010).

O desenvolvimento de pesquisas sobre a etiologia da HPE por meio de técnicas moleculares tem contribuído no estudo e descobertas que evidenciam suas causas e formas de manifestação (Lacbawan et al 2009, Solomon et al 2010b e Mercier et al 2011).

A análise mutacional dos genes candidatos, por meio de sequenciamento direto, em indivíduos com diagnóstico clínico de HPE é responsável por identificar a causa genética de aproximadamente 25% dos casos familiar ou *de novo* (Dubourg et al 2004, Lazaro et al 2004 e Paulussen et al 2010).

A técnica de Hibridização Genômica Comparativa em array (CGH-array) tem sido utilizada para definir novas regiões candidatas de genes putativos responsáveis por doenças genéticas (Bejjani e Shaffer 2006).

A influência dos genes *SHH*, *SIX3*, *ZIC2*, *TGIF1*, no desenvolvimento da HPE ainda não está completamente delineada. O estudo desses genes por meio de sequenciamento direto pode auxiliar na identificação de variantes envolvidas na etiopatogenia. A investigação por CGH-array pode levar a identificação de novos loci candidatos para a HPE. Portanto, os resultados obtidos destas análises complementam o conhecimento e a compreensão dos genes e fatores envolvidos na HPE e auxiliam no aconselhamento genético adequado para as famílias dos indivíduos afetados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O desenvolvimento craniofacial normal dos vertebrados é um evento complexo e dinâmico envolvendo múltiplos estágios, tendo início na formação da crista neural, necessária à formação do sistema nervoso central. Alterações na regulação do processo de desenvolvimento craniofacial, causadas por fatores genéticos e/ou ambientais, podem resultar em diferentes tipos de anomalias craniofaciais (Francis-West et al 1998, Wilkie e Morris-Kay 2001, Jiang, Bush e Lidral 2006, Nie, Luukko e Kettunen 2006 e Richtsmeier e Flaherty 2013).

Tais anomalias incluem, principalmente, alterações estruturais de sistema nervoso central (Wallingford et al 2013), defeitos de fechamento dos ossos do crânio (Richtsmeier e Flaherty 2013), defeitos de linha média craniofacial com hipotelorismo ocular, defeitos de linha média craniofacial com hipertelorismo ocular, alterações do processo frontonasal (Bendavid et al 2009 e Solomon et al 2012b), fissuras orofaciais típicas e atípicas e alterações de primeiro e segundo arcos faríngeos (Gorlin, Cohen e Hennekam 2001, Wilkie e Morris-Kay 2001 e Hahn e Barnes 2010).

Ao longo dos anos, os resultados de estudos morfológicos de embriões em modelos animais (mutantes naturais ou modificados pela ação de teratógenos e de genes) e de estudos clínicos, citogenéticos (identificação de loci candidatos) e moleculares (estudos de ligação e sequenciamento direto) das anomalias craniofaciais humanas, permitiram compreender alguns eventos do complexo desenvolvimento craniofacial e identificar genes que regulam o desenvolvimento craniofacial normal incluindo aqueles que codificam fatores de transcrição e de crescimento, receptores de fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras (Francis-West et al 1998, Cobourne 2000, Wilkie e Morris-Kay 2001, Cohen 2002,

Jiang, Bush e Lidral 2006, Nie, Luukko e Kettunen 2006, Ciurea e Toader 2009 e Passos-Bueno, Ornelas e Fanganielo 2009).

2.1 HOLOPROSENCEFALIA

“HPE” foi o termo proposto por DeMyer, Zeman e Palmer (1963) para definir o desenvolvimento patológico dos componentes do prosencéfalo, telencéfalo e diencéfalo desencadeado por falha no desenvolvimento, crescimento ou segmentação da linha média anterior do prosencéfalo embrionário (Ming e Muenke 1998 e Solomon et al 2012a).

A holoprosencefalia (HPE) é o defeito congênito cerebral mais comum do ser humano (Nussbaum, McInnes e Willard 2008) e tem incidência de 1:250 durante a embriogênese, mas devido a letalidade intrauterina a frequência de nascidos vivos varia de 1:8000 a 1:16.000 (Leoncini et al 2008, Nussbaum, McInnes e Willard 2008, Lacbawan et al 2009, Chabchoub et al 2012 e Gekas, Sergi e Kamnasaran 2012).

A etiologia da HPE é multifatorial, incluindo distúrbios cromossômicos e monogênicos, fatores ambientais como diabetes materno, exposição ao citomegalovírus, uso de álcool durante a gestação e possivelmente exposição materna a agentes redutores de colesterol (estatinas). Ocorre tanto isoladamente quanto como uma característica da várias síndromes, como a síndrome de Smith-Lemli-Opitz (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

A HPE não-sindrômica familiar, quando herdada, é predominantemente autossômica dominante, embora a herança autossômica recessiva e herança ligada ao X tenham sido relatadas. Aproximadamente 25% a 50% de toda HPE é associada a uma anomalia cromossômica; a distribuição não-aleatória dessas

anomalias prevê pelo menos 13 loci diferentes de HPE, incluindo 7q36, 13q32, 2p21, 18p11.3 e 21q22.3. A presença e localização destes loci foi delimitada por meio de estudos sistemáticos de indivíduos com HPE que apresentavam alterações citogenéticas significativas que resultaram na perda ou ganho de regiões cromossômicas críticas (Noronha et al 2001, Cohen Junior 2006, Nussbaum, McInnes e Willard 2008, Lacbawn et al 2009, Hahn e Barnes 2010, Kauvar e Muenke 2010, Roessler e Muenke 2010, Solomon et al 2010b e Mercier et al 2011).

As cromossomopatias que em geral incluem a sequência da HPE são a trissomia do 13 e a trissomia do 18. Outras associações foram encontradas como defeitos de formação do tubo neural, displasia frontonasal e síndrome da deleção 22q11 (Cohen Junior 2006). Entre os indivíduos com HPE com cariótipo normal, 63% têm a HPE alobar, 28% a semilobar e 9% a lobar. Outras malformações comumente associadas ao sistema nervoso central incluem tálamos não divididos, disgenesia do corpo caloso, bulbos olfativos hipoplásicos, bulbos e vias ópticas hipoplásicos e disgenesia hipofisária (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Em indivíduos com HPE que apresentam cariótipo normal, a estratégia diagnóstica inicial básica é realizar a análise mutacional dos genes: *SIX3* (OMIM*603714; HPE2) (Johns Hopkins University 2013b), *SHH* (OMIM*600725; HPE3) (Johns Hopkins University 2013c), *TGIF1* (OMIM*602330; HPE4) (Johns Hopkins University 2013d) *ZIC2* (OMIM*603073; HPE5) (Johns Hopkins University 2013e). Esses genes constituem os quatro candidatos de maior envolvimento na HPE e são responsáveis por explicar aproximadamente 25% dos casos genéticos incluindo deleções e microdeleções (Dubourg et al 2007 e Solomon, Gropman e Muenke 2011).

A implicação dessas regiões foi relacionada a mutações de ponto específicas ou deleções nos genes: *Sonic Hedgehog*, (*SHH*, 3 éxons, 9,4 Kb de DNA genômico em 7q36, aproximadamente 155 Mb do telômero p; HPE3) (Belloni et al 1996, Dubourg et al 2004, Solomon et al 2010b e MRC-Holland 2013), *Zinc Finger Protein Of Cerebellum 2* (*ZIC2*, 3 éxons, 5 Kb de DNA genômico em 13q32, aproximadamente 101Mb do telômero p; HPE5) (Brown et al 1998, 2001, Solomon et al 2010b e MRC-Holland 2013), *Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 3* (*SIX3*, 2 éxons, 4,2 Kb de DNA genômico em 2p21, aproximadamente 45Mb do telômero p; HPE2) (Wallis et al 1999, Gripp et al 2000, Lacbawn et al 2009 e MRC-Holland 2013) e *Transforming Growth Factor-Beta-Induced Factor 1*(*TGIF1*, 9 éxons, 6,8 Kb de DNA genômico em 18p11.3, aproximadamente 3 Mb do telômero p; HPE4) (Gripp et al 2000, Aguilera et al 2003 e MRC-Holland 2013). Mutações nesses genes podem ser *de novo* ou encontradas segregando em diversos membros de uma mesma família (Solomon, Gropman e Muenke 2011).

Em famílias nas quais mutações de ponto ocorrem nestes genes, a HPE parece ser de herança autossômica dominante. No entanto, famílias nas quais a HPE segrega associada a mutações de ponto, foi encontrada penetrância completa e incompleta e expressividade variável sugerindo a influência de fatores adicionais, de origem ambiental ou genética aliada a haploinsuficiência (Roessler et al 2003, Lacbawn et al 2009 e Solomon et al 2009).

Segundo este modelo que leva em conta múltiplos fatores, uma mutação relacionada a um gene associado à HPE é necessária, mas não suficiente para causar o fenótipo, outros fatores devem estar atrelados à mutação tais como outras mutações ou fatores ambientais (Ming e Muenke 2002, Lacbawn et al 2009 e Solomon et al 2009).

Embora tenham sido relatadas HPE autossômica recessiva e ligada ao X, a maior parte das famílias com um modo de herança estabelecido exibe herança autossômica dominante. A penetrância dessa forma da HPE é de aproximadamente 70% (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

2.1.1 Sinais clínicos

O fenótipo da HPE isolada é bastante variável abrangendo uma gama contínua de manifestações, desde indivíduos com fenótipos severos, envolvendo graves anomalias do cérebro e face até indivíduos clinicamente normais (Cohen 1989, Dubourg et al 2004 e Hahn e Barnes 2010).

As malformações prosencefálicas da HPE seguem um espectro de gravidade, mas são geralmente subdivididas em: HPE alobar (sem evidências de uma fissura inter-hemisférica) Figura 1 (a, b), HPE semilobar (apenas fissura inter-hemisférica posterior) Figura 1 (c, d), HPE lobar (separação ventricular e separação cortical quase completa) Figura 1 (e, f) e variante inter-hemisférica média (MIHV) (falha da separação dos lobos frontal e parietal posterior) Figura 1 (g, h) (Dubourg et al 2007, Nussbaum, McInnes e Willard 2008 e Hahn e Barnes 2010).

Fonte: Modificado de Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Mercier S, Raam MS, Odent S, Muenke M. Holoprosencephaly flashcards: A summary for the clinician. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2010b Feb 15; 154C(1):3-7.

Figura 1 - Aspectos anatômicos faciais e cerebrais da holoprosencefalia (HPE).

A classificação anatômica dos quatro tipos de HPE está descrita no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação anatômica dos diferentes tipos de HPE e suas manifestações.

HPE Alobar Figura 1 (b)	Presença de um único e pequeno ventrículo procencéfalo Ausência de divisão inter-hemisférica Ausência dos bulbos olfatórios ou de suas vias Ausência de corpo caloso Não separação dos núcleos cinzentos profundos
HPE semi Lobar Figura 1 (d)	Lóbulos cerebrais rudimentares Divisão inter-hemisférica incompleta Ausência ou hipoplasia dos bulbos olfatórios ou de suas vias Ausência de corpo caloso Variação da separação dos núcleos cinzentos profundos
HPE Lobar Figura 1 (f)	Lóbulo cerebral totalmente desenvolvido Distinta divisão inter-hemisférica Linha média do neocórtex frontal contínua Corpo caloso ausente, hipoplásico ou normal Separação dos núcleos cinzentos profundos
MIHV (Variante Inter-Hemisférica Média) Figura 1 (h)	Falha da separação dos lobos frontal e parietal posterior "Callosal genu" e esplênio normalmente formados Ausência de corpo caloso Hipotálamo e núcleos lentiformes normalmente separados Massa cinzenta heterotópica

Fonte: Modificada de Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. Orphanet. J Rare Dis. 2007; 2(2):8.

O fenótipo sequencial do dismorfismo facial na HPE se estende de ciclopia a normal, e geralmente reflete a gravidade das malformações do sistema nervoso central. Sinais indicativos da HPE incluem microcefalia ou macrocefalia, anoftalmia ou microftalmia, hipotelorismo ou hipertelorismo, nariz dismórfico, anomalias palatinas, úvula bífida, incisivo central único e ausência de frênulo labial superior (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

O atraso no desenvolvimento ocorre em quase todos os indivíduos com HPE e a gravidade do atraso correlaciona-se com a gravidade da malformação do sistema nervoso central, o que significa que indivíduos com uma imagem cerebral normal geralmente têm uma inteligência normal. Além do atraso no desenvolvimento, os indivíduos muitas vezes têm convulsões, disfunção do tronco cerebral e sono desregulado. Ocasionalmente, entretanto, os achados clínicos são muito brandos ou sutis, tais como um único incisivo central ou ausência parcial do corpo caloso (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Foi descrito um fenótipo mais leve e distinto dentro da holoprosencefalia denominado HPE-like. Os indivíduos apresentam fáceis características da HPE acompanhada de sistema nervoso central íntegro ou com pequenos desvios da normalidade (Ribeiro, Murray e Richieri-Costa 2006). Os principais macro/microsinais dentro deste fenótipo heterogêneo incluem: diminuição do perímetro craniano, agenesia ou hipoplasia da espinha nasal anterior, ausência ou diminuição do ângulo frontonasal, hipotelorismo, anomalias oculares diversas, maxila hipoplásica, asas nasais hipoplásicas, ausência de ponte nasal, estenose da abertura nasal, filtro hipodesenvolvido, incisivo central único, fissura labiopalatina mediana ou falsa mediana e má oclusão (Figura 2) (Ribeiro, Murray e Richieri-Costa 2006 e Richieri-Costa e Ribeiro 2006).

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

Figura 2 - Aspectos faciais de indivíduos com holoprosencefalia like (HPE-like).

Entre os indivíduos com HPE sem anomalias cromossômicas, a sobrevivência varia inversamente com a gravidade do fenótipo facial. Os indivíduos com ciclopia ou etmocefalia geralmente sobrevivem uma semana; aproximadamente 50% dos indivíduos com HPE alobar morrem antes dos 4 a 5 meses de idade e 80% antes de um ano (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Etiologicamente, a HPE é extremamente heterogênea, e o risco de recorrência na família depende da causa subjacente. Mães diabéticas têm 1% de risco de ter um filho com HPE. Para pais de um indivíduo com anomalia citogenética,

o risco de recorrência depende de um deles ter a anomalia citogenética que originou a anomalia no indivíduo. Para indivíduos com HPE sindrômica, o risco de recorrência depende do risco de recorrência para aquela síndrome. Na falta de uma história familiar de HPE ou de uma causa citogenética ou sindrômica para HPE, os pais e irmãos devem ser examinados atentamente quanto as microformas, traços sutis associados com a HPE tais como a ausência do frênulo ou um incisivo central único. Para pais com uma história familiar negativa, nenhuma causa identificável de HPE e sem microformas sugestivas de HPE autossômica dominante, o risco de recorrência empírica é de aproximadamente 4% a 5%. Em alguns casos, a herança disgênica pode explicar a penetrância reduzida de algumas mutações no gene *SHH* (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Como tem sido observada uma expressividade variável nos membros da mesma família, ela não pode ser recorrente de mutações diferentes e deve, ao contrário, refletir a ação dos genes modificadores em outros loci, ou casualidade, ou ambos (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

2.1.2 *Sonic Hedgehog (SHH)*

O *SHH*, o primeiro gene identificado com mutações que causam HPE, está mapeado em 7q36 (OMIM*600725, HPE3) (Johns Hopkins University 2013m), possui uma estrutura genômica simples que inclui três éxons e codifica um polipeptídeo de 462 aminoácidos (Muenke et al 1994, Nussbaum, McInnes e Willard 2008 e HUGO Gene Nomenclature Committee 2013).

Nos vertebrados, durante a embriogênese, transcritos do gene *SHH* são encontrados na notocorda, na placa neural ventral, lateralmente e na região

dorsoventral dos embriões. O *SHH* é expresso na zona de atividade de polarização dos primórdios de membros e da formação dos elementos distais dos membros. Os transcritos do *SHH* também são expressos na glândula pituitária, no desenvolvimento dos olhos, na formação do sistema olfatório, no desenvolvimento dental, das vísceras, do coração, dos pulmões, da próstata, e da regulação da musculatura lisa (Ingham e McMahon 2001, Cohen Junior 2003, McMahon, Ingham e Tabin 2003, Varjosalo e Taipale 2008 e Cohen Junior 2010).

Nos humanos, a secreção da proteína Sonic hedgehog (Shh) pelo notocórdio e pela placa do assoalho neural em desenvolvimento resulta em um gradiente que induz e organiza os diferentes tipos de células e tecidos no cérebro e medula espinhal em desenvolvimento. A proteína Shh é também produzida por um pequeno grupo de células no broto do membro para criar o que é conhecido como zona de atividade polarizadora, que é responsável pelo padrão assimétrico dos dedos entre os membros individuais (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

As mutações que inativam o gene *SHH* nos humanos causam defeitos congênitos que podem ser herdados como características autossômicas dominantes, que demonstram uma redução de 50% na expressão gênica, suficiente para produzir um fenótipo anormal, supostamente alterando a magnitude do gradiente da proteína Shh (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

A shh é uma proteína sinalizadora secretada necessária para o padrão de desenvolvimento nos mamíferos e insetos (Nussbaum, McInnes e Willard 2008). A proteína Hh é sintetizada como uma molécula precursora que passa por clivagem de um peptídeo sinalizador e então por clivagem proteolítica. Essa reação seria mediada pelo colesterol, levando a um produto N-terminal de 19 Kda (SHH-N) com um domínio sinalizador e um produto C-terminal de 25 Kda (SHH-C) (Wallis e

Muenke 2000 e Cohen 2010), o qual possui um domínio de clivagem altamente associado com a atividade da colesterol transferase (Porter, Young e Beachy 1996, Porter et al 1996 e Varjosalo e Taipale 2008).

Defeitos do desenvolvimento embrionário podem ser produtos do processamento anormal do *SHH*, devido à ausência de colesterol ou ao acúmulo de precursores de biosíntese. Baseado nessa evidência é possível que o nível de colesterol materno durante a embriogênese possa ser um dos fatores ambientais que contribuam para o fenótipo variável da HPE (Porter et al 1996 e Varjosalo e Taipale 2008).

A síntese e o processamento do ligante Hh, sua liberação, transporte por tecidos e mecanismos de sinalização, transdução e recepção celular tem sido estudado extensivamente. Entretanto muitos aspectos da sinalização de Hh permanecem incompletamente compreendidos (Varjosalo e Taipale 2008).

As mutações no *SHH* em humanos são mutações de perda de função. Algumas das anomalias citogenéticas que afetam a expressão do *SHH* são translocações que ocorrem 15 a 256 Kb em posição 5' à região codificante do *SHH*. Estas translocações são chamadas mutações de efeito de posição porque não mutam a sequência codificante, mas interrompem elementos regulatórios distantes ou a estrutura da cromatina, ou ambos, e desse modo alteram a expressão do *SHH* (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Ao longo dos anos, muitas mutações heterozigotas no gene *SHH* foram identificadas em indivíduos com HPE. Tais mutações incluem as mutações de perda de função, de término de cadeia e de erro de leitura (Roessler et al 1996, Nanni et al 1999, Roessler et al 1997, Solomon et al 2010b e Mercier et al 2011).

Fonte: National Center for Biotechnology Information. Homo sapiens sonic hedgehog (SHH), RefSeqGene on chromosome 7 NCBI Reference Sequence: NG_007504.1 [homepage in the internet]. 2013. [cited 2013 May 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/172044658?report=graph>

Nota: A figura ilustra o tamanho aproximado do gene em quilobases (K) representado em verde, o mRNA não processado (azul), a pré-proteína (vermelho) e os éxons (preto). A distância entre os éxons corresponde à região intrônica.

Figura 3 - Modelo esquemático do gene *SHH*.

As mutações no *SHH* respondem por aproximadamente 30% a 40% da HPE não-sindrômica autossômica dominante familiar, mas por menos de 5% da HPE não-sindrômica no geral (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

2.1.3 *Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 3 (SIX3)*

O gene *SIX3* (OMIM*603714, HPE2) (Johns Hopkins University 2013k) está localizado em 2p21-p16, região do locus HPE2 (Wallis et al 1999), é homólogo do gene “sine oculis” (*so*) da *Drosophila*, que codifica uma homeoproteína nuclear requerida para o desenvolvimento dos olhos (Oliver et al 1995 e Geng et al 2008), contém três éxons e ocupa 4.4 Kb do genoma. A proteína codificada é composta por 332 aminoácidos e contém um domínio SIX seguido por um homeobox (John Hopkins 2013).

O *SIX3* está implicado em 1,3% dos casos de HPE não-sindrômica autossômica dominante (Nussbaum, McInnes e Willard 2008). A mutação de ponto no *SIX3* é considerada como a terceira causa mais comum da HPE (Lazaro et al 2004 e Lacbawan et al 2009).

O gene “sine oculis” em drosófilas é expresso durante o desenvolvimento do sistema visual, os genes Six nos vertebrados codificam uma família de fatores de transcrição ortólogos aos das drosófilas sugerindo filogenia parcialmente conservada. Em vertebrados, o *Six3* tem grande envolvimento na formação da linha média, do prosencéfalo e dos olhos em diversos organismos incluindo camundongos, galinhas, rãs e peixe-zebra (Kobayashi et al 1998, Gestri et al 2005 e Lacbawn et al 2009).

Entre as propriedades biológicas conhecidas dos genes *Six3* em vertebrados estão inclusas, repressão da transcrição dos alvos *Shh*, *Bmp*, *Wnt* e *Nodal* (Inbal et al 2007, Kobayashi et al 2001, Lagutin et al 2003 e Lacbawn et al 2009).

Six3 também pode influenciar o destino da diferenciação celular ao invés da proliferação no período embrionário relativo ao prosencéfalo (Del Bene, Tessmar-Raible e Wittbrodt 2004 e Lacbawn et al 2009).

O fator de transcrição *Six3* por meio de distintos grupos de cofatores pode ativar a formação de lentes durante a formação ocular (Liu et al 2006).

SIX3 atua como um regulador direto da expressão da *Shh* do prosencéfalo ventral (Geng et al 2008, Jeong et al 2008 e Lacbawn 2009).

Fonte: National Center for Biotechnology Information. Homo sapiens SIX homeobox 3 (*SIX3*), RefSeqGene on chromosome 2 [homepage in the internet]. 2013 [cited 2013 May 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/281306740?report=graph>

Nota: A figura ilustra o tamanho aproximado do gene em quilobases (K) representado em verde, o mRNA não processado (azul), a pre-proteína (vermelho) e os éxons (preto) a distância entre os éxons corresponde à região intrônica.

Figura 4 - Modelo esquemático do gene *SIX3*.

2.1.4 Transforming Growth Factor-Beta-Induced Factor 1 (TGIF1)

TGIF1 (OMIM*602330, HPE4) (Johns Hopkins University 2013g) foi mapeado em 18p11.3, e apresenta 9 éxons em sua região cromossômica de aproximadamente 47.138 pares de bases, é um membro da superclasse TALE (three-amino acid loop extension) de homeodomínios atípicos, pois possuem a inserção de três aminoácidos entre as hélices 1 e 2 do homeodomínio. Mutações no *TGIF1* estão associadas à HPE4 (Overhauser et al 1995, Gripp et al 2000, Santos 2008 e Taniguchi et al 2012)

O gene *TGIF1* é um repressor transcricional do ácido retinóico. Estudos em humanos e camundongos foram realizados e implicaram as vias do ácido retinóico e do fator TGF β /Nodal na patogenia da HPE. O ácido retinóico contribui para a teratogênese do sistema nervoso central em humanos e em raros casos em HPE (Lammer et al 1985, Sulik et al 1995 e Taniguchi et al 2012). Entretanto mutações em genes associados à produção do ácido retinóico não foram encontrados em indivíduos com HPE. Foram encontradas mutações que possivelmente reduzem a produção da via TGF β /Nodal em indivíduos com HPE (De La Cruz et al 2002, Roessler et al 2008 e Taniguchi 2012).

Esse gene é responsável por 1,3% dos casos de HPE não-sindrômica autossômica dominante (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Fonte: National Center for Biotechnology Information. Homo sapiens TGFB-induced factor homeobox 1 (TGIF1), RefSeqGene on chromosome 18 NCBI Reference Sequence: NG_007447.1 [homepage in the internet]. 2013. [cited 2013 May 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/169790799?report=graph>

Nota: A figura ilustra o tamanho aproximado do gene em quilobases (K) representado em verde, o mRNA não processado (azul), a pre-proteína (vermelho) e os éxons (preto) a distância entre os éxons corresponde à região intrônica. O gene *TGIF1* apresenta alto polimorfismo.

Figura 5 - Modelo esquemático do gene *TGIF1*.

2.1.5 Zinc Finger Protein Of Cerebellum 2 (*ZIC2*)

O *ZIC2* (OMIM*603073; HPE5) (Johns Hopkins University 2013j) localizado em 13q32 foi o segundo gene no qual foram identificadas mutações relacionadas à HPE (Chabchoub et al 2012). Consiste de três éxons, ocupa aproximadamente quatro Kb e é responsável por codificar um fator de transcrição Zinc-finger, que desempenha diversos papéis no desenvolvimento neurológico (Aruga 2004 e Ribeiro et al 2012).

No início do desenvolvimento embrionário o papel de *ZIC2* parece estar relacionado ao estabelecimento axial da linha média (Warr et al 2008 e Ribeiro et al 2012), no entanto em estágios finais do desenvolvimento este gene parece ter maior efeito sobre o desenvolvimento do telencéfalo dorsal (Hébert e Fischell 2008 e Ribeiro et al 2012).

Mutações no *ZIC2* com recorrência familiar estão relacionadas à mosaicismo de linhagem germinativa que é observado mais frequentemente no *ZIC2* em comparação com outros genes (Solomon et al 2010a).

Achados clínicos e moleculares apontam para um fenótipo distinto em indivíduos com mutações relacionadas ao *ZIC2*, tal fenótipo inclui estreitamento bitemporal, fissuras palpebrais oblíquas para cima, encurtamento nasal, narinas antevertidas, filtro labial amplo e bem demarcado e orelhas grandes (Solomon et al 2010a e Chabchoub et al 2012).

O *ZIC2* é um dos genes implicados na HPE não-sindrômica autossômica dominante, respondendo por 5% dos casos (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Fonte: National Center for Biotechnology Information. Homo sapiens Zic family member 2 (*ZIC2*), RefSeqGene on chromosome 13 [homepage in the internet]. 2013. [cited 2013 May 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/163954919?report=graph>

Nota: A figura ilustra o tamanho aproximado do gene em quilobases (K) representado em verde, o mRNA não processado (azul), a pre-proteína (vermelho) e os éxons (preto) a distância entre os éxons corresponde à região intrônica.

Figura 6 - Modelo esquemático do gene *ZIC2*.

2.2 TÉCNICAS DE ANÁLISE MOLECULAR

Um dos principais objetivos da genética médica humana moderna é caracterizar as mutações que provocam as doenças genéticas, para compreender de que modo essas mutações afetam a saúde e utilizar essa informação para melhorar seu diagnóstico e tratamento. Os avanços da genética molecular levaram ao desenvolvimento de tecnologias que possibilitam uma análise detalhada de possíveis alterações, polimorfismos ou mutações, de genes e, as aplicações destas técnicas aumentou a compreensão dos fatores envolvidos em várias condições genéticas (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

2.2.1 Técnica de sequenciamento direto

Sequenciamento de DNA é uma técnica de biologia molecular que tem por finalidade determinar a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA (Carvalho, Ricci e Affonso 2010) e possui diversas aplicações, entre as quais a detecção de variantes de ponto potencialmente benignas ou patogênicas (Applied Biosystems 2009).

Mutação gênica de ponto é definida como uma mudança em um par de bases na sequência de nucleotídeos pertencentes a um gene. Tais mutações, também conhecidas como variantes patogênicas, podem surgir por meio de dois tipos de mecanismos, sendo esses, erros durante o processo de duplicação do DNA ou a partir da falha para reparar o DNA após lesão na estrutura (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Mutações de ponto podem levar a produção de proteínas sem sentido (non-sense) como erro de quadro de leitura (frameshift) que pode resultar em códon de terminação prematura. Mutação de sentido errado (missense), onde a proteína é elaborada com um aminoácido diferente e deleções e inserções de ponto podem levar ao erro de quadro de leitura (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

Polimorfismos de Nucleotídeos Individuais (SNPs) são variantes de ponto, ou seja, mutações de ponto sem efeito deletério direto. No entanto, SNPs são importantes marcadores do genoma humano e podem estar relacionados com susceptibilidade a doenças (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

A metodologia de Maxam e Gilbert (1977), conhecida como sequenciamento quimicamente induzido, se baseava na clivagem base-específica quimicamente induzida do DNA. O DNA alvo era marcado radioativamente e desnaturado para se tornar DNA de fita simples. Eram então realizadas quatro reações separadas para

cada fragmento. As bases eram clivadas respectivamente por dimetil sulfato onde havia guanina, ácido fórmico onde havia guanina junto com adenina, hidrazina onde havia citosina junto à timina e cinco moles por litro de cloreto de sódio onde havia citosina. Os elementos químicos modificavam as bases causando quebras no DNA. Separando os fragmentos por tamanho, por meio de eletroforese em gel, era possível conhecer a sequência comparando todas as reações com um marcador de peso molecular (Kim et al 2002).

O sequenciamento de Sanger (Sanger, Nicklen e Coulson 1977), ou sequenciamento enzimático, foi desenvolvido com base na síntese enzimática de uma fita única de DNA molde e terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos (ddNTPs). Havia a necessidade de fazer quatro reações, uma para cada nucleotídeo, ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP. Em cada reação havia concentrações de deoxynucleotídeos (dNTPs) com a terminação apresentando um grupo hidroxila livre, que daria continuidade à construção da fita, e ddNTPs sem o grupo hidroxila impedindo a continuidade da reação. O resultado da reação era visualizado através de um gel de acrilamida por meio de eletroforese das reações de cada nucleotídeo separadamente e comparadas com um marcador de peso molecular.

O isolamento e utilização da enzima Taq polimerase, auxiliou na otimização do processo de sequenciamento, pois a enzima Taq polimerase é termoestável, o que garante a sua integridade mesmo a temperaturas de até 95°C, reduzindo assim o tempo de extensão dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki et al 1987 e Sterky e Lundeborg 2000).

No processo de sequenciamento, a enzima Taq DNA polimerase incorporava ddNTPs com pouca eficiência, e gerava picos desiguais. A grande descoberta para o sequenciamento ocorreu quando foi demonstrado que certas

polimerases resistiam à reação contendo ddNTPs, devido a um grupo hidroxila de um aminoácido de um dos sítios ativos da enzima. A solução foi elaborar mutação por meio do sítio da polimerase da *Escherichia coli*, trocando a fenilalanina por uma tirosina. Mutantes da Taq DNA polimerase tiveram grande impacto na técnica de sequenciamento. A amplificação dos produtos de extensão durante a ciclagem do sequenciamento antes da descoberta da Taq polimerase, era necessária à manipulação a cada ciclo para a adição da polimerase que desnaturava sob temperaturas mais elevadas. Tal descoberta reduziu para três a quatro horas um processo que levava dias para ser executado (Sterky e Lundeborg 2000).

A automatização do sequenciamento de DNA utilizando primers ou terminadores de cadeia marcados com fluorescência, ou marcadores infravermelhos e diversos sistemas de detecção acoplados a softwares capazes de determinar a sequência, otimizou a velocidade, precisão e a confiabilidade do sequenciamento de DNA (Graham e Hill 2001, Applied Biosystems 2009 e Carvalho, Ricci e Affonso 2010).

Fonte: Adaptado de Applied Biosystems. DNA sequencing by capillary electrophoresis applied biosystems chemistry guide. 2nd ed. [homepage in the internet]. 2009. [cited 2013 Mar 3]. Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_041003.pdf

Nota: Comparação entre a reação do sequenciamento enzimático realizado por Sanger e a técnica atual utilizando fluorescência em uma única reação.

Figura 7 - Reações de sequenciamento comparadas.

O sequenciamento baseado em fluorescência é uma extensão e um refinamento da técnica de sequenciamento dideoxi de Sanger (Sanger, Nicklen e Coulson 1977). O sequenciamento automatizado de acordo com a Applied Biosystems® (Applied Biosystems 2009) apresenta o seguinte fluxo:

- a) Preparação de molde;
- b) Ciclos de sequenciamento;
- c) Precipitação pós-sequenciamento;
- d) Eletroforese capilar;
- e) Análise de dados.

Semelhante ao sequenciamento de Sanger (Sanger, Nicklen e Coulson 1977), o sequenciamento direto baseado em fluorescência requer amostra de DNA, primer de sequenciamento, uma polimerase termo estável, dNTPs, ddNTPs e tampão. Mas, diferente do método de Sanger (Sanger, Nicklen e Coulson 1977) que utilizava marcadores radioativos, o sequenciamento direto utiliza corantes fluorescentes para marcar os produtos de extensão. Produtos e componentes são combinados em uma reação que é sujeita à ciclos de anelamento, extensão e desnaturação em um termociclador. Ciclagem térmica das reações de sequenciamento cria e amplifica produtos de extensão os quais são terminados por um dos quatro ddNTPs. A proporção entre dNTPs e ddNTPs é otimizada para produzir uma proporção balanceada de produtos de extensão longos e curtos (Applied Biosystems 2009).

2.2.2 Técnica de Hibridização Genômica Comparativa em Array (CGH-array)

Kallioniemi et al (1992) desenvolveram uma técnica de Hibridização Genômica Comparativa Molecular (CGH), capaz de detectar e mapear sequências

de números de cópias de genes entre genomas de sensibilidade de até 10 Mb. Por meio desta técnica um cariótipo pode ser gerado, no qual é possível comparar o DNA de células patológicas e normais, nomeadas DNA referência, identificando regiões de ganho e perda de DNA por meio da captação de fluoróforos que se ligam por meio de sondas ao DNA alvo.

As diferenças de quantificações eram medidas entre tecidos normais e tecidos tumorais corados simultaneamente com quantidades iguais de fluoresceína isothiocyanato avidina verde fluorescente (FITC) e com rhodamia antidigoxigenina vermelho-fluorescente (TRITC). As quantidades relativas de DNA tumoral e DNA referência pode ser medida por meio da razão entre fluorescência verde (FITC)-vermelha (TRITC) emitida (Kallioniemi et al 1992).

O DNA referência servia como controle para variações locais no experimento e para hibridizar aos cromossomos alvo (Kallioniemi et al 1992).

Piper et al (1995) analisaram e descreveram o processamento de imagens da técnica de CGH e encontraram uma confiabilidade de 98% para duplicações de até 2Mb, entretanto, a técnica apresentou limitações em relação à sensibilidade para detecção de duplicações menores do que 2Mb.

No estudo de Solinas-Toldo et al (1997), o DNA foi fixado em uma placa de vidro – sendo esse DNA alvo de células normais corado com TRITC e DNA de células tumorais corado com FITC – sendo posteriormente visualizadas por meio de brometo de etídeo.

Solinas-Toldo et al (1997) sugeriram que a tecnologia de biochips aliada à técnica de CGH poderia ser aplicada à detecção de translocações genômicas relevantes a outras patologias utilizando grupos de genes alvo. Devido à especificidade alcançada, o estudo foi capaz de detectar com vetores de

cromossomos artificiais bacterianos de 75 kb a 130 Kb em contraste com outros estudos que demonstraram sensibilidades muito menores, tais como os estudos supracitados respectivamente até 2Mb (Piper et al 1995) e 10Mb (Kallioniemi et al 1992).

Levy et al (1998) aplicaram a técnica em metáfases para a distinção mais precisa de deleções/duplicações, utilizando a mesma técnica padronizada por Kallioniemi et al (1992), ressaltando a importância de partir para a técnica em maior escala.

CGH-array (Hibridização Genômica Comparativa em array) é um método baseado na detecção de ganhos e perdas de segmentos de DNA ou dosagem do genoma. Avanços desta tecnologia permitiram aumentos da resolução e comparação de genomas completos para a identificação de doenças genéticas. A plataforma de CGH-array é um conjunto de oligonucleotídeos sintéticos fixados sobre uma placa, onde são hibridizados, os DNAs previamente marcados com os corantes Cy3-dCTP para a amostra teste e Cy5-dCTP para a amostra controle (Chari et al 2006 e Kennett et al 2008).

CGH-array é uma tecnologia de alta resolução, inovadora, também chamada de cariótipo molecular. Esta foi desenvolvida com o objetivo de detectar desequilíbrios genômicos em todo o genoma em um único ensaio, sendo realizada em uma placa ou lâmina formada por diversos pontos contendo clones genômicos de interesse. Tal técnica permite uma investigação específica com o foco em perdas (microdeleções) e ganhos (microduplicações) sutis de regiões genômicas. O nível de resolução das diferentes plataformas de CGH-array depende da distância (1-100 Mb) e do tamanho (25 mers – 200 Kb) das sondas de DNA utilizadas, sendo possível detectar alterações consideradas submicroscópicas ou seja menores que 5 Mb (Sandri 2011).

Devido a eficiência da técnica na detecção de alterações submicroscópicas, rapidez e relativa simplicidade, CGH-array tem se tornado uma ferramenta fundamental no diagnóstico clínico de rotina e em alguns laboratórios está substituindo gradualmente metodologias citogenéticas clássicas. Entretanto seu alto custo ainda é um fator limitante para a aplicação (Rodrigues 2010).

Nos últimos anos, a análise por CGH-array de indivíduos síndrômicos, para os quais o cariótipo é normal, tem levado não somente a identificação de novas síndromes de microdeleção e microduplicação, mas também ao reconhecimento de uma ampla gama de características de síndromes previamente descritas. Paralelo a isso, a técnica de CGH-array também tem identificado regiões cromossômicas com rearranjos recorrentes para os quais características fenotípicas são subsequentemente analisadas (Mosca-Boidron et al 2011).

Fonte: Adaptado de Chari R, Lockwood WW, Lam WL. Computational methods for the analysis of array comparative genomic hybridization. Cancer Inform. 2007; 2:48-58.

Figura 8 - Técnica de Hibridização Genômica Comparativa em Array (CGH-array).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Analisar por meio da técnica de sequenciamento direto a presença de alterações moleculares nos genes *SHH*, *SIX3*, *ZIC2* e *TGIF1* em indivíduos com diagnóstico clínico de HPE.

Analisar por meio da técnica de CGH-array a presença de alterações moleculares em indivíduos com diagnóstico clínico de HPE previamente submetidos à análise por sequenciamento direto.

4 INDIVIDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA

4 INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo (HRAC/USP), conforme ofício nº 60/2013 SVAPEPE-CEP (Anexo 1).

Os indivíduos selecionados para o presente estudo fizeram parte de um projeto anterior (Fapesp Proc. nº. 06/60973-9), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Nº 289/2006) (Anexo 3), que apresentava como proposta a investigação de mutações nos genes *SHH*, *GLI2*, *TGIF*, *ZIC2*, *PATCH* e *SIX3* em indivíduos com anomalias craniofaciais, dentre os quais, indivíduos com HPE atendidos no HRAC/USP.

O estudo anterior previa a realização de anamnese e coleta de material biológico (2 ml de sangue periférico para a extração de DNA) de, inicialmente, 80 indivíduos com HPE. No entanto, foram incluídos 145 indivíduos, dos quais 65 não puderam ser analisados durante o período do referido projeto. Dessa forma, desses 65 indivíduos, selecionamos 50 para o presente estudo, uma vez que já havia material biológico (DNA) disponível.

Os pais ou responsáveis pelos indivíduos selecionados foram novamente convidados a participar do presente estudo, informados sobre os objetivos e procedimentos e, aqueles que concordaram, assinaram um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

4.1 CASUÍSTICA

Fizeram parte do estudo, 50 indivíduos com idades entre 03 meses e 50 anos. A razão sexual foi de 23 indivíduos do gênero masculino e 27 do gênero feminino, cadastrados no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, da Universidade de São Paulo (HRAC-USP).

O grupo controle foi composto por 50 indivíduos sem sinais clínicos e sem história familiar de HPE pertencentes ao banco de DNA do HRAC/USP.

Todos os participantes foram atendidos pelo Setor de Genética Clínica e diagnosticados com o fenótipo clínico da HPE.

4.1.2 Critérios de inclusão

O critério de inclusão dos indivíduos no presente estudo foi o diagnóstico clínico da HPE com ou sem análise citogenética realizada previamente.

Os dados clínicos dos indivíduos foram obtidos por meio de análise dos prontuários, de acordo com os registros dos profissionais da equipe multidisciplinar do hospital, por consulta ao banco de dados do HRAC/USP (GANDHI¹), e avaliados pelo Setor de Genética Clínica.

A avaliação genética-clínica incluiu dados gestacionais, neonatais e história familiar, mediante entrevista com os pais ou responsáveis, com descrição pormenorizada do fenótipo morfológico.

¹ Software de armazenamento de dados dos pacientes do HRAC/USP

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

4.2.1 Coleta de sangue e extração de DNA genômico

A amostra biológica foi obtida a partir de 2 ml de sangue periférico, coletado por venipunção em tubo com EDTA, na época do estudo anterior (Nº 289/2006), armazenada em freezer -80°C.

4.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 2 ml de sangue periférico em EDTA, utilizando o kit FlexiGene[®] DNA (QIAGEN 2002) de acordo com o seguinte protocolo:

- a) Em um tubo cônico de volume de 15 ml pipetar 5 ml de tampão FG1. Adicionar 2 ml de sangue periférico e homogenizar por inversão cinco vezes.
- b) Centrifugar o tubo por cinco minutos numa velocidade de 2000 G em centrífuga de rotor swing.
- c) Descartar o sobrenadante e deixar o tubo invertido sobre um lenço de papel por dois minutos, com cuidado para que o pellet formado não escorra do tubo.
- d) Adicionar 1 ml de tampão de Protease FG2/QIAGEN. Fechar o tubo e vortequisar imediatamente até que o pellet esteja completamente homogenizado.

- e) Inverter o tubo por três vezes, alocar o tubo em um bloco de aquecimento ou banho quente, e incubar à temperatura de 60°C por 10 minutos.
- f) Adicionar 1 ml de isopropanol a 100% e homogenizar por inversão até que o DNA precipitado se torne visível no formato de um emaranhado.
- g) Centrifugar durante três minutos à velocidade de 2000 G.
- h) Descartar o sobrenadante e inverter o tubo brevemente sobre uma toalha de papel absorvente, com cuidado para que o pellet permaneça no tubo.
- i) Adicionar 1 ml de etanol a 70% e vortequisar por cinco segundos.
- j) Centrifugar por três minutos à velocidade 2000 G.
- k) Descartar o sobrenadante e deixar o tubo invertido sobre uma toalha de papel absorvente por no mínimo cinco minutos, com cuidado para que o pellet permaneça no fundo do tubo.
- l) Secar o pellet por exposição ao ar até que todo o líquido tenha evaporado (pelo menos cinco minutos).
- m) Adicionar 300 µl de tampão FG3, e vortequisar por cinco segundos à velocidade baixa, e dissolver o DNA por meio da incubação durante uma hora à temperatura de 65°C em um bloco de aquecimento ou em um banho maria.

4.2.3 Quantificação, diluição e armazenamento das amostras

O DNA extraído foi quantificado no aparelho Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spectrophotometer[®] (Uniscience) e então armazenado no Banco de DNA do Laboratório de Genética e Citogenética Humana HRAC/USP.

4.2.4 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação gênica

Foram utilizados 15 pares de primers localizados em regiões intrônicas dos genes *SHH* (quatro pares), *SIX3* (três pares), *ZIC2* (cinco pares) e *TGIF1* (três pares) previamente descritos por Roessler et al (2012a). A amplificação dos genes *SHH*, *SIX3*, *ZIC2* e *TGIF1* foi realizada por PCR.

A amplificação do DNA genômico foi executada utilizando-se 60ng -100 ng de amostra de DNA do indivíduo, dNTPs (200 μ M), primers (25 pmol cada) e Taq polimerase (1U) num volume final de 20 μ l.

PCR Enhancer Kit[®] (Invitrogen, CA) composto de tampão 10X, MgSO₄ e solução Enhancer também foi utilizado em todas as reações de amplificação.

As condições de amplificação utilizadas foram: um ciclo inicial de 95°C por 1 minuto, “n” ciclos adicionais de 95°C por 30 segundos, “n” °C por 30 segundos, 72°C por um minuto, seguido de um ciclo de 72°C por 4 minutos e mantido armazenado à temperatura de 4°C. O número de “n” ciclos e temperatura adicionais variaram de acordo com a necessidade de cada primer como descrito por Roessler et al (2012a). A sequência dos oligonucleotídeos, o número de ciclos e a temperatura referente a cada sequência estão descritos na Quadro 2.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos.

Genes	Amplicons/Primers		Tamanho (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Ciclos
SIX3	1	1A-1F - 5' TACCTCCCTCTCTATGTGGCTG 3'	730	60	50
	1	1A-1R - 5' GCCTGCAGCTTGCCGTGAGA 3'			
	2	1B-F - 5' ACCACATCCTTGAGAACCACAAG 3'	404	56	50
	2	1B-R - 5' AGGCCTCTGAGGCTGTAGC 3'			
	3	2-FN - 5' TGGCGGGCCTCTGTGTCAGG 3'	374	56	50
	3	2-RN - 5' GTTGGGTATCCTGATTTCG 3'			
SHH	1	1F1 - 5' CAGCCAGCGAGGGAGAGAGCGAGCGGGCGA 3'	520	60	30
	1	1R1 - 5' TAAGTCTGGAAGTGTTCGGCTTCTC 3'			
	2	2F2 - 5' GGCAGGCTGATGGAGGGGCCGGGA 3'	475	60	40
	2	2R1 - 5' AAAGCAGTCATGCCAGCGACCCTGC 3'			
	3	3F1 - 5' CCTCCCTCTCGGAACTCAATGCCCTGTC 3'	476	60	40
	3	3R1 - 5' AGCCGGCGGTCCCCGTCACGCTCG 3'			
	4	3F3 - 5' GCCCGGGCCAGCGCGTGTACGTGG 3'	483	60	40
	4	3R3 - 5' CCCCTCCCCCGGCCCGGCTTC 3'			
TGIF 1	1	A4F - 5' ATCAGAGCGTCCTGTTTAGC 3'	410	56	50
	1	A4R - 5' TTTCTTGACAACGTGCCAGC 3'			
	2	A5F - 5' CAATAGTTGCTGTGCTTATAAAGC 3'	378	56	50
	2	A5R - 5' GAGTGGCAAGGAGCTTAATGA 3'			
	3	EX3F - 5' ATTCTCAGAACCCGTTGGCTG 3'	705	56	50
	3	EX3R - 5' AATTCATCTCTTGCCCTTCACC 3'			
ZIC2	1	Z1 - 5' ATCGGGAGCGGGAGTCGAG 3'	590	64	50
	1	Z2 - 5' AGCACATTCTGCGAGCCGTG 3'			
	2	Z31 - 5' AACTCCACCCGGGACTTCCTGTTC 3'	805	60	50
	2	Z42 - 5' TCGGCACCCACAGCCTGAGTC 3'			
	3	Z5 - 5' TGCAGCCAGCGCCGATGTTTGC 3'	268	64	50
	3	Z6 - 5' TGAGGTGGTCCGGGCCAGTGC 3'			
	4	Z7 - 5' AGCTGCACTCACACCCAGTC 3'	494	58	35
	4	Z8 - 5' AAGGTGCCCTCGCTGCTAGCTG 3'			

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

4.2.5 Purificação enzimática

Após a amplificação, os amplicons foram purificados utilizando-se a enzima illustra ExoProStar[®] (GE Healthcare 2013).

- a) Retirar a enzima illustra ExoProStar[®] do congelador e manter resfriada durante o preparo da reação.
- b) Utilizar uma alíquota de 5 µl de produto da PCR.
- c) Adicionar 2 µl da enzima à reação.
- d) Em um termociclador incubar a reação sob a temperatura de 37°C por 15 minutos.
- e) Incubar à temperatura de 80°C por 15 minutos para a inativação da enzima.

4.2.6 Sequenciamento direto

Após a purificação, foi realizado o sequenciamento direto do DNA com a utilização do kit *Big Dye terminator cycle sequencing v.3.1[®]* (Applied Biosystems 2009) e as condições da reação de sequenciamento aplicada foram: um ciclo inicial de 95°C por 1 minuto e 30 segundos e 35 ciclos adicionais de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, seguidos de 60°C por 7 minutos, e mantido armazenado à temperatura de 4°C.

As reações foram visualizadas no sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer[®] (Applied Biosystems 2009).

Quando uma variante potencialmente patogênica foi detectada, uma nova reação de sequenciamento foi realizada, utilizando um novo produto da PCR, além de verificação no grupo controle.

4.2.7 Leitura das sequências obtidas

O produto da precipitação do sequenciamento foi submetido à eletroforese capilar na plataforma ABI 3500[®] (Applied Biosystems 2009). Durante a eletroforese capilar as moléculas são eletroinjetadas nos capilares e se deslocam em direção ao ânodo. A ordem de migração das moléculas depende diretamente de seu peso molecular, sendo sempre em ordem crescente a passagem dos fragmentos. Ao passar pela câmara de luz a fluorescência de cada molécula é captada por um laser de detecção.

A detecção das fluorescências gera os dados correspondentes aos picos do eletroferograma. O programa Data Collection[®] (Applied Biosystems 2009), ordena os dados da corrida de eletroforese e permite a visualização da sequência detectada durante a eletroforese capilar, bem como outros dados técnicos da corrida.

4.2.8 Análise das sequências obtidas

A análise visual das sequências foi realizada por meio do programa Sequence Scanner V1.0[®], disponível gratuitamente online para download (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=DetailInfo>), as sequências foram conferidas e por meio de consulta a

base de dados Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information 2013).

Todos os eletroferogramas foram analisados e as variações encontradas foram consultadas na base de dados Ensembl (Trust Sanger Institute 2013) nas plataformas de cDNA referentes aos genes estudados.

Quando foram encontradas variantes (polimorfismo ou mutação) que não constavam do banco de dados Ensembl, (Trust Sanger Institute 2013) mas que causavam mudança de aminoácido, foi realizada consulta ao software Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2 2013) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Este software é uma ferramenta on-line gratuita de predição do possível impacto que a substituição de um aminoácido causará na estrutura e função da proteína. O PolyPhen-2 utiliza exclusivamente considerações físicas e comparativas. O software analisa por meio de algoritmos a probabilidade de patogenicidade da modificação de um aminoácido sobre a estrutura da proteína. A predição emite um escore que varia entre 0,00 e 1,00 sendo os valores próximos de 0,00 possivelmente benignos e próximos de 1,00 possivelmente patogênicos.

4.3 TÉCNICA DE CGH-array

A presença de desequilíbrios genômicos submicroscópicos foi investigada pela técnica de hibridização genômica comparativa baseada em array (CGH-array). Utilizamos a plataforma Cytosure™, ISCA v2 array 4X180K® (Oxford Gene Technology, OGT, UK). Esses oligoarrays contêm quatro áreas com aproximadamente 180.000 oligonucleotídeos de 60pb. Os procedimentos de

purificação das amostras, hibridação e lavagem foram realizados conforme descrito pelo fabricante, com algumas modificações.

Na etapa de digestão do DNA genômico, foram utilizados 800 ng -1000 ng de DNA, em volume final de 18 ml de reação, contendo 5 U de cada uma das enzimas Alul e RsaI, 1,7 mg de BSA (albumina de soro bovino) e Buffer C 10X (10% do volume final). As amostras foram digeridas por duas horas a 37°C em banho seco, seguindo-se a inativação das enzimas, por 20 minutos a 65°C.

Na etapa de digestão do DNA genômico, foram utilizados 800 ng -1000 ng de DNA, em volume final de 18 ml de reação, contendo 5 U de cada uma das enzimas Alul e RsaI, 1,7 mg de BSA (albumina de soro bovino) e Buffer C 10X (10% do volume final). As amostras foram digeridas por duas horas a 37°C em banho seco, seguindo-se a inativação das enzimas, por 20 minutos a 65°C.

Para a marcação das amostras, foi utilizado o kit Cytosure Genomic DNA Labelling kit® (OGT, Oxford, UK). Os procedimentos e quantidades de cada reagente seguiram as instruções do fabricante. Em resumo, foram adicionados random primers e tampão à reação da digestão, seguindo-se a desnaturação do DNA por 3 minutos a 95°C e a incubação em gelo por 5 minutos. Para a marcação, foram adicionados dNTP, Cy3-dCTP (para a amostra teste) e Cy5-dCTP (para a amostra referência) e enzima Klenow.

As amostras foram mantidas por duas horas a 37°C em banho seco, procedendo-se em seguida à inativação da enzima por 10 minutos a 65°C. As amostras marcadas foram purificadas, utilizando-se Illustra™ ProbeQuant™ G-50 Micro Columns® (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA genômico marcado e a atividade específica dos fluorocromos Cy3-dCTP e Cy5-dCTP foram determinadas no espectrofotômetro NanoDrop ND-

1000[®] (NanoDrop Technologies). Na etapa de precipitação, 50 ml do DNA teste (marcado com Cy3) e 50 ml do DNA referência (marcado com Cy5) foram adicionados a 10 mg de Human Cot-1 DNA[®] (Invitrogen), para o volume final de 105 ml.

Em seguida, foram adicionados NaAc (3 M, pH 5,0; 10% do volume final) e etanol 100% gelado (2,5X o volume final). As amostras foram precipitadas por 15 minutos a -80°C ou por duas horas a -20°C.

Após centrifugação a 13.200 rpm, por 15 minutos a 4°C, adicionou-se etanol 70% gelado às amostras e procedeu-se a centrifugação por mais 5 minutos a 13.200 rpm, descartando-se o sobrenadante. Seguiu-se nova centrifugação por 1 minuto, descartando-se o sobrenadante. O DNA marcado foi então ressuspensionado em TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) previamente aquecido a 72°C e mantido por 2 minutos a 72°C, seguindo-se nova ressuspensão em vórtex. Para hibridação da amostra, foi utilizado o Agilent Oligo a-CGH Hybridization kit[®] (Agilent Technologies, Califórnia, USA). Foram adicionadas as soluções blocking solution 10X e hybridization buffer 2X e procedeu-se à desnaturação por 3 minutos a 95°C, seguindo-se 30 minutos a 37°C. Adicionou-se todo o volume das amostras às lamelas da lâmina de suporte do microarray (GASKET slide) e colocou-se a lâmina de microarray sobre ela. As amostras foram então hibridadas a 65°C por aproximadamente 20 horas. A lâmina de microarray foi mergulhada em Buffer 1 por 5 minutos, depois em Buffer 2 (previamente aquecido a 37°C) por 1 minuto, seguindo 10 s em acetonitrila[®] (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e 30 segundos em Stabilization Drying Solution. As imagens do array, obtidas com o Agilent High-Resolution Microarray scanner, foram processadas e analisadas, utilizando o pacote de programas Feature Extraction[®] e Agilent Genomic Workbench[®] (ambos da Agilent

Technologies), usando o algoritmo estatístico ADM-2 e o limiar de sensibilidade 6,0. Apenas as alterações abrangendo 3 oligonucleotídeos consecutivos com razão log2 alterada foram consideradas pelo programa como possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico.

4.3.1 Análise de CGH-array

A análise dos dados obtidos pela CGH-array foi realizada por meio do banco de dados Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER) (Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz 2013).

DECIPHER permite a comparação da região afetada com múltiplos bancos de dados, o que otimiza a busca por informações (Firth et al 2009).

A plataforma comparativa utilizada no presente estudo foi NCBI36/hg18, compatível com a plataforma comercial Cytosure™, ISCA v2 array 4X180K® (Oxford Gene Technology, OGT, UK) elaborada para o mesmo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado o sequenciamento dos genes *SHH* e *TGIF1* por completo e, parcialmente, o sequenciamento dos genes *SIX3* e *ZIC2*, em 50 indivíduos com o fenótipo da HPE, devido a problemas na padronização das reações de PCR e sequenciamento.

Dentre os 50 indivíduos, oito foram selecionados para a análise por CGH-array que apresentavam um fenótipo mais grave da HPE alobar e lobar.

A análise por sequenciamento direto identificou duas variantes patogênicas no gene *SHH* em dois indivíduos não aparentados.

Uma deleção de 1,5 Mb foi detectada em um indivíduo selecionado para o exame de CGH-array.

5.1 SEQUENCIAMENTO DO GENE *SHH*

A análise mutacional do gene *SHH* mostrou a presença de duas variantes patogênicas: uma mutação missense (p. G24P)² em um indivíduo (caso 1) com o fenótipo de HPE-like e uma deleção (c.1031del C) em um indivíduo (caso 2) com HPE semilobar.

² As variantes descritas no presente estudo estão de acordo com a nomenclatura sugerida por den Dunnen e Antonarakis (2000).

Caso 1: sexo masculino, primeiro filho de casal não consanguíneo (Figura 9).

Dados gestacionais, antecedentes pessoais e evolução: a gestação transcorreu sem intercorrências. A idade materna e paterna na época da concepção eram respectivamente, 22 e 23 anos. Nasceu de parto cesáreo, a termo, com peso de 2,9 Kg e comprimento de 47 cm.

Levantamento de história familiar: sem histórico de aborto.

Exame físico aos 3 meses de idade: apresentou fenótipo da HPE-like incluindo fissura transforame unilateral direita, hipotelorismo ocular aparente, microcefalia, hipoplasia de face média, perfil plano e ponte nasal achatada.

Exame físico aos 12 anos e 7 meses de idade: apresentou, além dos outros achados clínicos, hipoplasia de maxila.

Exame físico da mãe: presença de incisivo central único, hipotelorismo ocular e leve hipoplasia de face média.

Nota: Probando apresenta fenótipo HPE-like. Pai já falecido e mãe apresenta alguns sinais clínicos da HPE.

Figura 9 - Heredograma do indivíduo 1.

A análise mutacional do gene *SHH* nesse indivíduo detectou a variante c.137A>C (p. G24P) (Figura 10). Essa variante representa uma mutação de ponto heterozigota na sequência de DNA, ou seja, apenas uma base em uma das fitas de DNA do indivíduo, que acarreta mudança de aminoácido durante a produção proteica. Foi realizado o sequenciamento deste fragmento no DNA da mãe e foi identificada a mesma mutação de ponto, confirmando que essa mutação é de origem materna.

Figura 10 - Variante missense detectada no gene *SHH* do caso 1 e em sua mãe, na posição c.137A>C.

Essa variante possivelmente acarreta perda de função se mostrando altamente patogênica pelos parâmetros do software Poliphen®, com um escore de 0.998 (sensibilidade:0.27; especificidade: 0.99) (Figura 11).

Embora a variante encontrada tenha alta indicação de patogenicidade, a mãe apresenta apenas alguns sinais clínicos da HPE.

Nota: O resultado prediz uma variante com alta probabilidade de patogenia, uma vez que atingiu um escore de 0.998, podendo ser visualizado por meio da barra preta próxima ao número 1,00.

Figura 11 - Análise da variante p.24G>P por meio do software PolyPhen.

A hipótese de múltiplos fatores que levariam à formação dos diferentes fenótipos foi postulada por Ming e Muenke (2002) e corroborada por diversos estudos ao longo dos anos entre os quais Solomon et al (2009) e Mercier et al (2011). A diferença fenotípica apresentada pelo caso 1 e sua mãe, poderia ser explicada por meio dessa hipótese. Assim, não apenas a mutação seria responsável pelo fenótipo de ambos, mas também fatores ambientais, bem como interações gênicas e polimorfismos poderiam estar envolvidos na penetrância e variabilidade da expressão.

Caso 2: sexo masculino, terceiro filho de casal não consanguíneo (Figura 12).

Dados gestacionais, antecedentes pessoais e evolução: a gestação transcorreu com hipertensão, pré-eclâmpsia e diabetes gestacional. A idade materna e paterna na época da concepção eram, respectivamente, 37 e 45 anos. Nasceu de parto cesáreo, a termo, peso de 2,9 Kg e comprimento 49 cm.

Exame físico aos oito meses de idade: fenótipo de HPE semilobar, diagnosticado por meio de tomografia computadorizada, apresentou microcefalia, olhos proeminentes, base nasal baixa, fissura labial mediana, glaucoma congênito, convulsão e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

Exame físico dos pais não apontou nenhuma microforma da HPE. O pai apresentou olhos proeminentes e micrognatia que, no entanto, não são sinais clássicos da HPE.

Nota: Probando apresenta HPE semilobar. Pai apresenta sinais clínicos não relacionados a HPE.

Figura 12 - Heredograma do caso 2.

A análise mutacional do gene *SHH* nesse indivíduo mostrou a presença da deleção c.1031delC, que acarreta uma mudança no quadro de leitura (frameshift) no éxon de número três (Figura 13).

Figura 13 - Variante frameshift detectada no gene *SHH* no caso 2.

A variante encontrada no caso 2 pode ter relação com o fenótipo da HPE, pois se encontra no *SHH*, descrito como um causador da HPE (Paulussen et al 2010 e Solomon et al 2012b), entretanto, a hipótese dos múltiplos fatores (Ming e Muenke 2002), como as diversas intercorrências gestacionais, podem ter colaborado para o fenótipo.

A investigação molecular paterna não identificou nenhuma variante na região onde foi detectada a deleção (Figura 14). Não houve tempo hábil para realizar a coleta do DNA materno.

Figura14 - Nenhuma variante detectada no pai do caso 2.

O diabetes gestacional e a exposição materna a agentes redutores de colesterol (estatinas) são fatores que podem contribuir para a etiopatogenia da HPE (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

A investigação citogenética no caso 2, identificou o cariótipo 46,XY,t(1;7)(q31;p21)pat. Essa translocação de origem paterna é um fator de grande relevância, pois há casos de translocação nos quais um gene pode se encontrar afastado de suas regiões promotoras e reguladoras, ocasionando modificações na via de expressão gênica (Jeong et al 2005).

O caso 2 apresenta uma translocação de origem paterna e uma deleção frameshift que não foi herdada do pai no gene *SHH*. Entretanto o exame molecular não foi realizado na mãe do caso 2, o que impede a conclusão da origem da variante. Porém o fato de haver uma translocação e múltiplas transcorrências gestacionais envolvidas neste caso reitera a teoria dos múltiplos fatores encontrada na literatura (Ming e Muenke 2002, Solomon et al 2009 e Mercier et al 2011).

SHH foi o primeiro a ser identificado e associado à HPE (Roessler et al 1996). O envolvimento do *SHH* na HPE humana foi sugerido devido às anomalias citogenéticas que afetavam o cromossomo 7q36, que contém o locus do gene *SHH*. Mutações no gene *SHH* são a causa mais comum da HPE não-cromossômica e não-sindrômica, representando aproximadamente 12% dos casos (Pineda-Alvarez et al 2010).

A frequência das mutações encontradas no gene *SHH* no presente estudo foi de 4%, que corrobora com a literatura, em que a média encontrada para os casos sem histórico familiar é de menos de 5% (Solomon et al 2011).

Por ser a HPE uma condição multifatorial tão complexa, é recomendável, caso seja de interesse da família, outros estudos para identificar a natureza da deleção e consequente efeito na proteína.

5.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE *ZIC2*

A análise mutacional do gene *ZIC2* foi realizada parcialmente nos 50 indivíduos da casuística.

Apenas o amplicom 1 foi padronizado, dentro do tempo previsto para este estudo. Para os amplicons 2, 3 e 4 foram testadas diversas variáveis, porém foi encontrada inespecificidade na reação de PCR, fato que impossibilitou o sequenciamento direto de tais amplicons. A única variável que não pôde ser testada a tempo foi uma nova síntese de primers.

Os resultados mostraram a presença de uma variante no éxon 1 do gene *ZIC2* em cinco indivíduos, a qual levou a mudança da base guanina por adenina na posição 431 (c. 431 G>A), porém sem troca de aminoácido (p. Q46 Q) (Figura 15). Não há relatos dessa variante silenciosa na literatura.

Figura 15 - Variante silenciosa c. 431 G>A (p. Q46 Q).

Mutações no *ZIC2* aparentemente estão relacionadas a um fenótipo específico, os indivíduos com mutações nesse gene geralmente apresentam um fenótipo peculiar, com encurtamento das têmporas, fendas palpebrais oblíquas para cima, nariz curto, narinas antevértidas, filtro nasal bem marcado e orelhas grandes (Solomon et al 2011). Nenhum dos indivíduos da casuística apresentava tal fenótipo.

5.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE *TGIF1*

A análise mutacional do gene *TGIF1* mostrou a presença de cinco polimorfismos na casuística. O polimorfismo rs2229333 (Figura 16) encontrado em quatro indivíduos, o rs2229335 (Figura 17) em três indivíduos, o rs229336 (Figura 18) encontrado em um indivíduo, rs76540437 (Figura 19), encontrado em seis indivíduos e o rs13829273 (Figura 20) em um indivíduo. Nenhuma variante patogênica foi identificada neste gene.

Figura 16 - Polimorfismo rs2229333.

Figura 17 - Polimorfismo rs2229335.

Figura 18 - Polimorfismo rs229336.

Figura 19 - Polimorfismo rs76540437.

Figura 20 - Polimorfismo rs13829273.

5.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE *SIX3*

A análise mutacional do gene *SIX3* foi realizada parcialmente nos 50 indivíduos da casuística.

Os amplicons 1 e 3 apresentaram inespecificidades apesar dos inúmeros testes realizados na padronização das reações. O amplicon 2 foi sequenciado por completo.

Em dois indivíduos, a região amplificada mostrou a presença do polimorfismo rs182881 (Figura 21).

Figura 21 - Polimorfismo rs182881.

A frequência de mutação no gene *SIX3* em indivíduos com HPE é de 1,3% (Cohen 2006).

Apesar do sequenciamento dos genes *SIX3* e *ZIC2* não ter sido concluído, a partir da comparação da análise parcial destes genes com os genes *TGIF1* e *SHH*, as duas variantes potencialmente patogênicas detectadas nesse estudo foram encontradas no *SHH*. Portanto, a determinação da patogenicidade de uma variante deve ser baseada nos padrões de herança, características clínicas e características dessa variante.

Relatos da literatura demonstram achados específicos, incluindo a descrição de microformas particulares associadas a mutações no *SHH*, a predominância de formas mais graves em indivíduos com mutações no *SIX3* e um fenótipo específico com características faciais em indivíduos com mutações no *ZIC2* (Solomon et al 2009 e Lacbawan et al 2009).

Os achados clínicos e moleculares dos indivíduos da casuística, onde pelo menos uma variante foi detectada, estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Indivíduos da casuística, fenótipos e variantes encontradas na análise por sequenciamento direto.

Indivíduo	Sexo	Idade	Fenótipo	Exames complementares	Análise mutacional			
					SHH	TGIF1	SIX3	ZIC2
1	M	11a9m	Fissura transforame unilateral direita, microcefalia, aparente hipotelorismo ocular, ponte nasal alta, base nasal alta.	-	c.137 A>C p.24G>P	-	-	-
2	M	7a1m	Microcefalia, holoprosencefalia, olhos proeminentes, base nasal baixa, fissura labial mediana, convulsão e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor.	Cariótipo: 46, XY, t(1;7)(q31;p21)pat	c.1031delC	rs2229333, rs2229335, rs2229336, rs76540437	-	-
3	M	3a8m	Fissura de lábio e palato, fendas palpebrais oblíquas para cima, base nasal baixa.	-	-	-	-	p.46Q>Q (c.137G>A)
4	F	16a2m	Fendas oblíquas, perfil plano e fissura de lábio e palato.	-	-	-	-	p.46Q>Q (c.137G>A)
5	F	2a6m	Fissura de lábio e palato, fendas palpebrais oblíquas para cima, base nasal baixa e anomalias cardíacas.	-	-	-	-	p.46Q>Q (c.137G>A)
6	F	2a8m	Microcefalia, hipotelorismo, olhos proeminentes, agenesia do septo nasal, perfil plano, fissura labial mediana e atraso psicomotor.	-	-	-	-	p.46Q>Q (c.137G>A)
7	F	3a5m	Microcefalia, estreitamento bitemporal, hidrocefalia, holoprosencefalia, hipotelorismo ocular, base nasal baixa, hipoplasia do septo nasal, fissura de lábio e palato, convulsão e atraso psicomotor.	-	-	-	-	p.46Q>Q (c.137G>A)
8	F					rs2229335 rs2229336		

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Fenótipo	Exames complementares	Análise mutacional			
					SHH	TGIF1	SIX3	ZIC2
9	F	26a7m	Fendas palpebrais oblíquas para cima, hipoplasia do terço médio da face, perfil plano, fissura de lábio e palato e incisivo central único.	-	-	rs2229335 rs2229333	-	-
10	F	28a6m	Hipotelorismo, fendas palpebrais oblíquas para cima e fissura de lábio e palato.	-	-	rs138292737	-	-
11	F	4a3m		-	-	rs76540437	-	-
12	F	12a11m	Ano\microftalmia, coloboma palpebral, fissura atípica, fissura lateral.	-	-	rs76540437	-	-
13	F	4a0m	Fendas palpebrais oblíquas para cima, base nasal baixa, perfil plano, fissura de lábio e palato.	-	-	rs76540437	-	-
14	F	2a0m	Microcefalia, fendas palpebrais oblíquas, sinofre, lobulos das orelhas aderidos, aparente hipertelorismo ocular, hipoplasia da pré-maxila, fissura de lábio e palato e hirsutismo.	Cariótipo: 46, XX	-	rs7654043	-	-
15	M	3a8m	Fissura labial mediana, microcefalia, agenesia do septo nasal e perfil plano.	-	-	rs7654043 rs2229333	rs182881	-
16	F	21a8m	Microcefalia, fendas palpebrais oblíquas para cima, hipoplasia do terço médio da face, perfil plano e fissura de lábio e palato.	-	-	-	rs182881	-
17	F	1a1m	Microcefalia, anoftalmia, holoprosencefalia, fistulas, orelhas proeminentes, hipotelorismo, atraso no desenvolvimento psicomotor e anoftalmia	Cariótipo: 46, XX	-	rs2229333	-	-

5.5 CGH-array

A análise por CGH-array foi realizada em oito indivíduos da casuística, os quais apresentavam fenótipo de HPE lobar, semilobar ou alobar. Outro critério de seleção foi o fato de não apresentarem alterações moleculares no sequenciamento direto dos genes analisados.

Essa análise revelou a presença de uma deleção no indivíduo 37 da casuística.

Caso 37: sexo masculino (Figura 22), terceiro filho de casal não consanguíneo.

Exame físico aos dois meses de idade: apresentou microcefalia, frontal pequeno, olhos proeminentes, hipotelorismo ocular, fissura de lábio e palato mediana e convulsões.

Dados gestacionais, antecedentes pessoais e evolução: A gestação transcorreu sem intercorrências gestacionais. A idade materna e paterna na época da concepção era de 29 e 34 anos, respectivamente. Nasceu de parto normal, a termo, peso de 3,7 Kg e comprimento 54,6 cm.

Exames complementares: tomografia computadorizada: holoprosencefalia alobar.

Exame físico dos pais não mostrou nenhuma microforma da HPE. No entanto o perímetro craniano da mãe de 53 cm, apresentou-se dentro da curva média de padronização de tamanho craniano, porém com proximidade da curva inferior, pode ser considerado um microsinal indicativo HPE.

Nota: Probando apresenta HPE alobar Mãe apresenta crânio pequeno micro sinal clínico, os pais tiveram um filho anterior que veio a óbito devido a gravidade da condição.

Figura 22 - Heredograma do caso 37.

A deleção intersticial de aproximadamente 1,5 Mb no braço curto do cromossomo 17, na banda p12, entre as posições genômicas 14,052,279-15,102,307 pb (Figura 23), foi detectada no caso 37.

Figura 23 - Resultado da análise de CGH-array do caso 37.

A análise dos pais do caso 37 pela técnica de CGH-array revelou a mesma microdeleção na mãe.

Na região deletada são encontrados os seguintes genes, *Peripheral Myelin Protein 22* (*PMP22*, OMIM*601097) (Johns Hopkins University 2013I), *Heparan*

*Sulfate D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase 3B1 (HS3ST3B1, OMIM*604058)* (Johns Hopkins University 2013h), *Cytochrome C Oxidase Assembly Protein Cox10 (COX10 OMIM*602125)* (Johns Hopkins University 2013f), *CMT1A-REP (CDRT15 e CDRT7, OMIM*604596)* (Johns Hopkins University 2013i).

O gene *PMP22* codifica uma proteína de membrana compacta, intrínseca à mielina. Duplicações ou deleções neste gene podem causar as neuropatias autossômicas dominantes mais comuns, como a doença de Charcot Marie Tooth tipo 1A (CMTA, OMIM#118220) (Johns Hopkins University 2013a), a doença de Dejerine-Sottas (OMIM#145900) (Johns Hopkins University 2013b), a Síndrome de Guillain-Barré (OMIM#139393) (Johns Hopkins University 2013d) e Neuropatia Hereditária Sensível a Compressão (HNPP, OMIM#162500) (Johns Hopkins University 2013c) (Makowska et al 2008, Voermans et al 2012 e Siskind et al 2013).

HS3ST3B1 é o gene responsável por codificar a proteína 3-OST-3B1 integral de membrana (Shworak et al 1999 e Atkinson et al 2012).

O gene *COX10* foi associado à encefalopatia, progressiva mitocondrial, com tubulopatia renal devido à deficiência mitocondrial do complexo IV (Antonicka et al 2003).

O banco de dados DECIPHER foi utilizado para fazer a comparação inicial com o achado molecular, outras deleções e duplicações de tamanhos semelhantes foram encontradas próximas à região cromossômica do caso 37, no entanto o fenótipo na maioria dos casos é de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Apenas um dos casos apresentou microcefalia como parte do fenótipo. Ainda assim os casos encontrados no banco de dados apresentam deleção de aproximadamente 1,2 Mb e têm início aproximadamente na posição 14,280,000.

Os achados moleculares não corroboram com a literatura, pois até o momento, nenhum dos genes implicados nesta deleção foram associados ao fenótipo da HPE.

O caso 37 apresenta uma possível nova região cromossômica associada ao fenótipo da HPE, pois a mãe é portadora da deleção e há recorrência na família. A continuidade do estudo do caso, assim como o aconselhamento genético, se houver interesse da família, será muito importante.

A HPE apresenta etiologia e fenótipos altamente variáveis. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a grande heterogeneidade genética da HPE.

Além dos quatro principais genes associados à HPE (*SHH*, *SIX3*, *ZIC2* e *TGIF1*), outros genes têm sido identificados como responsáveis pela ocorrência da doença (Roessler e Muenke 2010). A descoberta da deleção no cromossomo 17p12 no caso 37 pode conter gene(s) ou fator(es) de transcrição que podem estar relacionados à HPE. Estudos adicionais serão necessários para elucidar tal achado.

Microdeleções têm sido identificadas em indivíduos com HPE. Bendavid et al (2006) encontraram microdeleções em um dos quatro principais genes da HPE, detectados em 4,7% dos indivíduos com anormalidades no SNC sugestivo de HPE, mas com cariótipo normal, entretanto nenhuma microdeleção foi identificada em indivíduos com microformas da HPE.

A análise de fetos com HPE e cariótipo normal revelou uma taxa maior dessas microdeleções (8,5%), sugerindo que as microdeleções são provavelmente mais associadas a um fenótipo mais grave (Bendavid et al 2006).

Apesar de não haver informação na literatura a respeito da ação do gene *PMP22* na origem da HPE, é possível que esse seja o primeiro relato de HPE

associada à deleção em 17p12, pois grande parte dos genes presentes nesta região cromossômica se expressa somente nos estágios embrionários. Sendo assim, defeitos em genes desta região poderiam ser a causa da HPE. Portanto para que seja possível a elucidação de tal achado é necessária a realização de estudos futuros.

A hipótese de múltiplos fatores é o modelo mais aceito para HPE. De acordo com esta hipótese, combinações de mutações em genes associados a HPE e intercorrências gestacionais levam a ocorrência da mesma e podem estar associadas a gravidade da condição (Ming e Muenke 2002). Há evidências de digenismo em modelos animais, envolvendo uma ou mais vias de sinalização diferentes, nestes modelos os fatores genéticos também parecem desempenhar um papel determinante na gravidade do fenótipo (Cole e Krauss 2003). Em humanos, a penetrância e expressão variáveis em famílias com grande número de indivíduos, e relatos de indivíduos com duas mutações diferentes dão suporte a esta hipótese (Ming e Muenke 2002, Rahimov et al 2006, Solomon et al 2009 e Mercier et al 2011).

O conhecimento atual sobre a HPE é resultado de aproximadamente quatro décadas de pesquisas em diversos centros especializados, apesar disso, o conhecimento da HPE ainda é bastante limitado, e muitas questões ainda permanecem sem respostas. Para melhorar a compreensão desta condição complexa, indivíduos afetados e suas famílias devem ser orientados quanto à participação em estudos genéticos (Pineda-Alvarez et al 2010).

O aconselhamento genético é baseado primariamente em dados clínicos devido à vasta heterogeneidade etiológica da HPE. Nos casos de HPE não sindrômica e não cromossômica, o aconselhamento genético deve ser conduzido com cautela, mesmo se for um caso esporádico. Os fatores de risco, particularmente

o diabetes materno, devem ser investigados. Mesmo se uma mutação for identificada e transmitida com manifestações clínicas na família, um outro evento, tal como uma mutação em outro gene ou um fator ambiental, pode ser necessário para originar a HPE.

Estudos contínuos sobre as bases moleculares da HPE, incluindo análises funcionais, deverão auxiliar no esclarecimento das variações nos genes associados à HPE. Trabalhos colaborativos serão determinantes para a compreensão da complexa patogênese da HPE, o que poderá contribuir para um melhor cuidado de indivíduos afetados e seus familiares.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A análise por meio da técnica de sequenciamento direto é uma ferramenta importante e eficaz para a identificação de alterações moleculares dos genes *SHH*, *SIX3*, *ZIC2* e *TGIF1* em indivíduos com diagnóstico clínico da HPE.

O sequenciamento direto dos genes *ZIC2* e *SIX3* por completo, nos indivíduos da casuística, em estudos posteriores, é relevante e poderá encontrar alterações moleculares não identificadas no sequenciamento parcial realizado em tais genes.

A técnica de CGH-array é eficiente em detectar alterações submicroscópicas, não detectáveis por outras técnicas moleculares, que embora não estejam diretamente relacionadas ao fenótipo da HPE, podem contribuir para a compreensão dos fatores envolvidos no desenvolvimento dessa condição.

A aplicação de técnicas como o sequenciamento direto e CGH-array é importante para a compreensão dos processos moleculares e os múltiplos fatores envolvidos no desenvolvimento da HPE, auxílio diagnóstico e, conseqüentemente, aconselhamento genético mais adequado.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

Aguilella C, Dubourg C, Attia-Sobol J, Vigneron J, Blayau M, Pasquier L, et al. Molecular screening of the TGIF gene in holoprosencephaly: identification of two novel mutations. *Hum Genet.* 2003; 112(2):131-4.

Antonicka H, Leary SC, Guercin GH, Agar JN, Horvath R, Kennaway NG, et al. Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Molec Genet.* 2003; 12(20):2693-702.

Applied Biosystems. DNA sequencing by capillary electrophoresis applied biosystems chemistry guide. 2nd ed. [homepage in the internet]. 2009. [cited 2013 Mar 3]. Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_041003.pdf

Aruga J. The role of Zic genes in neural development. *Mol Cell Neurosci.* 2004; 26(2):205-21.

Atkinson A, Garnier S, Afridi S, Fumoux F, Rihet P. Genetic variations in genes involved in heparan sulphate biosynthesis are associated with *Plasmodium falciparum* parasitaemia: a familial study in Burkina Faso. *Malar J.* 2012; 11(108):1-9.

Bejjani BA, Shaffer LG. Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics. *J Mol Diagn.* 2006; 8(5):528-33.

Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet.* 1996; 14(3):353-6.

Bendavid C, Rochard L, Dubourg C, Seguin J, Gicquel I, Pasquier L, et al. Array-CGH analysis indicates a high prevalence of genomic rearrangements in holoprosencephaly: an updated map of candidate loci. *Hum Mutat.* 2009; 30(8):1175-82.

Brown LY, Odent S, David V, Blayau M, Dubourg C, Apacik C, et al. Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2: alanine tract expansion mutations may be caused by parental somatic recombination. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(8):791-6.

Brown SA, Warburton D, Brown LY, Yu CY, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S, et al. Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nat Genet.* 1998; 20(2):180-3.

Carvalho CV, Ricci G, Affonso R. Guia de práticas em biologia molecular. São Paulo: Yends; 2010.

Chabchoub E, Willekens D, Vermeesch JR, Fryns JP. Holoprosencephaly and ZIC2 microdeletions: novel clinical and epidemiological specificities delineated. *Clin Genet.* 2012; 81(6):584-9.

Ciurea AV, Toader C. Genetics of craniosynostosis: review of the literature. *J Med Life.* 2009; 2(1):5-17.

Cobourne MT. Construction for the modern head: current concepts in craniofacial development. *J Orthod.* 2000; 27(4):307-14.

Cohen Junior MM. Hedgehog signaling update. *Am J Med Genet.* 2010 152A:1875-914.

Cohen Junior MM. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2006; 76(9):658-73.

Cohen Junior MM. Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *Am J Med Genet.* 2002; 115(4):245-68.

Cohen Junior MM. Perspectives on holoprosencephaly: Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. *Teratology.* 1989; 40(3):211-35.

Cole F, Krauss RS. Microform holoprosencephaly in mice that lack the Ig superfamily member Cdon. *Curr Biol.* 2003; 13(5):411-5.

Coleta E, Siminel M, Gheonea M. Holoprosencephaly sequence. *Rom J Morphol Embryol.* 2011; 52(2):725-8.

De La Cruz JM, Bamford RN, Burdine RD, Roessler E, Barkovich AJ, Donnai D, et al. A loss-of-function mutation in the CFC domain of TDGF1 is associated with human forebrain defects. *Hum Genet.* 2002; 110(5):422-8.

Del Bene F, Tessmar-Raible K, Wittbrodt J. Direct interaction of geminin and Six3 in eye development. *Nature.* 2004; 427:745-9.

DeMyer W, Zeman W, Palmer CD. Familial lobar holoprosencephaly (arhinencephaly) with median cleft lip and palate: Report of patient with 46 chromosomes. *Neurology*. 1963; 13:913-8.

Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*. 2000; 15(1):7-12.

Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis*. 2007; 2(2):8.

Dubourg C, Lazaro L, Pasquier L, Bendavid C, Blayau M, Le Duff F, et al. Molecular screening of SHH, ZIC2, SIX3, and TGIF genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*. 2004; 24(1):43-51.

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

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

GE Healthcare illustra ExoProStar 1Step 2013. Accessed in: www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1326706518989/litdoc29010724_20130129211715.pdf 24/05/2013

Gekas J, Sergi C, Kamnasaran D. Molecular prenatal diagnosis of a sporadic alobar holoprosencephalic fetus: genotype-phenotype correlations. *J Prenat Med*. 2012; 6(3):36-9.

Geng X, Speirs C, Lagutin O, Inbal A, Liu W, Solnica-Krezel L, et al. Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev Cell*. 2008; 15(2):236-47.

Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz. (GBGUCSC) UCSC Genome Browser [homepage in the internet] 2013. uptade 2013; cited 2013 Jan 20]. Available from: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

Gestri G, Carl M, Appolloni I, Wilson SW, Barsacchi G, Andreazzoli M. Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression. *Development*. 2005; 132(10):2401-13.

Gorlin RJ, Cohen Junior MM, Hennekam RCM. Syndromes of the head and neck. Oxford: Oxford University; 2001. (Oxford monographs on medical genetics, nº. 42).

Graham CA, Hill AJM. Introduction to DNA sequencing. In: Graham CA, Hill AJM (Editors). DNA sequencing protocols. 2nd. ed. Totowa: Humana Press; 2001. p.1-12. (Methods in molecular biology, 167).

Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, et al. Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. Nat Genet. 2000; 25(2):205-8.

Hahn JS, Barnes PD. Neuroimaging Advances in Holoprosencephaly: Refining the spectrum of the midline malformation. Am J of Med Gen. (Part C Seminars in Medical Genetics). 2010; 154C(1):120-32.

Hébert JM, Fishell G. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. Nat Rev Neurosci. 2008; 9(9):678-85.

HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). Gene symbol report: SHH. [homepage in the internet]. Cambridge: HUGO Gene Nomenclature Committee; 2013. update 2013; cited 2013 Jan 20]. Available from: http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=10848

Inbal A, Kim SH, Shin J, Solnica-Krezel L. Six3 represses nodal activity to establish early brain asymmetry in zebrafish. Neuron. 2007; 55(3):407-15.

Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev. 2001; 15(23):3059-87.

Jeong Y, El-Jaick k, Roessler E, Muenke M, Epstein DJ. A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. Development. 2005; 133(4):7761-72.

Jeong Y, Leskow FC, El-Jaick K, Roessler E, Muenke M, Yocum A, et al. Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein. Nat Genet. 2008; 40(11):1348-53.

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

Johns Hopkins University. #118220 Charcot Marie Tooth type 1A. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013a. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/118220>

Johns Hopkins University. #145900 Hypertrophic Neuropathy Of Dejerine-Sottas. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013b. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/145900>

Johns Hopkins University. #162500 Neuropathy, Hereditary, With Liability To Pressure Palsies; HNPP. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013c. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/162500>

Johns Hopkins University. #139393 Guillain-Barre Syndrome, Familial; GBS. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013d. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/139393>

Johns Hopkins University. #236100 Holoprosencephaly. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013e. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/236100>

Johns Hopkins University. #602125 Cytochrome C Oxidase Assembly Protein Cox10. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013f. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/602125>

Johns Hopkins University. #602330 Transforming Growth Factor-Beta-Induced Factor 1. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013g. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/602330>

Johns Hopkins University. #604058 Heparan Sulfate D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase 3B1. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013h. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/604058>

Johns Hopkins University. #604596 *CMT1A-REP* In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013i. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/604596>

Johns Hopkins University. *603073 Zinc Finger Protein Of Cerebellum 2. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013j. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/603073>

Johns Hopkins University. *603714 Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 3. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013k. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/603714>

Johns Hopkins University. *601097 Peripheral Myelin Protein 22. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013l. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/601097>

Johns Hopkins University. *600725 Sonic Hedgehog. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013m. [uptade 2013; cited 2013 May 20]. Available from: <http://omim.org/entry/600725>

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray J W, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992; 258(5083):818-21.

Kauvar, E F, Muenke M. Holoprosencephaly: recommendations for diagnosis and management. *Curr Opin Pediatr*. 2010; 22(6):687-95.

Kennett JY, Watson SK, Saprunoff H, Heryet C, Lam WL. Technical demonstration of whole genome array comparative genomic hybridization. *J Vis Exp*. 2008; (18)pii:870. doi: 10.3791/870.

Kim Y, Donoff RB, Wong DT, Todd R. The nucleotide: DNA sequencing and its clinical application. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 60(8):924-30.

Kobayashi M, Nishikawa K, Suzuki T, Yamamoto M. The homeobox protein Six3 interacts with the Groucho corepressor and acts as a transcriptional repressor in eye and forebrain formation. *Dev Biol*. 2001; 232:315-26.

Kobayashi M, Toyama R, Takeda H, Dawid IB, Kawakami K. Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene six3 induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. *Development*. 1998; 125(15):2973-82.

- Lacbawan F, Solomon BD, Roessler E, El-Jaick K, Domené S, Vélez JI, et al. Clinical spectrum of SIX3-associated mutations in holoprosencephaly: correlation between genotype, phenotype and function. *J Med Genet*. 2009; 46(6):389-98.
- Lagutin OV, Zhu CC, Kobayashi D, Topczewski J, Shimamura K, Puelles L, et al. Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev*. 2003; 17(3):368-79.
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, et al. Retinoic acid embryopathy. *New Eng J Med*. 1985; 313(14):837-41.
- Lazaro L, Dubourg C, Pasquier L, Le Duff F, Blayau M, Durou MR, et al. Phenotypic and molecular variability of the holoprosencephalic spectrum. *Am J Med Genet*. 2004; 129A(1):21-4.
- Leoncini E, Baranello G, Orioli IM, Annerén G, Bakker M, Bianchi F, et al. Frequency of holoprosencephaly in the International Clearinghouse Birth Defects Surveillance Systems: searching for population variations. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008; 82(8):585-91.
- Levy B, Dunn TM, Kaffe S, Kardon N, Hirschhorn K. Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet Med*. 1998; 1(1):4-12.
- Liu W, Lagutin OV, Mende M, Streit A, Oliver G. Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification. *EMBO J*. 2006; 25(22):5383-95.
- Makowska A, Pritchard J, Sanvito L, Gregson N, Peakman M, Hayday A, et al. Immune responses to myelin proteins in Guillain–Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79(6):664-71.
- Marcorelles PE, Laquerriere A. Neuropathology of holoprosencephaly. *Am J Med Genet*. 2010; 154C:109-19.
- Maxam AM, Gilbert WA. New method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(2):560-4.
- McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2003; 53:1-114.

- Mercier S, Dubourg C, Garcelon N, Campillo-Gimenez B, Gicquel I, 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.
- Ming JE, Muenke M. Holoprosencephaly: from homer to hedgehog. *Clin Genet*. 1998; 53(3):155-63.
- Ming JE, Muenke M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet*. 2002; 71(5):1017-32.
- Mosca-Boidron A, Bouquillon S, Faivre L, Callier P, Andrieux J, Marle N, et al. What can we learn from old microdeletion syndromes using array-CGH screening? *Clin Genet*. 2011; 82(1):41-7.
- MRC-Holland. Salsa MLPA kit P187-B2 Holoprosencephaly. In: MRC-Holland. MLPA website [homepage in the internet]. Holland:MRC;2013. [update 2013; cited 2013 May 21]. Available from: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF%5CE%5Ct9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjuss%7C&ProductOID=3ryZQLC8%5CEk%7C>
- Muenke M, Gurrieri F, Bay C, Yi DH, Collins AL, Johnson VP, et al. Linkage of a human brain malformation familial holoprosencephaly to human chromosome 7 and evidence for genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(17):8102-6.
- Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, et al. The mutational spectrum of the Sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(13):2479-88.
- National Center for Biotechnology Information. BLAST Assembled RefSeq Genomes [homepage in the internet]. 2013. [cited 2013 May 20]. Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. *Int J Dev Biol*. 2006; 50(6):511-21.
- Noronha L, Ghanem RC, Medeiros F, Knopfholz J, Magalhães TA, Sampaio GA, et al. Holoprosencefalia :análise do seu espectro morfológico em doze casos de autópsia. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001; 59(4):913-9.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson e Thompson: genética médica. Trad. Motta PM. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

- Oliver G, Mailhos A, Wehr R, Copeland NG, Jenkins NA, Gruss P, et al. SIX3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development*. 1995; 121(12):4045-55.
- Overhauser J, Mitchell HF, Zackai EH, Tick DB, Rojas K, Muenke M. Physical mapping of the holoprosencephaly critical region in 18p11.3. *Am J Hum Genet*. 1995; 57(5):1080-5.
- Passos-Bueno MR, Ornelas CC, Fanganiello RD. Syndromes of the first and second pharyngeal arches: a review. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A(8):1853-9.
- Paulussen AD, Schrandt-Stumpel CT, Tserpelis DC, Spee MK, Stegmann AP, Mancini GM, et al. The unfolding clinical spectrum of holoprosencephaly due to mutations in SHH, ZIC2, SIX3 and TGIF genes. *Eur J Hum Genet*. 2010; 18(9):999-1005.
- Pineda-Alvarez DE, Dubourg C, David V, Roessler E, Muenke M. Current recommendations for the molecular evaluation of newly diagnosed holoprosencephaly patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010; 154C(1):93-101.
- Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, et al. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*. 1995; 19(1):10-26.
- PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs [homepage in the internet]. 2013. [cited 2013 May 20]. Available from: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, et al. Hedgehog patterning activity: Role of lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell*. 1996; 86(1):21-34.
- Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*. 1996; 274(5285):255-9.
- QIAGEN FlexiGene DNA Kit Handbook 2002. Accessed in: www.ebiotrade.com/buy/products/qiagen/1019478HBQAFlexiGene_0102WW.pdf 23/05/2013
- Rahimov F, Ribeiro LA, de Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC. GLI2 mutations in four Brazilian patients: How wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A*. 2006; 140(23):2571-6.

Ribeiro LA, Murray JC, Richieri-Costa A. PTCH mutations in four Brazilian patients with holoprosencephaly and one with holoprosencephaly-like features and normal MRI. *Am J Med Genet A*. 2006; 140(23):2584-6.

Ribeiro LA, Roessler E, Hu P, Pineda-Alvarez DE, Zhou N, Jones M, et al. Comparison of mutation findings in ZIC2 between microform and classical holoprosencephaly in a Brazilian cohort. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012; 94(11):912-7.

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

Richtsmeier JT, Flaherty K. Hand in glove: brain and skull in development and dysmorphogenesis. *Acta Neuropathol*. 2013; 125(4):469-89.

Rodrigues, RM. Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais USP; 2010.

Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, et al. Mutations in the human Sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature Genet*. 1996; 14(3):357-60.

Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Vargus F, Scherer SW, Tsui L-C, et al. Mutations in the C-terminal domain of Sonic hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(11):1847-53.

Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillesen-Kaesbach G, et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(23):13424-9.

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

Roessler E, Ouspenskaia MV, Karkera JD, Velez JI, Kantipong A, Lacbawan F, et al. Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including FOXP1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet*. 2008; 83(1):18-29.

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

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1987; 239(4839):487-91.

Sandri, RMCS. Investigação de alterações na região 22q11 em indivíduos com fissura de palato [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais USP; 2011.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1977; 74(12):5463-7.

Santos,TNL. Expressão de variantes transcricionais do gene Homeobox TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca [tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia USP; 2008.

Shworak NW, Liu J, Petros LM, Zhang L, Kobayashi M, Copeland NG, et al. Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase: isolation, characterization, and expression of human cDNAs and identification of distinct genomic loci. *J Biol Chem*. 1999; 274(8):5170-84.

Siskind CE, Panchal S, Smith CO, Feely SM, Dalton JC, Schindler AB, et al. A review of genetic counseling for Charcot Marie Tooth disease (CMT). *J Genet Couns*. 2013. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s10897-013-9584-4.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; 20(4):399-407.

Solomon BD, Bear KA, Wyllie A, Keaton AA, Dubourg C, David V, et al. Genotypic and phenotypic analysis of 396 individuals with mutations in Sonic Hedgehog. *J Med Genet*. 2012a; 49(7):473-9.

Solomon BD, Gropman A, Muenke M. Holoprosencephaly overview. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens, K, Adam MP. *GeneReviews* [internet]. Seattle: University of Washington; 2011 [Updated 2011 Nov 3; cited 2013 May 01]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1530/>

Solomon BD, Lacbawan F, Jain M, Domené S, Roessler E, Moore C, Dobyns WB, Muenke M. A novel SIX3 mutation segregates with holoprosencephaly in a large family. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A(5):919-25.

Solomon BD, Lacbawan F, Mercier S, Clegg NJ, Delgado MR, Rosenbaum K, et al. Mutations in ZIC2 in human holoprosencephaly: description of a novel ZIC2 specific phenotype and comprehensive analysis of 157 individuals. *J Med Genet*. 2010a; 47(8):513-24.

Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Gropman AL, Willis MJ, Hadley DWM, Muenke M. High intellectual function in individuals with mutation-positive microform holoprosencephaly. *Mol Syndromol*. 2012b; 3(3):140-2.

Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Mercier S, Raam MS, Odent S, Muenke M. Holoprosencephaly flashcards: a summary for the clinician. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010b; 154C(1):3-7.

Sterky F, Lundeberg J. Sequence analysis of genes and genomes. *J Biotechnol*. 2000; 76(1):1-31.

Sulik KK, Dehart DB, Rogers JM, Chernoff N. Teratogenicity of low doses of all-trans retinoic acid in presomite mouse embryos. *Teratology*. 1995; 51(6):398-403.

Taniguchi K, Anderson AE, Sutherland AE, Wotton D. Loss of *tgif* function causes holoprosencephaly by disrupting the *shh* signaling pathway. *PLoS Genet*. 2012;8(2):e1002524.

Trust Sanger Institute. Ensembl Genome [homepage in the internet]. 2013. [cited 2013 May 20]. Available from: <http://www.ensembl.org/index.html>

Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008; 22(18):2454-72.

Voermans NC, Kleefstra T, Gabreëls-Festen AA, Faas BHW, Kamsteeg EJ, Houlden H, et al. Severe Dejerine-Sottas disease with respiratory failure and dysmorphic features in association with a PMP22 point mutation and a 3q23 microdeletion. *J Peripher Nerv Syst*. 2012; 17(2):223-5.

Wallingford JB, Niswander LA, Shaw GM, Finnell RH. The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science*. 2013; 339:(6123).

Wallis D, Muenke M. Mutations in holoprosencephaly. *Hum Mutat*. 2000; 16(2):99-108.

Wallis DE, Roessler E, Hehr U, Nanni L, Wiltshire T, Richieri-Costa A, et al. Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.* 1999; 22(2):196-8.

Warr N, Powles-Glover N, Chappell A, Robson J, Norris D, Arkell RM. Zic2-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation. *Hum Mol Genet.* 2008; 17(19):2986-96.

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

ANEXOS

ANEXO 1 – Ofício de Aprovação do Comitê de Ética

Ofício nº 60/2013-SVAPEPE-CEP

Bauru, 29 de maio de 2013.

Prezada Senhora

O projeto de pesquisa intitulado "**Sequenciamento direto dos genes SIX3, SHH, TGIF, ZIC2 e array-CGH no estudo de pacientes com holoprosencefalia**", de autoria de V.Sa., foi aprovado pelo CEP em 29/11/2011. Na reunião realizada em **28/05/2013**, as alterações solicitadas foram **aprovadas**.

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

Atenciosamente,

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

Ilma. Sra

Ana Laís Bignotto da Rocha

A/C

Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

Genética - HRAC/USP

Rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru SP Brasil
CEP 17.012-900
Tel. 55 14 3235 8421
E-mail: cep@centrinho.usp.br

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: **Sequenciamento direto dos genes *SIX3*, *SHH*, *TGIF1*, *ZIC2* e array-CGH no estudo de pacientes com holoprosencefalia**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: ANA LAÍS BIGNOTTO DA ROCHA
CRBio: 79542/01-D

Como parte deste estudo, você está sendo convidado a participar de modo opcional em uma pesquisa que envolverá testes genéticos. Opcional significa que você pode se recusar a participar deste estudo. Este estudo é voluntário, e incluirá somente pessoas que escolherem fazer parte do mesmo. Por favor, decida com calma.

Antes de concordar em participar é importante que você entenda todas as informações relativas a este estudo de pesquisa opcional. Por favor, peça ao responsável pelo estudo ou a equipe do estudo para explicar a você quaisquer palavras neste documento que você não compreenda, e antes de assinar certifique-se de que tudo foi respondido a sua satisfação. Sinta-se livre para discutir a informação neste documento com seus amigos e família ou com seu médico.

QUAL O OBJETIVO DESTA PESQUISA?

As células do seu corpo contêm um tipo de molécula chamada ácido desoxiribonucleico, ou DNA. DNA é a substância da qual seus genes são feitos. Pesquisas com genes envolvem o estudo de mudanças que são herdadas (passadas adiante pelas famílias). Hereditariedade é a passagem de informações genéticas e características (tais como cor dos olhos) de pais para seus filhos biológicos. Alguns genes que são herdados podem afetar a possibilidade de uma pessoa desenvolver doenças. Estudos envolvendo Teste Genético ou Pesquisa Genética são estudos que procuram nos genes herdados mudanças que possam causar doenças. Estudando as mudanças genéticas os pesquisadores esperam poder compreender as causas da doença genética e eventualmente desenvolver novas maneiras de prevenir, detectar e realizar consultoria genética apropriada. Se você concordar em permitir os testes genéticos os pesquisadores poderão estudar sua amostra e examinar seu DNA e compará-lo com a informação clínica. No presente estudo procuraremos por alterações no seu DNA que possam estar associadas a Holoprosencefalia, através da técnica de Hibridização Comparativa do Genoma por Array (array-CGH).

O QUE ENVOLVE PARTICIPAR DESTA PESQUISA?

Se você concordar em participar suas amostras serão analisadas através da técnica acima citada. Lembramos que você já assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido anteriormente para que fosse realizada a coleta de sangue para a obtenção da amostra de DNA, não sendo necessária nova coleta. Portanto, esse novo Termo nos permitirá investigar mudanças no seu DNA através da array-CGH.

HÁ BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DESTA PESQUISA OPCIONAL?

Devido ao caráter contínuo da pesquisa que poderá levar anos, é improvável que você tenha benefícios diretos ao participar deste estudo. Esta pesquisa pode levar a melhores diagnósticos e prognósticos em futuros pacientes que tenham a mesma doença que você.

QUAIS SÃO OS RISCOS DESTA PESQUISA OPCIONAL?

Devido ao rápido desenvolvimento dos avanços tecnológicos, o uso potencial da informação genética é desconhecido e, portanto os possíveis riscos futuros são desconhecidos.

Como a amostra de DNA já foi coletada anteriormente, nenhum risco adicional é esperado.

QUAIS SÃO SEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE?

Participar deste estudo opcional é inteiramente de sua escolha. Você pode escolher não participar, ou você pode mudar de ideia a qualquer momento por qualquer razão. Sua decisão não afetará seu tratamento médico ou seu relacionamento com o responsável pelo estudo de nenhuma maneira.

Se você participar deste estudo opcional e decidir que você não quer mais que suas amostras sejam utilizadas sua decisão será prontamente atendida.

Se você escolher se retirar deste estudo opcional os pesquisadores não são obrigados a destruir os resultados de nenhuma pesquisa que já tenha sido realizada.

QUEM VOCÊ DEVE CONTATAR SE TIVER ALGUMA DÚVIDA?

Se você tiver dúvidas sobre suas amostras, sobre quaisquer prejuízos, ou seus direitos como participante você pode contatar 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) 3235-8412.

Você receberá uma cópia assinada deste documento para manter com você.

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DESTA PESQUISA OPCIONAL

Minha assinatura neste Termo de Consentimento significa que:

Este estudo opcional foi a mim explicado. Eu recebi a chance de discuti-lo e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento.

Eu li cada página deste formulário.

Eu estou ciente dos riscos em de participar deste estudo opcional.

Eu concordo em permitir que minhas amostras de DNA sejam analisadas e o estudo dos dados utilizados para o propósito de pesquisa explicado neste formulário.

Eu consinto voluntariamente participar deste estudo opcional.

Eu estou ciente de que poderei deixar de participar desta pesquisa e de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Código de Ética aprovado pela Resolução do C.F.B.M. - Nº 0002/84 DE 16/08/84 - D. O. U. 27/08/84, e de conformidade com o Regimento Interno Art. 54, 55, 60 - publicado 31/07/84).

_____ Nome do Participante	_____ Assinatura do Participante	_____ Data
-------------------------------	-------------------------------------	---------------

Responsável pela obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Minha assinatura abaixo significa que eu expliquei a natureza e o propósito do estudo e dos riscos envolvidos para o participante do estudo, e eu respondi todas as questões do participante com o máximo de minhas habilidades.

_____ Nome do responsável pela obtenção do TCLE	_____ Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE	_____ Data
---	---	---------------

O participante foi auxiliado durante o processo de consentimento? ☐ **SIM** ☐ **NÃO**

*Se **SIM** por favor marque a caixa e complete a assinatura no espaço abaixo.*

☐ O Termo de Consentimento foi lido para o participante. A pessoa que assina abaixo atesta que o estudo apresentado neste formulário foi explicado de modo preciso e pareceu ter sido compreendido pelo participante.

_____ Nome	_____ Assinatura	_____ Data
---------------	---------------------	---------------

ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto anterior utilizado na coleta de material para análise na pesquisa (Fapesp Proc N° 06/60973-9) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (N° 289/2006)

Nós estamos convidando-os a participarem do projeto de pesquisa intitulado “Sequenciamento direto dos genes *SIX3*, *SHH*, *TGIF1*, *ZIC2* e array-CGH no estudo de pacientes com holoprosencefalia.”

” e gostaríamos que vocês soubessem que:

Participar deste projeto é uma opção de vocês.

Se vocês decidirem não participar ou desistirem de participar a qualquer momento não haverá perda de nenhum benefício ou tratamento que estiverem fazendo neste hospital.

Se vocês decidirem participar gostaríamos de informar-lhes que:

- a) serão coletados 2ml de sangue do paciente e dos pais
- b) a coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta
- c) os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família
- d) vocês estarão colaborando para aumentar o nosso conhecimento sobre a etiologia dessas anomalias
- e) os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos
- f) assim que existam resultados estes serão apresentados para vocês em consultas a serem agendadas conforme rotina do hospital ou por correspondência
- g) os resultados poderão ser publicados em revistas científicas que circulam entre os profissionais de saúde que tenham interesse nesta área
- h) sempre que ocorrerem publicações científicas a identidade do paciente será mantida em absoluto sigilo
- i) todos os resultados de exames moleculares estarão disponíveis no prontuário geral do paciente na respectiva Instituição e só serão acessados mediante a requisição da família ou do profissional qualificado

Eu, _____ portador do R.G. n° _____ (responsável ☐ paciente ☐) concordo em participar do projeto de pesquisa “Sequenciamento direto dos genes *SIX3*, *SHH*, *TGIF1*, *ZIC2* e array-CGH no estudo de pacientes com holoprosencefalia”. Declaro haver recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, estar ciente sobre os itens acima mencionados e minha participação é voluntária.

Data:

Assinatura:

Pesquisador Responsável: Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
Rua Silvio Marchione, 3-20
17012-900 Bauru-SP lubicudo@centrinho.com.br