

Vanessa Luiza Romanelli Tavares

Identificação de mutações associadas à  
Síndrome Aurículo-Condilar

*Identification of mutated alleles associated  
with Auriculo-Condylar Syndrome*

Instituto de Biociências  
Universidade de São Paulo  
São Paulo

2011

Vanessa Luiza Romanelli Tavares

Identificação de mutações associadas à  
Síndrome Aurículo-Condilar  
*Identification of mutated alleles associated  
with Auriculo-Condylar Syndrome*

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

São Paulo  
2011

## RESUMO

---

A síndrome aurículo-condilar (ACS) apresenta um modelo de herança autossômica dominante e é principalmente caracterizada por malformações auriculares, articulação temporomandibular anormal e hipoplasia do côndilo e da mandíbula. Devido às estruturas acometidas, é considerada uma patologia de primeiro e segundo arcos faríngeos. Com somente alguns casos clínicos descritos na literatura, o gene causador da ACS não é conhecido. Estudos recentes de nosso grupo mapearam o primeiro locus associado à síndrome, 1p21.1-q23.3 (família ACS1), enquanto que na segunda família estudada por nós (ACS2), não houve evidência de ligação com os marcadores desta região, sugerindo heterogeneidade genética a esta doença. Nossos principais objetivos no presente trabalho foram: identificar o gene responsável por ACS1 e mapear o locus associado à ACS2. Para o estudo de ACS1, dada a grande extensão da região candidata, com aproximadamente 1004 genes, utilizamos uma abordagem alternativa: análise de transcriptoma durante a diferenciação condrogênica a partir de células-tronco mesenquimais para seleção e subsequente seqüenciamento de genes candidatos. Através do estudo de expressão gênica entre controle e paciente ACS1, selecionamos e realizamos o seqüenciamento de dois genes. Não detectamos nenhuma alteração patogênica nestes genes e, portanto, é pouco provável que um destes seja responsável pela ACS1. Já na família com ACS2, através de estudo de ligação com uso de *microarrays* de SNP e marcadores microssatélites, mapeamos o segundo locus associado à ACS. Estudos complementares estão sendo realizados para a identificação dos alelos causadores de ACS1 e ACS2. Estes resultados, além de sua importância para o aconselhamento genético, poderão contribuir para a compreensão do desenvolvimento embrionário das estruturas acometidas nessa síndrome.

---

## ***ABSTRACT***

---

The auriculo-condylar syndrome is an autosomal dominant disease characterized by malformed ears, abnormal temporomandibular joint and condyle and mandible hypoplasia. It is considered a syndrome of the first and second pharyngeal arches. With only a few clinical cases reported in the literature, the gene that causes ACS is not known. Recent studies from our group mapped the first locus associated to the syndrome, 1p21.1-q23.3 (ACS1 family), while in the second family studied by us (ACS2), there was no evidence of linkage with this region, suggesting genetic heterogeneity of this disease. Our main objective in this study was to identify the gene responsible for ACS1 and map the locus associated to ACS2. In the study of ACS1, given the large extent of the candidate region, with approximately 1004 genes, we used an alternative approach: transcriptome analysis during chondrogenic differentiation of stem cells of a patient and a control for screening and subsequent sequencing of candidate genes. The two genes selected through this strategy were sequenced in ACS1 patients, however, no pathogenic mutation was identified. Therefore, it is very unlikely that mutations in these genes are causative of ACS1. In the family with ACS2, through linkage study using SNP microarray and microsatellite markers, we mapped the second locus associated to ACS. Additional studies are being conducted in order to identify the alleles causing ACS1 and ACS2. These results will not only contribute to a better genetic counseling for families with ACS but they will also contribute to the understanding of the embryonic development of the structures affected in this syndrome.

---

# 1. INTRODUÇÃO

---

A síndrome aurículo-condilar (ACS, OMIM 602483) é uma patologia de herança autossômica dominante, com penetrância aparentemente completa (JAMPOL *et al.*, 1998; GUION-ALMEIDA *et al.*, 2002; STORM *et al.*, 2005; MASOTTI *et al.*, 2008), para a qual ainda não se conhece o gene causador.

Poucos relatos da síndrome são encontrados na literatura. A ACS foi aparentemente primeiro descrita por UUSPÄÄ (1978). No entanto, atribui-se a JAMPOL e col (1998) o primeiro relato clínico da síndrome aurículo-condilar (GUION-ALMEIDA *et al.*, 2002; MASOTTI *et al.*, 2008).

## 1.1. Características clínicas

A síndrome aurículo-condilar é caracterizada, principalmente por malformações auriculares típicas, onde se observa uma implantação mais baixa da orelha, hélice superior dobrada na direção externa (orelhas salientes) e uma fenda entre o lóbulo e a hélice superior, dando à orelha uma aparência de ponto de interrogação, chamada de “*question mark ear*”. Contudo, há grande espectro de variabilidade no tipo de alteração auricular, e algumas alterações discretas muitas vezes não são notadas (COSMAN *et al.*, 1970; AL-QATTAN, 1998; UUSPÄÄ, 1978; JAMPOL *et al.*, 1998; GUION-ALMEIDA *et al.*, 2002; GUION-ALMEIDA *et al.*, 1999; PRIOLO *et al.*, 2000; STORM *et al.*, 2005; GERKES *et al.*, 2008; SHKALIM *et al.*, 2008; MASOTTI *et al.*, 2008).

Outra característica típica é a anormalidade do côndilo mandibular (agenesia ou hipoplasia) e da articulação temporomandibular (ATM), que, de acordo com diversos autores, podem remeter a uma redução na mobilidade da mandíbula à apenas alguns milímetros de abertura da boca (JAMPOL *et al.*, 1998; MASOTTI *et al.*, 2008; GUION-ALMEIDA *et al.*, 1999).

Outros achados freqüentemente encontrados na ACS são face arredondada, maloclusão, microstomia, micrognatia, bochechas salientes, bem como assimetria facial (Figura 1) (JAMPOL *et al.*, 1998; GUION-ALMEIDA *et al.*, 1999; GUION-ALMEIDA *et al.*, 2002; PRIOLO *et al.*, 2000; STORM *et al.*, 2005; MASOTTI *et al.*, 2008; GERKES *et al.*, 2008).

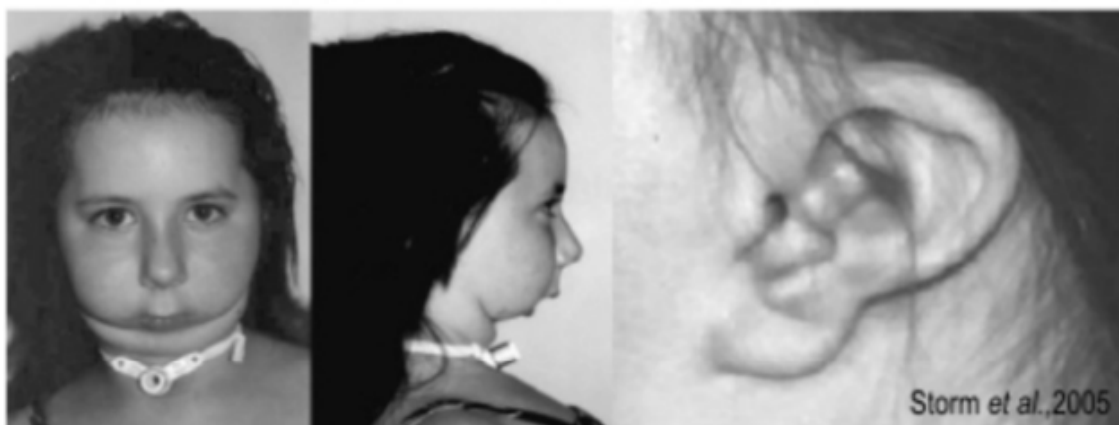


Figura 1. Paciente típico da síndrome Aurículo-Condilar, mostrando micrognatia grave e bochechas proeminentes. Detalhe da malformação da orelha externa (*question mark ear*). Modificado de STORM e col (2005).

Há uma grande variabilidade clínica na síndrome aurículo-condilar, tanto inter quanto intra-familiar. Nos casos mais graves, pode estar associada a dificuldades respiratórias, com necessidade de traqueostomia; nestes casos,

apnéa e distúrbios do sono não são raros (STORM *et al.*, 2005). Outros relatos descrevem alterações clínicas menos freqüentes, como diminuição da audição, hipotonia e atraso no desenvolvimento motor e da linguagem, sendo que na presença das duas últimas, PRIOLO e col (2000) sugerem tratar-se de outra entidade que não a síndrome aurículo-condilar (GUION-ALMEIDA *et al.*, 2002; STORM *et al.*, 2005; MASOTTI *et al.*, 2008).

Considerando a origem embrionária das principais estruturas afetadas na ACS (como ATM, orelhas e côndilo mandibular), pode-se classificar esta síndrome como uma doença de primeiro e segundo arcos faríngeos embrionários.

Observa-se que alguns sinais clínicos da ACS, tais como malformações auriculares e micrognatia, se sobrepõem ao de outras síndromes craniofaciais de primeiro e segundo arcos faríngeos, como Treacher Collins (TCS; OMIM #154500), Townes-Brocks (OMIM #107480) e principalmente espectro óculo-aurículo vertebral (OAVS; OMIM #164210). Estas síndromes devem ser, portanto, consideradas no diagnóstico diferencial. A identificação do alelo associado a ACS será não apenas importante para se conhecer os mecanismos causais desta condição, mas também poderá ser de grande ajuda no diagnóstico de casos principalmente atípicos.

## **1.2. Desenvolvimento embrionário**

As principais características inerentes à síndrome aurículo-condilar são, como mencionadas anteriormente, alterações da ATM, orelhas, côndilo mandibular e mandíbula. Essas estruturas são originadas do primeiro e

segundo arcos faríngeos (também chamados de arcos branquiais) (Figura 2), que por sua vez são compostos por células da crista neural (NCC), com um centro de células de origem mesodérmica (SADLER, 1995; GRAHAM, 2003; PASSOS-BUENO *et al.*, 2009).

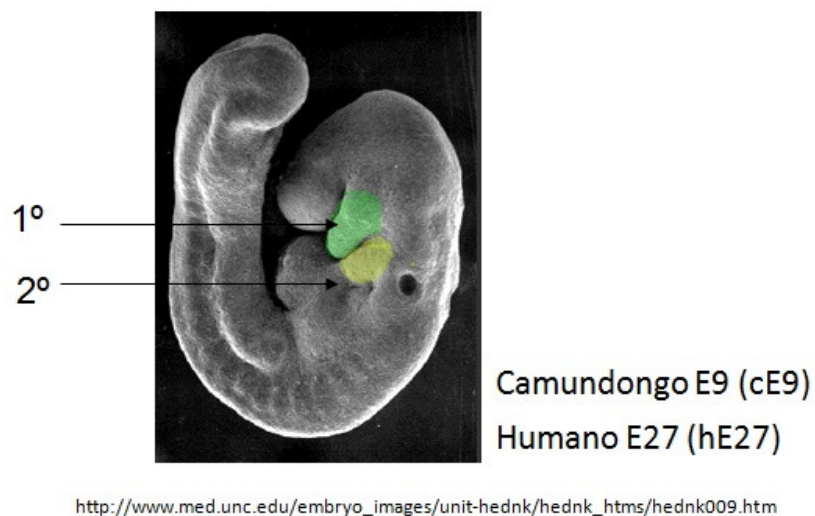


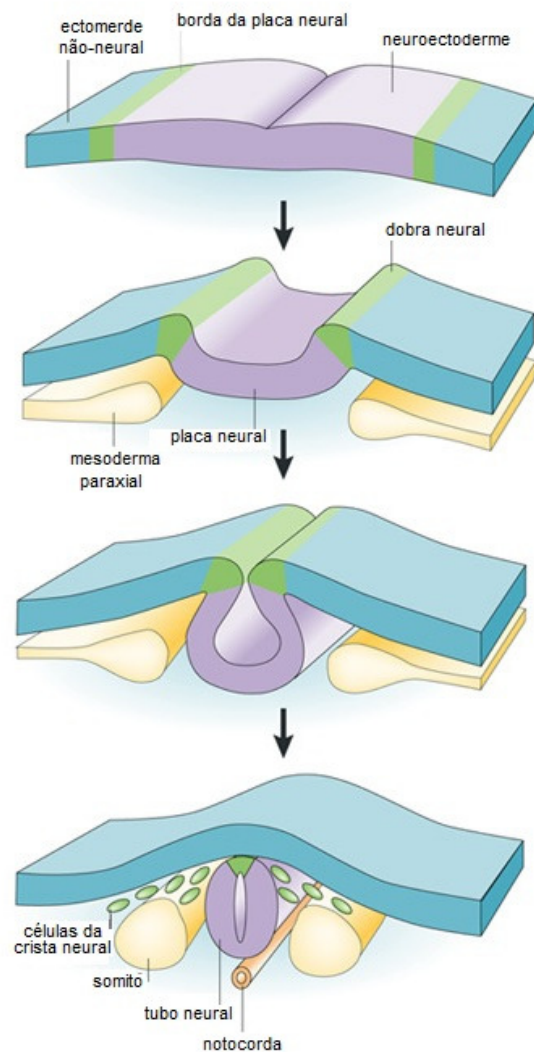
Figura 2. Microscopia eletrônica de embrião de camundongo (cE9), equivalente ao estágio hE27 em humanos, com primeiro e segundo arcos faríngeos apontados.

NCCs são geradas da borda entre a ectoderme neural e não-neural e uma complexa via de sinalização coordena sua indução, migração e proliferação (Figura 3) (RUFFINS & BRONNER-FRASER, 2000; KNECHT & BRONNER-FRASER, 2002; CRANE & TRAINOR, 2006).

As NCC são divididas em tronco, circunfaríngeas e cranial, de acordo com sua origem. As células da crista neural cranial partem dos rombômeros e vão povoar os arcos faríngeos. Em cada arco faríngeo, as células da crista neural irão contribuir para um conjunto específico de elementos esqueléticos (LARSEN, 1997; CARLSON, 2005). O primeiro arco faríngeo tem dois



componentes, a proeminência maxilar e a proeminência mandibular. O segundo arco faríngeo origina o estribo, processo estilóide e o menor corno do osso hióide, enquanto o corno maior do hióide é derivado do terceiro arco faríngeo. Os elementos derivados dos arcos faríngeos mais caudais (4-6) formam as cartilagens da laringe (Figura 4) (MINOUX & RIJLI, 2010).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 3. A borda da placa neural (verde) é induzida pela sinalização entre a neuroectoderme (roxo) e a ectoderme não neural (azul) e do mesoderma paraxial abaixo (amarelo). Durante a neurulação, as bordas da placa neural (dobramento neural) se elevam, ocasionando a formação do tubo neural. Células da crista neural (verde) se delaminam das pregas neurais e migram (modificada de GAMMILL & BRONNER-FRASER, 2003).

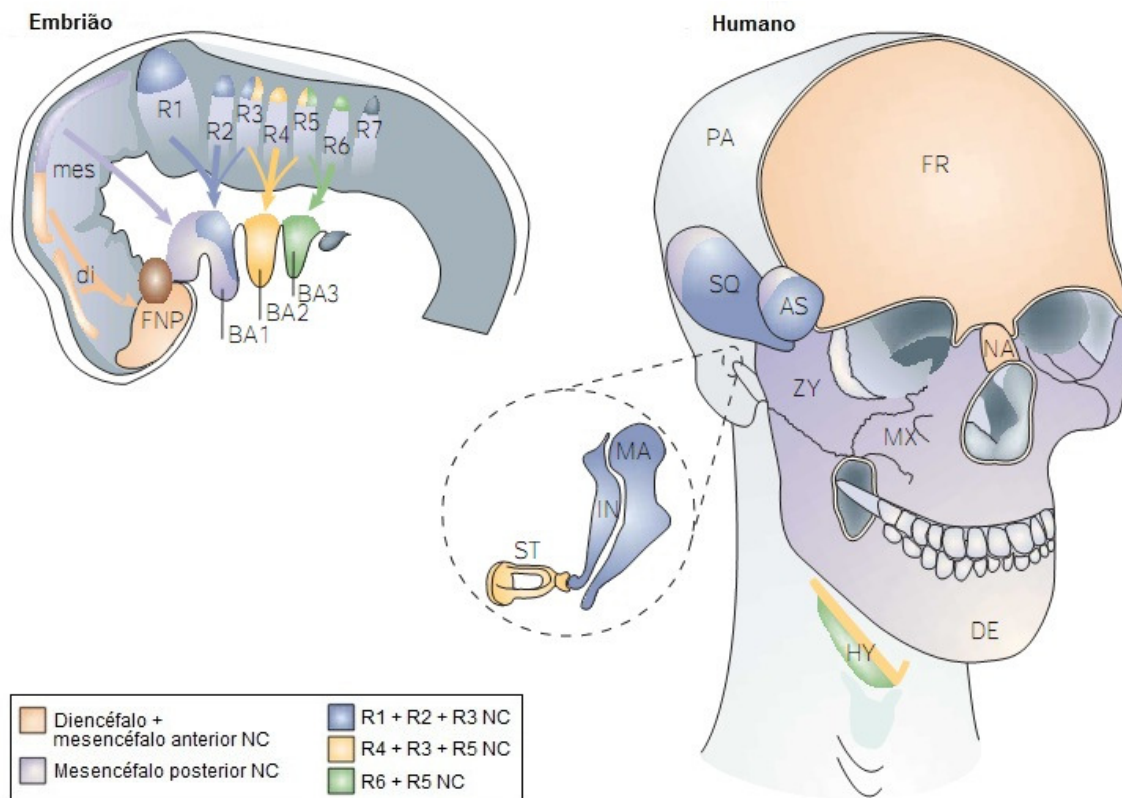


Figura 4. Na imagem do embrião, migração das células da crista neural partindo dos rombômeros para povoar os arcos faríngeos. Ao lado, (humano) principais estruturas faciais formadas a partir de populações de células da crista neural. AS, osso alisfenóide; BA1-BA3, arcos faríngeos 1-3; DE, osso dentário; di, diencefalo; FNP, processo frontonasal; FR osso frontal; HY, osso hióide; IN, incus; MA, malleus; mês, mesencefalo; MX, osso maxilar; NA, osso nasal; PA osso parietal; R1-R7 rombômeros 1-7; SQ, osso esquamosal; ST, estribo; ZY, osso zigomático. (SANTAGATI & RIJLI, 2003).

O primeiro arco faríngeo e o processo frontonasal estão envolvidos na formação facial, que tem início no decorrer da quarta semana. Na quarta semana ocorre a fusão dos dois processos mandibulares, derivados do primeiro arco branquial, na linha média. Enquanto que, na quinta semana, os processos maxilares, também derivados do primeiro arco, crescem em direção

à linha média, mas sua fusão só ocorre entre a sexta e sétima semanas (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2001).

Já a formação da orelha externa, começa com massas auriculares, advindas do mesênquima do primeiro e segundo arcos, as quais, com 41 dias de desenvolvimento embrionário, apresentam-se em número de seis (Figura 5). A fusão dessas massas auriculares formará o ouvido externo e à medida que os arcos mandibulares crescem, as orelhas são puxadas para a região respectiva da face, onde tomam posição definitiva na 12<sup>a</sup> semana (O'RAHILLY & MULLER, 1992; GARCIA & FERNÁNDEZ, 2001; CARLSON, 2005).

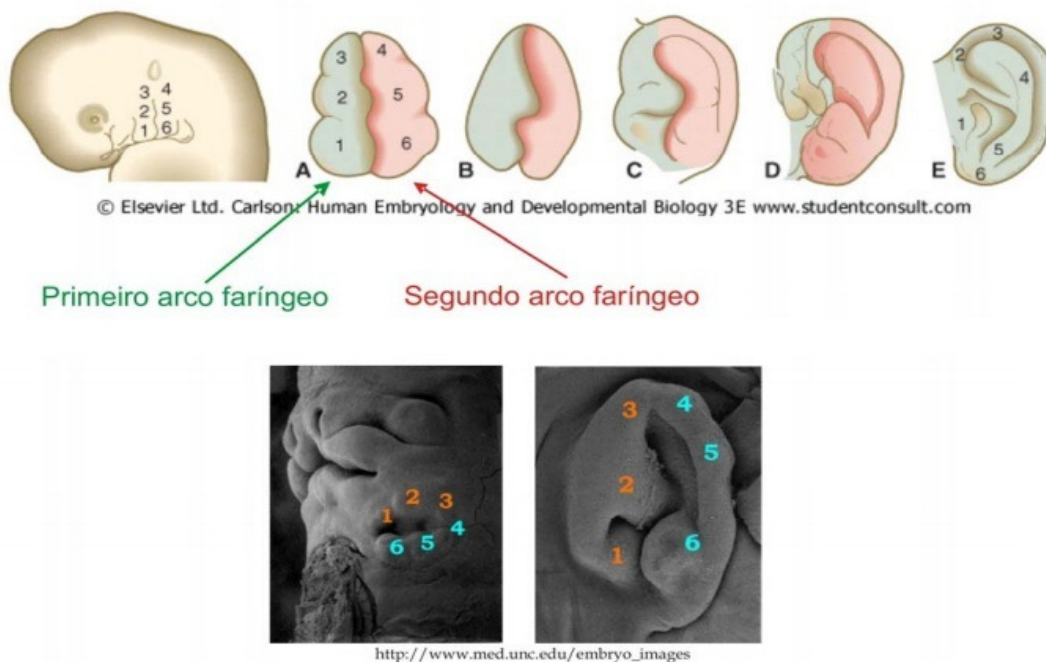


Figura 5. Interação entre os primeiro (verde) e segundo (vermelho) arcos faríngeos para a formação da orelha externa. Abaixo, microscopia eletrônica de um embrião com cinco semanas de gestação. Massas nodulares de mesênquima se organizam e se fundem para a formação da orelha externa.

Com relação ao desenvolvimento da articulação temporomandibular durante a sétima semana, esta estrutura aparece primeiro como uma condensação mesenquimal associada com o osso temporal e o côndilo mandibular. Então, entre a 9<sup>a</sup> e 11<sup>a</sup> semanas, a cavidade articular estará formada (CARLSON, 2005).

Já, a partir do quinto mês fetal, o centro de crescimento do côndilo mandibular será responsável pelo alongamento da mandíbula durante os primeiros 10 anos de vida pós-natal (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2001). Soma-se à importância do côndilo, o fato de que NAKANO e col (2009) demonstraram que lesões no côndilo reduzem o crescimento condilar e mandibular, levando a assimetria da mandíbula e deslocamento lateral.

### **1.3. Condrogênese**

Durante o desenvolvimento embrionário, a cartilagem pode seguir dois destinos: permanecer como cartilagem, a exemplo da superfície articular dos ossos, ou prover o molde do futuro osso que se desenvolverá através da ossificação endocondral (ERLEBACHER *et al.*, 1995; OLSEN *et al.*, 2000).

As células condroprogenitoras podem ser provenientes de diferentes origens, de acordo com a localização embrionária. As células da crista neural, as quais migram para os arcos faríngeos, dão origem a cartilagem e ossos da região da cabeça; o mesoderma lateral originará a cartilagem dos membros; já o esclerótomo, com células provenientes dos somitos, será responsável pela formação de vértebras e costelas (revisto em CROMBRUGGHE *et al.*, 2000).

Em uma visão geral, a formação da cartilagem ocorre a partir de uma condensação de células mesenquimais condroprogenitoras e, por meio de um complexo programa de expressão de diversos genes, culminará na diferenciação destas células em condrócitos.

De uma maneira ampla, o processo de condrogênese *in vitro* pode ser dividido em condrogênese inicial e condrogênese tardia. A fase de condrogênese inicial, aproximadamente entre 0 e 12 dias, ocorre com o comprometimento das células mesenquimais com a linhagem condrocítica e sua subsequente diferenciação em condrócitos (DAUMER *et al.*, 2004; HARTMANN, 2009). Neste período, *Sox9* atua em conjunto com dois outros membros pertencentes à família *Sox* de fatores de transcrição, *L-Sox5* (isoforma longa) e *Sox6*, para ativar a expressão de *Col2a1* (LEFEBVRE *et al.*, 1998) e cooperam na regulação positiva do gene *aggrecan* (KOCH *et al.*, 2000). *Sox9* também controla a expressão de proteínas da matriz extracelular, como *Col9a1* (AKIYAMA, 2008). Já o estágio denominado tardio da diferenciação condrocítica (também chamado de pós-mitótico tardio), que é considerado aproximadamente a partir do 12º dia da diferenciação condrogênica *in vitro* (DAUMER e col., 2004), é caracterizado pelo aumento do volume celular dos condrócitos (hipertrofia dos condrócitos), produção de colágeno tipo X e uma concomitante diminuição na síntese dos colágenos tipos II, IX e XI (SCHMID & LINSENMAYER, 1985; LINSENMAYER, 1991; HARTMANN, 2009). Outros fatores de transcrição como *Runx2* e *Runx3* também contribuem nessa fase para a promoção da maturação dos condrócitos hipertróficos (YOSHIDA & KOMORI, 2005).

Além do citado, diversas outras moléculas fazem parte de vias de sinalização envolvidas no processo de diferenciação condrogênica, como *fibroblast growth factors (FGFs)*, *insulin-like growth factor 1*, *Indian hedgehog (Ihh)* e suas ações são controladas extra e intra-celularmente (ERLEBACHER *et al.*, 1995; MUNDLOS & OLSEN, 1997a,b), mas que não serão aqui referidos uma vez que não são o tema principal desta dissertação. Informações adicionais podem ser vistas em CROMBRUGGHE e col (2000) e SHUM & NUCKOLLS (2002).

#### 1.4. **Côndilo mandibular**

O côndilo mandibular é uma estrutura da ATM, a qual apresenta anormalidades freqüentemente encontradas nos casos de ACS. A cartilagem condilar é do tipo articular e exibe características biológicas particulares, diferindo de todas as outras pertencentes à mesma classe (GARANT, 2003 revisto em SHEN & DARENDELILER, 2005).

É definida como uma cartilagem secundária por ser formada depois de várias outras articulações sinoviais. Presente durante toda a vida pós-natal, a cartilagem condilar tem uma capacidade multidirecional para o crescimento e remodelamento, podendo, ao contrário das outras cartilagens articulares, adaptar-se às mudanças mecânicas ou posicionais, por alterações ou regenerações na condrogênese e subseqüentemente por ossificação endocondral (SAKAMOTO & TAKANO, 2002; SHEN & DARENDELILER, 2005; SUDA *et al.*, 1999; MEIKLE, 2002 revisto em SHEN & DARENDELILER, 2005).

O côndilo   recoberto por uma camada fibrocartilaginosa na qual seus componentes variam conforme idade e região condilar.

Em idade jovem, pequenas células indiferenciadas são encontradas na camada mais profunda da fibrocartilagem, denominada camada de reserva celular. Entre essa última camada e o osso subcondral, há uma camada de cartilagem hialina, que consiste de várias camadas de condrócitos, com sucessivas camadas de condrócitos hipertróficos (SHARAWY, 2000).

No côndilo maduro poucos vestígios de cartilagem são encontrados e a estrutura torna-se calcificada (SHARAWY, 2000). No processo de ossifica o endocondral, os condrócitos hipertróficos sintetizam fosfatase alcalina e ocorre a calcifica o da matriz cartilaginosa, iniciando o processo de transi o da condrogênese para osteog nese (LUDER *et al.*, 1988; MEIKLE, 2002 revisto em SHEN & DARENDELILER, 2005). Os condrócitos morrem devido a não difusão dos nutrientes e espaços são formados devido   quebra da matriz, o que permite a invasão vascular trazendo progenitores osteogênicos e células-tronco da medula óssea (CANCEDDA *et al.*, 2000; GARANT, 2003 revisto em SHEN & DARENDELILER, 2005). A via de diferencia o condrogênica ou osteog nica está relacionada, dentre outras,   fun o articular do côndilo, uma vez que na ausência de funcionalidade, a maturaco dos condrócitos ocorre rapidamente induzindo a forma o óssea (KANTOMAA & HALL, 1991; TAKAHASHI *et al.*, 1995 revisto em SHEN & DARENDELILER, 2005).

Todo o processo de condrogênese, com subsequente osteog nese,   regulado por fatores de crescimento extracelulares que sinalizam a diferencia o, prolifera o e maturaco celular. (SHUM & NUCKOLLS, 2002 revisto em SHEN & DARENDELILER, 2005).

### 1.5. Aspectos genéticos da ACS

Como mencionado anteriormente, o gene causador da ACS ainda não é conhecido. O primeiro estudo genético relatado dessa síndrome foi realizado pelo nosso grupo. Sugerimos, por meio de análise de ligação, que o alelo associado à ACS esteja mapeado em 1p21.1-q23.3 (ACS1). Observamos ligação destes marcadores e a doença somente em uma das duas famílias estudadas, indicando heterogeneidade genética para o fenótipo da ACS. À família para a qual não foi encontrada ligação com o locus no cromossomo 1, foi atribuído o termo ACS2 (MASOTTI *et al.*, 2008).

A região 1p21.2-q23.3 inclui a região centromérica e possui 63Mb (UCSC, GRCh37hg19). Há pelo menos 1004 genes nesta região (*MapViewer Build 37.2* - NCBI).

Na região candidata, MASOTTI e col (2008) propõem dois genes que poderiam estar relacionados com a ACS, devido a seus papéis durante o desenvolvimento embrionário: *NOTCH2* e *TBX15*.

Contudo, em um estudo recente, ISIDOR e col (2011) mostraram que mutações em heterozigose no gene *NOTCH2* são a principal causa da Síndrome Hajdu-Cheney, uma doença esquelética rara caracterizada pela presença de anomalias faciais, osteoporose e doenças periodontais. Já para o gene *TBX15*, foram encontradas mutações patogênicas em pacientes com Síndrome de Cousin, uma doença de herança autossômica recessiva que se caracteriza por dismorfismo craniofacial, hipoplasia da escápula e pélvis e



baixa estatura (OMIM ID #260660). As mutações encontradas parecem causar degradação precoce da proteína codificada por *TBX15* (LAUSCH *et al.*, 2008).

Uma série de outros genes pode estar envolvida, direta ou indiretamente, com a causa da síndrome aurículo-condilar quando se considera a histologia e o desenvolvimento embrionário das estruturas mais freqüentemente alteradas:

- Fatores que regulam a proliferação do mesênquima e dos condrócitos, como *PCNA* (*Proliferating cell nuclear antigen*; OMIM #176740), *IGF-I* (*Insulin-like growth factor I*; OMIM #147440), *TGF-beta1* (*Transforming growth factor, beta-1*; OMIM #190180), *FGF-2* (*Fibroblast growth factor 2*; OMIM #134920);

- Fatores que regulam a maturação e diferenciação de condrócitos, como *Runx2* (*Runt-related transcription factor 2*; OMIM #600211);

- Fatores de crescimento durante o remodelamento adaptativo da cartilagem condilar mandibular, como *VEGF* (*Vascular endothelial growth factor*; OMIM #192240), colágeno tipo X (OMIM #120110), *IGF-I*, *FGF-2*;

- Genes envolvidos no desenvolvimento embrionário de primeiro e segundo arcos faríngeos ou estruturas derivadas, como *Dlx2* (*Distal-less homeobox 2*; OMIM #126255), *Hoxa2* (*Homeobox 2*; OMIM #604685) e *ET-1* (*Endothelin 1*; OMIM #131240); *BMP-4* e *BMP-7* (*Bone morphogenetic protein 4* e *7*; OMIM #112262 e OMIM #112267, respectivamente).

Os genes citados não se localizam na região candidata 1p21.1-q23.3, mas oferecem uma noção da complexidade dos processos biomoleculares

envolvidos na formação das estruturas afetadas na ACS e podem corresponder a um dos genes responsáveis pela ACS2.

Famílias com vários afetados por ACS são extremamente raras. Assim sendo, o estudo dos dois casos familiares de ACS que já caracterizamos clinicamente, será uma excelente oportunidade para tentarmos identificar os mecanismos primários responsáveis por esta síndrome. A identificação do gene responsável pelas diferentes formas de ACS irá tornar mais fácil e preciso o diagnóstico desta patologia. Além disso, nosso estudo poderá identificar genes envolvidos na formação do côndilo mandibular, contribuindo para o entendimento das vias biomoleculares que levam à formação dessa estrutura. Isto será importante, também, para estudos de outras síndromes de primeiro e segundo arcos faríngeos, bem como para estudos evolutivos, uma vez que a cartilagem condilar faz parte da ATM, estrutura que filogeneticamente apareceu nos mamíferos (CARLSON, 2005).

## 2. OBJETIVOS

---

O objetivo do presente trabalho é identificar as mutações responsáveis por ACS1 e ACS2. Na tentativa de atingirmos este objetivo principal, nos propusemos a realizar os seguintes objetivos específicos:

2.1. Verificar se ACS1 e ACS2 são decorrentes de micro-rearranjos genômicos;

2.2. Selecionar 2 genes candidatos da região 1p21.1-q23.3, onde está mapeado o locus ACS1. Esta seleção envolveu a análise de transcriptoma de um paciente ACS1 em comparação com um controle, durante o processo de diferenciação condrogênica *in vitro*;

2.3. Seqüenciamento dos dois genes candidatos para a causa de ACS1;

2.4. Mapear o locus responsável pela ACS2.

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

---

1) Os pacientes com ACS1 e ACS2 não mostraram regiões com micro-rearranjos (CNVs) pelo estudo de *array*-CGH. No entanto, pelas características de resolução deste tipo de análise, é possível que deleções ou duplicações menores que 400 Kb não tenham sido identificadas e, portanto, não podemos descartar totalmente este mecanismo como responsável por este fenótipo;

2) Mutações nos dois genes selecionados não parecem ser responsáveis pela forma ACS1;

3) Consideramos que nossa estratégia de análise de transcriptoma durante o processo de diferenciação condrogênica *in vitro*, para busca e seleção de genes candidatos, não foi satisfatória e que, com a atual possibilidade de realizar o seqüenciamento do exoma (NGS), utilizaremos esta abordagem para a identificação do alelo causador de ACS1;

4) Mapeamos o segundo locus associado à ACS2 e assim confirmamos a ocorrência de heterogeneidade genética para ACS, como proposto por estudos anteriores de nosso grupo.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Abecasis, G. R., S. S. Cherny, *et al.* (2002). "Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees." *Nature genetics* 30(1): 97-101.
2. Adams, S. L., K. M. Pallante, *et al.* (1991). "Rapid induction of type X collagen gene expression in cultured chick vertebral chondrocytes." *Experimental cell research* 193(1): 190-197.
3. Akiyama, H. (2008). "Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9." *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 18(3): 213-219.
4. Albright, S. R. and R. Tjian (2000). "TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas." *Gene* 242(1-2): 1-13.
5. Al-Qattan, M. M. (1998). "Cosman (question mark) ear: congenital auricular cleft between the fifth and sixth hillocks." *Plastic and reconstructive surgery* 102(2): 439-441.
6. Bell, B. and L. Tora (1999). "Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes." *Experimental cell research* 246(1): 11-19.
7. Bueno, D. F., I. Kerkis, *et al.* (2009). "New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients." *Tissue engineering. Part A* 15(2): 427-435.
8. Cancedda, R., P. Castagnola, *et al.* Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol*, v.44, n.6, p.707-14. 2000.
9. Carlson, B.M.. *Human Embryology and Developmental Biology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Elsevier: Philadelphia, PA, USA. 2005.
10. Cho, H., T. Kozasa, *et al.* (2003). "Pericyte-specific expression of Rgs5: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation." *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(3): 440-442.
11. Cosman, B., H. Bellin, *et al.* (1970). "The Question Mark ear." *Plastic and reconstructive surgery* 46(5): 454-457.

12. Crane, J. F. and P. A. Trainor (2006). "Neural crest stem and progenitor cells." *Annual review of cell and developmental biology* 22: 267-286.
13. Daumer, K. M., A. C. Tufan, *et al.* (2004). "Long-term in vitro analysis of limb cartilage development: involvement of Wnt signaling." *Journal of cellular biochemistry* 93(3): 526-541.
14. de Crombrughe, B., V. Lefebvre, *et al.* (2000). "Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation." *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 19(5): 389-394.
15. Erlebacher, A., E. H. Filvaroff, *et al.* (1995). "Toward a molecular understanding of skeletal development." *Cell* 80(3): 371-378.
16. Gammill, L. S. and M. Bronner-Fraser (2003). "Neural crest specification: migrating into genomics." *Nature reviews. Neuroscience* 4(10): 795-805.
17. Garcia, S.M.L., Fernández C.G.. *Embriologia*. 2ª Ed. Editora Artmed: Porto Alegre. 2001.
18. Garant, P.R.. *Oral cells and tissues*. Chicago, IL: Quintessence. 2003.
19. Ge, Y.; Dudoit, S; Speed, T.P. (2003). "Resampling-based Multiple Testing for Microarray Data Analysis." *Sociedad de Estadística e Investigación Operativa* 12(1): 1-77.
20. Gerkes, E. H., C. M. van Ravenswaaij, *et al.* (2008). "Question mark ears and post-auricular tags." *European journal of medical genetics* 51(3): 264-267.
21. Graham, A. (2003). "Development of the pharyngeal arches." *American journal of medical genetics. Part A* 119A(3): 251-256.
22. Gorlin, R.J.; Cohen, M.M.; Levin, L.S. (1990) *Syndromes of the head and neck*. Oxford University Press 3rd Ed. Oxford, UK
23. Guion-Almeida, M. L., N. M. Kokitsu-Nakata, *et al.* (1999). "Auriculo-condylar syndrome: further evidence for a new disorder." *American journal of medical genetics* 86(2): 130-133.
24. Guion-Almeida, M. L., R. M. Zechi-Ceide, *et al.* (2002). "Auriculo-condylar syndrome: additional patients." *American journal of medical genetics* 112(2): 209-214.
25. Hampsey, M. (1998). "Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery." *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62(2): 465-503.

26. Hartmann, C. (2009). "Transcriptional networks controlling skeletal development." *Current opinion in genetics & development* 19(5): 437-443.
27. Hoffmann, K. and T. H. Lindner (2005). "easyLINKAGE-Plus--automated linkage analyses using large-scale SNP data." *Bioinformatics* 21(17): 3565-3567.
28. Hong, F., R. Breitling, *et al.* (2006). "RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis." *Bioinformatics* 22(22): 2825-2827.
29. Hunt, P., M. Gulisano, *et al.* (1991). "A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head." *Nature* 353(6347): 861-864.
30. Hunt, P., J. Whiting, *et al.* (1991). "The branchial Hox code and its implications for gene regulation, patterning of the nervous system and head evolution." *Development Suppl* 2: 63-77.
31. Inada, M., T. Yasui, *et al.* (1999). "Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 214(4): 279-290.
32. Irizarry, R. A., B. Hobbs, *et al.* (2003). "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data." *Biostatistics* 4(2): 249-264.
33. Isidor, B., P. Lindenbaum, *et al.* (2011). "Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis." *Nature genetics* 43(4): 306-308.
34. Jampol, M., G. Repetto, *et al.* (1998). "New syndrome? Prominent, constricted ears with malformed condyle of the mandible." *American journal of medical genetics* 75(5): 449-452.
35. JOHNSON, J. M. *et al.* (2011) "Syndromes of the first and second branchial arches, part 2: syndromes". *AJNR. American journal of neuroradiology*, v. 32, n. 2, p. 230-7.
36. Johnstone, R. W., M. H. Kershaw, *et al.* (1998). "Isotypic variants of the interferon-inducible transcriptional repressor IFI 16 arise through differential mRNA splicing." *Biochemistry* 37(34): 11924-11931.
37. Kantomaa, T. e B. K. Hall. On the importance of cAMP and Ca<sup>++</sup> in mandibular condylar growth and adaptation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.99, n.5, May, p.418-26. 1991.

38. Knecht, A. K. and M. Bronner-Fraser (2002). "Induction of the neural crest: a multigene process." *Nature reviews. Genetics* 3(6): 453-461.
39. Koch, M., J. R. Murrell, *et al.* (2000). "A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization." *The Journal of cell biology* 151(2): 221-234.
40. Kruglyak, L., M. J. Daly, *et al.* (1996). "Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach." *American journal of human genetics* 58(6): 1347-1363.
41. Krumlauf, R. (1993). "Hox genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head." *Trends in genetics : TIG* 9(4): 106-112.
42. Larsen, W.J.. *Human embryology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Ed. New York: Churchill Livingstone. 1997.
43. Lausch, E., P. Hermanns, *et al.* (2008). "TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in Cousin syndrome." *American journal of human genetics* 83(5): 649-655.
44. Lefebvre, V., P. Li, *et al.* (1998). "A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene." *The EMBO journal* 17(19): 5718-5733.
45. Lefebvre, V. and P. Smits (2005). "Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation." *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 75(3): 200-212.
46. Linsenmayer, T. F., Q. A. Chen, *et al.* (1991). "Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins." *Development* 111(1): 191-196.
47. Luder, H. U., C. P. Leblond, *et al.* Cellular stages in cartilage formation as revealed by morphometry, radioautography and type II collagen immunostaining of the mandibular condyle from weanling rats. *Am J Anat*, v.182, n.3, Jul, p.197-214. 1988.
48. Lumsden, A. and R. Krumlauf (1996). "Patterning the vertebrate neuraxis." *Science* 274(5290): 1109-1115.
49. Masotti, C., K. G. Oliveira, *et al.* (2008). "Auriculo-condylar syndrome: mapping of a first locus and evidence for genetic heterogeneity." *European journal of human genetics : EJHG* 16(2): 145-152.



50. Meikle, C.M.. Craniofacial development, growth and evolution. Norfolk, VA: Bateson. 2002.
51. Miller, S. A., D. D. Dykes, *et al.* (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic acids research* 16(3): 1215.
52. Minoux, M. and F. M. Rijli (2010). "Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development." *Development* 137(16): 2605-2621.
53. Montenegro, G., E. Powell, *et al.* (2011). "Exome sequencing allows for rapid gene identification in a Charcot-Marie-Tooth family." *Annals of neurology* 69(3): 464-470.
54. Mueller, M. B. and R. S. Tuan (2008). "Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells." *Arthritis and rheumatism* 58(5): 1377-1388.
55. Mundlos, S. and B. R. Olsen (1997a). "Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways." *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11(2): 125-132.
56. Mundlos, S. and B. R. Olsen (1997b). "Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis." *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11(4): 227-233.
57. Nakano, M., T. Fujita, *et al.* (2009). "Effects of mandibular advancement on growth after condylectomy." *Journal of dental research* 88(3): 261-265.
58. Ng, S. B., K. J. Buckingham, *et al.* (2010). "Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder." *Nature genetics* 42(1): 30-35.
59. O'Connell, J. R. and D. E. Weeks (1998). "PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis." *American journal of human genetics* 63(1): 259-266.
60. Okamoto, O., S. Fujiwara, *et al.* (1999). "Dermatopontin interacts with transforming growth factor beta and enhances its biological activity." *The Biochemical journal* 337 ( Pt 3): 537-541.
61. Olsen, B. R., A. M. Reginato, *et al.* (2000). "Bone development." *Annual review of cell and developmental biology* 16: 191-220.

62. Onyia, J. E., T. A. Libermann, *et al.* (1997). "Parathyroid hormone (1-34)-mediated interleukin-6 induction." *Journal of cellular biochemistry* 67(2): 265-274.
63. O'Rahilly, R., Müller, F. *Human embryology and teratology*. New York: Wiley-Liss. 1992.
64. Pala, D., M. Kapoor, *et al.* (2008). "Focal adhesion kinase/Src suppresses early chondrogenesis: central role of CCN2." *The Journal of biological chemistry* 283(14): 9239-9247.
65. Passos-Bueno, M. R., C. C. Ornelas, *et al.* (2009). "Syndromes of the first and second pharyngeal arches: A review." *American journal of medical genetics. Part A* 149A(8): 1853-1859.
66. Pelttari, K., E. Steck, *et al.* (2008). "The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis." *Injury* 39 Suppl 1: S58-65.
67. Prince, V. and A. Lumsden (1994). "Hoxa-2 expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest." *Development* 120(4): 911-923.
68. Priolo, M., M. Lerone, *et al.* (2000). "Question mark ears, temporomandibular joint malformation and hypotonia: auriculo-condylar syndrome or a distinct entity?" *Clinical dysmorphology* 9(4): 277-280.
69. Ruffins, S. and M. Bronner-Fraser (2000). "A critical period for conversion of ectodermal cells to a neural crest fate." *Developmental biology* 218(1): 13-20.
70. Sadler, T.W.. *Langman's Medical Embryology*. 7<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins: Baltimore, Maryland, USA. 1995.
71. Sakamoto, Y. e Y. Takano. Morphological influence of ascorbic acid deficiency on endochondral ossification in osteogenic disorder Shionogi rat. *Anat Rec*, v.268, n.2, Oct 1, p.93-104. 2002.
72. Santagati, F. and F. M. Rijli (2003). "Cranial neural crest and the building of the vertebrate head." *Nature reviews. Neuroscience* 4(10): 806-818.
73. Schmid, T. M. and T. F. Linsenmayer (1985). "Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues." *The Journal of cell biology* 100(2): 598-605.
74. Senggen, E., T. Laswed, *et al.* (2011). "First and second branchial arch syndromes: multimodality approach." *Pediatric radiology* 41(5): 549-561.
75. Sharawy M.. *Developmental and clinical anatomy and physiology of the temporomandibular joint* in Fonseca J.R.. *Oral and maxillofacial surgery –*

temporomandibular disorders. 1<sup>st</sup> ed. W.B. Saunders Company: Philadelphia, Pennsylvania. Volume 4. 2000.

76. Shkalim, V., N. Eliaz, *et al.* (2008). "Autosomal dominant isolated question mark ear." *American journal of medical genetics. Part A* 146A(17): 2280-2283.
  77. Shukunami, C., K. Ishizeki, *et al.* (1997). "Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro." *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12(8): 1174-1188.
  78. Shum L., Nuckolls G.. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res* 4:94-106. 2002.
  79. Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3: Article3.
  80. Storm, A. L., J. M. Johnson, *et al.* (2005). "Auriculo-condylar syndrome is associated with highly variable ear and mandibular defects in multiple kindreds." *American journal of medical genetics. Part A* 138A(2): 141-145.
  81. Suda, N., S. Shibata, *et al.* Parathyroid hormone-related protein regulates proliferation of condylar hypertrophic chondrocytes. *J Bone Miner Res*, v.14, n.11, Nov, p.1838-47. 1999.
  82. Takahashi, I., I. Mizoguchi, *et al.* Effects of lateral pterygoid muscle hyperactivity on differentiation of mandibular condyles in rats. *Anat Rec*, v.241, n.3, Mar, p.328-36. 1995.
  83. Thiele, H. and P. Nurnberg (2005). "HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes." *Bioinformatics* 21(8): 1730-1732.
  84. Uuspaa, V. (1978). "Combined bilateral external ear deformity and hypoplastic mandible. Case report." *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery* 12(2): 165-167.
  85. Yoshida, C. A. and T. Komori (2005). "Role of Runx proteins in chondrogenesis." *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 15(3): 243-254.
-