

Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu (IBB)
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética)

BRUNO FAULIN GAMBA

Análise molecular de pacientes com holoprosencefalia

Botucatu
2015

Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu (IBB)
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Análise molecular de pacientes com holoprosencefalia

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas Genética do Instituto de Biociências de Botucatu
(IBB) para obtenção do título de Doutor.

Aluno: Bruno Faulin Gamba

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gamba, Bruno Faulin.

Análise molecular de pacientes com holoprosencefalia /
Bruno Faulin Gamba. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

Capes: 20205007

1. cérebro - Doenças. 2. Sistema nervoso central -
Anomalias. 3. Anomalias humanas. 4. Genética molecular
humana.

Palavras-chave: ArrayCGH; MLPA; holoprosencefalia.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **João e Lane**, por todo o esforço realizado para que não me faltasse nada durante esta importante fase da minha vida, por entenderem minhas escolhas e pelo incentivo diário. Vocês são exemplos de vida e dedicação. Amo vocês!

Às minhas queridas irmãs, **Mariana e Beatriz**, por sempre estarem do meu lado. A torcida faz toda diferença, vocês me enchem de paz e coragem. Amo vocês!

AGRADECIMENTO

À **Deus**, por conceder-me paz e sabedoria para conduzir este trabalho;

À **Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”** – Unesp e todo seu corpo docente e funcionário;

À seção de **Pós-Graduação e seus funcionários** pela dedicação e cuidado;

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP** - pela bolsa de estudo e financiamento deste projeto. Processo 2010/18740-2

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES-** pela bolsa de estudo concedida para realização do estágio no exterior;

À **Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo**, minha orientadora. Obrigado pela confiança, orientação, ensinamento e incentivo constante em todos os momentos e muito obrigado por ser esta pessoa dedicada e compreensiva e pela amizade construída;

À **Dra. Véronique David e sua equipe** de laboratório na Universidade de Rennes – França – pelo ensinamento e oportunidade de crescimento e amadurecimento pessoal e profissional;

Aos **pacientes e seus familiares**, por aceitarem participar deste estudo. Sem vocês este projeto não teria saído do papel;

Ao **Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais** – Centrinho – USP, e seus professores e funcionários, por tornar este trabalho possível;

Ao **Dr. Antônio Richieri-Costa** pela colaboração e dedicação durante a realização deste trabalho. Seu olhar clínico foi fundamental, obrigado!

Ao **Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira e Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis** pela dedicação e rigor na análise e nas orientações durante a qualificação desta tese.

Aos meus amigos de laboratório **Rodrigo Queizi, Cláudia, Chiara, Ana Lais, Ana Luisa, Carol, Ingrid, Luisa, Stefany, Rosana, Rubens, Tânia, Cristina, Cibele e Esiquiel** por toda ajuda concedida e pela amigável convivência.

À **Rosana Sandri** pela disponibilidade e ensinamento no laboratório.

Ao **Centro de Estudo do Genoma Humana da USP-São Paulo**, por permitir que eu desenvolvesse parte deste trabalho.

À **Dra. Carla Rosenberg** e sua equipe pela atenção, ensinamento e participação neste trabalho;

À **Roberta**, minha companheira de todas as horas. Obrigado por todo carinho, atenção, incentivo e por entender meus momentos de “stress”. Seu amor foi fundamental para eu conseguir finalizar este trabalho.

Aos meus **amigos da República 5 de paus** por estarem sempre dispostos a me conceder um lar durante minhas idas à Botucatu. Obrigado Rodrigo, André, Felipe, Bruno, Fábio, Diogo, Rafael e Valter;

À todos que ajudaram de alguma forma este trabalho;

Obrigado!

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA | i |
| LISTA DE TABELAS | iii |
| LISTA DE FIGURAS | iv |
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. HOLOPROSENCEFALIA | 18 |
| 2.1 Importância da via de sinalização Sonic Hedgehog no desenvolvimento craniofacial e holoprosencefalia | 23 |
| 2.2 Interação gênica em HPE | 26 |
| 2.3 Evidências citogenéticas em HPE | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 Objetivo geral | 34 |
| 3.2 Objetivos específicos | 34 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 Grupo amostral | 35 |
| 4.2 Análise clínica | 35 |
| 4.3 Análise molecular | 36 |
| 4.3.1 Multiplex Ligations-dependent Probe Amplification – MLPA | 36 |
| 4.3.2 Hibridização Genômica Comparativa por <i>array</i> – <i>array</i>CGH | 40 |
| 4.3.3 Multiplex PCR Liquid Chromatography – (MPLC) | 42 |
| 5. RESULTADOS | 45 |
| 5.1 Grupo amostral | 45 |
| 5.2 Avaliação molecular | 46 |
| 6. DISCUSSÃO | 55 |
| 7. CONCLUSÃO | 60 |
| REFERÊNCIAS | 61 |
| APÊNDICE A- Descrição clínica e molecular dos casos | 78 |
| APÊNDICE B - Cleft lip/palate, short stature, and developmental delay in a boy with 5,6 Mb interstitial deletion involving 10p15.3-p14 | 97 |

| | |
|--|-----|
| APÊNDICE C - Microrearrangements in individuals within the holoprosencephaly spectrum | 107 |
| APÊNDICE D - Chromotripsis with at least 12 breaks at 1p36.33-p35.3 in a Brazilian boy with multiple congenital anomalies | 122 |
| APÊNDICE E - PSDE, Processo BEX: 12276/12-0 | 131 |
| ANEXO - Comitê de Ética em Pesquisa (Nº 111/2011) | 138 |

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| ADNPM | Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor |
| <i>array</i> CGH | Microarray-based Comparative Genomic Hybridization |
| BMP | bone morphogenetic protein |
| CNV | Copy Number Variation |
| del | deleção |
| DHH | Desert Hedgehog |
| DISP1 | dispatched homolog 1 (Drosophila) |
| DLGAP1 | discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1 |
| dup | duplicação |
| E | Estatura |
| EM | Estatura ao Nascimento |
| FLP | Fissura de Lábio e/ou Palato |
| FOXH1 | forkhead box H1 |
| GLI2 | GLI family zinc finger 2 |
| HPE | Holoprosencefalia |
| HPLC | High-performance Liquid Chromatography |
| ICMU | Incisivo Central Maxilar Único |
| IHH | Indian Hedgehog |
| Kb | Kilo base |
| Mb | Mega base |
| MIHF | Medium Inter-hemispheric Fusion |
| MMCC | Malformação Multipla Congênita Complexa |
| MLPA | Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification |
| MPLC | Multiplex PCR Liquid Chromatography |
| NDC80 | NDC80 kinetochore complex component |
| NODAL | nodal growth differentiation factor |
| P | Peso |
| pb | parer de base |
| PC | Perímetro Cefpalico |
| PN | Peso ao Nascimento |
| PT | Perímetro Torácico |
| PTCH1 | patched gene family, receptor for sonic hedgehog gene. |

| | |
|---------|--|
| SHH | Sonic Hedgehog |
| SIX3 | SIX homeobox 3 |
| SMCHD1 | structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1 |
| SNC | Sistema NervosoCentral |
| TGIF | TGFB-induced factor homeobox 1 |
| WNT | wingless-type MMTV integration site family |
| XLMR | X-LinQed Mental Retardation |
| ZDHHC15 | zinc finger, DHHC-type containing 15 |
| ZIC2 | Zic family member 2 |

LISTA DE TABELA

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Classificação anatômica dos diferentes tipos de HPE e sua gravidade. | 20 |
| Tabela 2: Principais genes relacionados a HPE e suas contribuições no fenótipo. | 28 |
| Tabela 3: Sondas do Kit <i>SALSA MLPA P187-B1 holoprosencephaly</i> . | 38 |
| Tabela 4: Sondas do Kit <i>SALSA MLPA probemix P036-E1 Human-telomere-3</i> . | 39 |
| Tabela 5: Sequência dos <i>primers</i> utilizados na análise de MPLC e o tamanho do respectivo fragmento gerado. | 43 |
| Tabela 6. Mix da reação da PCR e o respectivo ciclo. | 43 |
| Tabela7: Relação das deleções/duplicações encontradas por MLPA e os respectivos éxons dos genes relacionados. | 46 |
| Tabela 8: Alterações cromossômicas encontradas na análise genética através da técnica de <i>arrayCGH</i> . | 48 |
| Tabela 9: Característica clínica e gene/região cromossômicas alteradas na casuística deste trabalho. | 51 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A via de sinalização de Hedgehog envolve duas proteínas transmembrana, Patched (Ptc) e Smoothened (Smo). Ptc liga-se à Shh, ao passo que Smo atua como um transdutor de sinal. Na ausência do ligante, Ptc interage com Smo e a inibe. Esta inibição ativa Gli, o repressor de transcrição. Na presença do ligante, a interação de Ptc e Smo é alterada de forma que Smo deixa de ser inibida. A proteína Gli entra no núcleo celular e age como ativador e transcrição.... 25
- Figura 2:** Idiograma dos cromossomos, em bandamento G, mostrando a localização dos genes e deleções envolvidas em HPE. Barras kakis, a esquerda, representam as deleções encontradas em HPE no cariótipo de rotina. Barras verdes, a direita, representam os rearranjos subteloméricos identificados por MLPA. Barras azuis, a direita, representam as deleções identificadas por arrayCGH: barras azuis escuro são deleções *de novo*, enquanto que as barras azuis claro são deleções herdadas..... 32
- Figura 3:** Cromatograma ilustrativo mostrando a interpretação de uma duplicação e uma deleção..... 44
- Figura 4:** Aspectos faciais de alguns pacientes com hipótese diagnóstica para HPE pertencentes a cauística deste trabalho. a) Fenótipo clássico para HPE; b) pai com hipotelorismo aparente; c) filho de B, fenótipo clássico para HPE; d) paciente com microforma da HPE; e) paciente com FLP e hipotelorismo aparente; f) irmãos com anomalias, FLP na menina e ICMU no menino; g) caso isolado de ICMU..... 45
- Figura 5:** Análise de H-MPLC para confirmar as 3 detectadas por arrayCGH no gene *SIX3* localizado em 2p21. (a e b) O primeiro pico refere-se ao gene de interesse *SIX3* e o segundo pico, pico controle, refere-se ao gene *PGDI* localizado no cromossomo 11. (a) a linha preta refere-se ao caso 8, mostrando que não houve alteração no gene *SIX3*. (b) A linha rosa refere-se ao caso 9 e a linha azul refere-se ao caso 10, mostrando duplicação no gene *SIX3* no caso 10..... 49
- Figura 6:** Análise de H-MPLC para confirmar a deleção detectada por arrayCGH no gene *RBI* localizado em 13q14.2. O primeiro pico refere-se ao gene *PGDI*, pico controle, e o segundo pico refere-se ao gene de interesse, o *RBI*. A linha rosa refere-se ao caso 13, mostrando a duplicação do gene *RBI*..... 49
- Figura 7:** a) Aspecto facial do caso 1; b) deleção no gene *SHH* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *SHH*, deletadas..... 78
- Figura 8:** Deleção no gene *SHH* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *SHH*, deletadas..... 79
- Figura 9:** a) Aspecto facial do caso 3; b) deleção no gene *SHH* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *SHH*, deletadas..... 80
- Figura 10:** a) Aspecto facial do caso 4; b) deleção no gene *TGIF* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *TGIF*, deletadas..... 81

| | |
|--|----|
| Figura 11: a) Aspecto facial do caso 5; b) duplicação no gene <i>ZIC2</i> detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene <i>ZIC2</i> , duplicados..... | 82 |
| Figura 12: a) aspecto facial do caso 6; (b,c, d, e, f, g) deleções/duplicação detectada por <i>array</i> -CGH mostrando um rearranjo complexo em 1p36.33 – 1p35.3. b) deleção de 1,7Mb em 1p36.33-p36.32; c) deleção de 1,4Mb em 1p36.32; d) deleção de 0,83Mb em 1p36.31-p36.23; e) deleção de 0,94Mb em 1p36.21; f) deleção de 3,7Mb em 1p36.13-p36.12 e g) duplicação de 5,9Mb em 1p36.11-p35..... | 83 |
| Figura 13: a) aspecto facial do caso 7; b) duplicação detectada por <i>array</i> CGH de 1,2Mb em 2p25.2-p25.1. | 87 |
| Figura 14: a) aspecto facial do caso 8; b) deleção detectada por <i>array</i> CGH de 0,01Mb em 2p21. | 88 |
| Figura 15: a) aspecto facial do caso 9; b) deleção detectada por <i>array</i> CGH de 0,012Mb em 2p21. | 89 |
| Figura 16: a) aspecto facial do caso 10; b) duplicação detectada por <i>array</i> CGH de 0,01Mb em 2p21. | 90 |
| Figura 17: a) aspecto facial do caso 11; b) deleção detectada por <i>array</i> CGH de 0,13Mb em 8p23.3. | 91 |
| Figura 18: a) aspecto facial do caso 12; b) deleção detectada por <i>array</i> CGH de 5,6Mb em 10p15.3..... | 93 |
| Figura 19: a) aspecto facial do caso 13; b) deleção detectada por <i>array</i> CGH de 0,014Mb em 13q14.2. | 94 |
| Figura 20: a) aspecto facial do caso 14; b) deleção detectada por <i>array</i> CGH de 0,18Mb em Xq13.3. | 96 |

Análise molecular de pacientes com holoprosencefalia

RESUMO

As anomalias craniofaciais são alterações do desenvolvimento do crânio e da face que podem ou não estar acompanhadas de malformações estruturais e/ou funcionais do SNC. Estas representam a quarta causa mais frequente dentre as anomalias congênitas em recém-nascidos, determinando, a seus portadores, prognóstico reservado na maioria das vezes. A holoprosencefalia é uma malformação do sistema nervoso central devido uma falha na divisão dos hemisférios direito e esquerdo do cérebro. Sabe-se que sua etiologia é múltipla e complexa. O fenótipo da HPE é bastante variável abrangendo um espectro contínuo desde manifestações graves envolvendo anomalias do cérebro e face até indivíduos clinicamente normais. Evidências genéticas são apresentadas todo ano por diversos grupos que estudam holoprosencefalia e a correlação genótipo/fenótipo continua sendo um desafio para os geneticistas. No presente estudo analisamos 124 amostras de DNA de indivíduos com diagnóstico clínico de holoprosencefalia. Todas as amostras de DNA foram submetidas a análise molecular através da técnica MLPA (SALSA[®] MLPA[®] KIT P187-B1 Holoprosencephaly e o SALSA[®] MLPA[®] KIT P036-E1 Human-telomere-3). Nesta análise, identificamos deleções/duplicações nos genes já descritos para HPE, sendo: três deleções no gene *SHH*, uma deleção no gene *TGIF* e uma duplicação no gene *ZIC2*. Dentre as 124 amostras, 26 foram selecionadas para análise por *arrayCGH*, o que permitiu a identificação de microdeleções/microduplicações em novas regiões cromossômicas, sendo elas: 2p25.2-p25.1, 2p21, 8p23.2, 10p15.3, 13q14.2 e Xq13.3. A utilização de MLPA e *arrayCGH* tem sido utilizada na pesquisa da etiologia de HPE, desde modo destacamos a eficiência destas técnicas, uma vez que metodologia utilizada neste estudo permitiu a identificação de deleções/duplicações cromossômicas nos indivíduos estudados, corroborando com a literatura e destacando novas regiões cromossômicas a serem elucidadas para compreensão da etiologia desta afecção.

Palavras chave: Holoprosencefalia, MLPA, *arrayCGH*

Molecular analysis of patients with holoprosencephaly spectrum

ABSTRACT

Craniofacial anomalies are skull development changes and face that may or may not be accompanied by structural malformations and / or functional CNS. These represent the fourth most common cause among the congenital anomalies in newborns, determining, among the patients, poor prognosis in most cases. Holoprosencephaly is a malformation of the central nervous system due to a fault in the division of right and left hemispheres of the brain. It is known that the etiology is multiple and complex. The HPE phenotype is variable including a continuous spectrum from severe manifestations involving abnormalities of the brain and face to clinically normal individuals. Genetics evidences are presented every year by groups studying holoprosencephaly and the genotype/phenotype remains a challenge for geneticists. We analyzed ADN samples from 124 patients with clinical diagnosis for holoprosencephaly. All ADN samples were subjected to molecular analysis by MLPA technique (SALSA® MLPA® KIT -B1 holoprosencephaly P187 and P036 SALSA® MLPA® KIT - Human telomere -E1 -3). Thus, we identified deletions / duplications in genes already described for HPE, such as: three deletions in the *SHH* gene, one deletion of the *TGIF* gene and one duplication in *ZIC2* gene. Among the 124 samples, 26 ADN samples were selected for analysis by *arrayCGH* allowing the identification of microdeletions/microduplications in new chromosomal regions: 2p25.2 - p25.1, 2p21, 8p23.2, 10p15.3, 13q14.2 and Xq13.3. MLPA and *arrayCGH* are often used in research on the etiology of HPE, in that way the efficiency of these techniques, since the methodology used in this study allowed the identification of deletions / duplications in chromosome individuals studied, corroborating the literature and identifying new chromosomal regions to be elucidated to understand the etiology of this disease.

Palavras chave: Holoprosencephaly, MLPA and *arrayCGH*

1. INTRODUÇÃO

A formação do complexo craniofacial é um processo que requer considerável organização. A cabeça do vertebrado é constituída de estruturas cuja formação tem início precoce no desenvolvimento. O ponto central no desenvolvimento da cabeça é o conceito de segmentação, que se manifesta no rombencéfalo e nos arcos branquiais. Em conjunto com a migração das células da crista neural, esses sistemas dão origem a grande parte da cabeça e pescoço e seus compartimentos, tanto associados quanto individualizados, tornando-se claro que o controle molecular da morfogênese embriológica reside no nível do gene (WILKIE e MORRIS-KAY, 2001).

O sistema nervoso central (SNC) é fundamental para o desenvolvimento do complexo craniofacial. O SNC surge da placa neural, uma folha homogênea de células epiteliais que formam a superfície dorsal do estagio de gástrula. À medida que a placa neural enrola-se para formar o tubo neural, o final anterior se parte em 3 vesículas. Essas vesículas são o primórdio do desenvolvimento do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. É a crista neural derivada do rombencéfalo que dará origem a maioria do mesênquima do arco branquial. A migração das células da crista neural da região do rombencéfalo resulta numa relocação ventral para dentro dos arcos branquiais. O desenvolvimento das regiões média e baixa do complexo craniofacial está intimamente associado a essas regiões branquiais. Está claro, portanto, que a crista neural derivada do rombencéfalo é essencial para a formação normal da face e pescoço (CHAI et al., 2000, WILKIE e MORRIS-KAY, 2001; MAO e NAH, 2004).

Os mecanismos do desenvolvimento craniofacial estão sob controle genético. Mas de que forma esses genes envolvidos produzem estruturas complexas, regionalizadas que formam os blocos construtores do desenvolvimento da cabeça e pescoço? É esclarecedor, portanto, considerar esses genes envolvidos na embriogênese

como codificadores de um conjunto de instruções ou regras para a montagem das peças (THOROGOOD e FERRETTI, 1992).

Atividades indutivas e sinalizadoras coordenam o crescimento do primórdio facial a partir de brotos mesênquimais indiferenciados até um intrincado mosaico de estruturas ósseas e cartilaginosas que, em conjunto com músculos e outros tecidos, constituirão o arcabouço definitivo da face (FRANCIS-WEST et al., 1998; WILKIE e MORRIS-KAY, 2001; ALAPPAT et al., 2003; PASSOS-BUENO, 2009).

Dentro do desenvolvimento craniofacial, merecem especial atenção o tipo e a localização das moléculas reguladoras que influenciam os diferentes estágios do desenvolvimento do SNC (LACBAWAN e MUENKE, 2002). Alteração na regulação do processo de desenvolvimento craniofacial, causada por fatores genéticos e/ou ambientais, pode resultar em diferentes tipos de anomalias craniofaciais, as quais incluem, principalmente, alterações estruturais de SNC, defeitos de fechamento dos ossos do crânio, defeitos de linha média craniofacial com hipotelorismo ocular (holoprosencefalia), defeitos de linha média craniofacial com hipertelorismo ocular (alterações do processo frontonasal), fissuras orofaciais típicas e atípicas e alterações de primeiro e segundo arcos faríngeos (GORLIN et al., 2001; WILKIE e MORRIS-KAY, 2001) Ao longo dos anos, os resultados de estudos morfológicos de embriões, de estudos em animais modelos (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 o regulam, incluindo aqueles que codificam fatores de transcrição, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras (FRANCIS-WEST et al., 1998; WILKIE e

MORRIS-KAY, 2001; PASSOS-BUENO, 2009). Desta forma, fatores genéticos ou ambientais agindo em qualquer uma destas etapas resultam em anormalidades cerebrais significantes que podem comprometer quaisquer umas das vesículas cerebrais (prosencefalo, mesencefalo e romboencefalo), as comissuras cerebrais (corpo caloso, comissura anterior e posterior) e estruturas associadas.

As anomalias craniofaciais são alterações do desenvolvimento do crânio e da face que podem ou não estar acompanhadas de malformações estruturais e/ou funcionais do SNC. Estas representam a quarta causa mais frequente dentre as anomalias congênitas em recém-nascidos, determinando, a seus portadores, prognóstico reservado na maioria das vezes. Durante muito tempo, considerou-se que grande parte dessas alterações resultava da formação insuficiente ou migração inadequada do mesênquima da base do crânio e da face (MAZZOLA, 1976), mas com o avanço do conhecimento, principalmente no que diz respeito ao domínio da genética molecular, sabe-se que a construção craniofacial resulta de mecanismos diversos dependentes de uma legião de genes em permanente interação (LOWE et al., 2000; MARTI e BOVOLENTA, 2002; MARAZITA e MOONEY, 2004; MERRITT, 2005).

2. HOLOPROSENCEFALIA

O prosencefalo é a porção anterior do cérebro em desenvolvimento do qual se originam a maioria das estruturas sensoriais, intelectuais e homeostáticas. Forma-se no início do estágio de gastrulação, a partir da placa neural anterior, e é composto por três estruturas morfológicas distintas: telencefalo, hipotálamo e diencefalo. A padronização e morfogênese da placa neural anterior são controladas, como em outras estruturas embrionárias, pela ação de moléculas de sinalização secretadas por um grupo específico de células conhecido como "centro de organização". Estas moléculas, incluem membros

das famílias Hh, FGF, TGFb e Wnt, e ativam cascatas intracelulares específicas que regulam a transcrição de genes alvos, instruindo os tecidos circundantes a adotar um destino específico e conferir a informação posicional para células ao longo do desenvolvimento dos eixos embrionários (WILSON e HOUART, 2004; RHINN, PICKER e BRAND, 2006; MONUKI, 2007; BECCARI, MARCO-FERRERES e POVOLENTA, 2013).

O termo holoprosencefalia (HPE) foi proposto por DeMyer et al. (1963) para definir o envolvimento dos componentes do prosencéfalo - telencéfalo e o diencéfalo e caracteriza-se por um defeito da linha média do prosencéfalo embrionário, ocasionando a falha do crescimento ou segmentação do final do tubo neural anterior (MING e MUENKE, 1998). A HPE apresenta uma alta incidência de 1:250 durante a embriogênese (MATSUNAGA e SHIOTA, 1977), mas devido à letalidade intra-uterina a frequência é de 1: 10.000 nascidos vivos (MATSUNAGA e SHIOTA, 1977; ORIOLI e CASTILHA, 2010).

De acordo com a gravidade das malformações cerebrais, são definidos quatro tipos: 1) HPE alobar, 2) HPE semilobar, 3) HPE lobar e 4) fusão inter-hemisférica média (MIHF). A classificação anatômica dos quatro tipos de HPE está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Classificação anatômica dos diferentes tipos de HPE e sua gravidade.

| | |
|-----------------------|--|
| HPE-ALOBAR | Presença de um único e pequeno ventrículo procencéfalico 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 | Lóbulos cerebrais rudimentares Divisão interhemisférica incompleta Ausência ou hipoplasia dos bulbos olfatórios ou de suas vias Ausência de corpo caloso Variação da separação dos núcleos cinzentos profundos |
| HPE-LOBAR | Lóbulo cerebral totalmente desenvolvido Distinta divisão inter-hemisférica Linha média do neocórtex frontal contínua Corpo caloso ausente, hipoplásico ou normal Separação dos núcleos cinzentos profundos |
| MIHF | Falha da separação dos lobos frontal e parietal posterior " <i>Callosal genu</i> " e esplênio normalmente formados Ausência de corpo caloso Hipotálamo e núcleos lentiformes normalmente separados Massa cinzenta heterotópica |

*Modificado de Dubourg et al., 2007

O fenótipo da HPE é bastante variável abrangendo um espectro contínuo desde manifestações graves envolvendo anomalias do cérebro e face até indivíduos clinicamente normais (COHEN, 1989). HPE é geralmente associada com anomalias faciais, tais como ciclopia, probóscide e/ou fissura lábio/palato em fenótipos mais graves. Tem sido descrito que "a face prediz o cérebro", mas esta regra não é aplicável em todos os casos. A gravidade das malformações faciais nem sempre condiz com as cerebrais. A maior parte dos portadores de HPE possui pelo menos uma anomalia facial; porém, acredita-se que 20% dos indivíduos que apresentam malformações cerebrais podem não apresentar nenhum sinal facial (DeMYER, ZEMAN e PALMER 1964;

SOLOMON et al., 2009), sugerindo que as microformas de HPE sejam indicativas de alerta para avaliação de riscos e precaução para o possível nascimento de filhos afetados (DeMYER et al., 1963; SANTIAGO, 2006; SAVASTANO et al., 2014).

Os principais macro/microsinais dismórficos do amplo espectro heterogêneo desta condição incluem:

- Diminuição do perímetro craniano;
- Agenesia ou hipoplasia da espinha nasal anterior;
- Ausência ou diminuição do ângulo frontonasal;
- Agenesia de pré-maxila;

-Anomalias oculares diversas, como hipotelorismo ocular (aproximação excessiva dos olhos), ciclopia (olho único ou parcialmente dividido na mesma órbita, neste caso caracterizando a sinoftalmia) e coloboma da íris (defeito da íris em forma de buraco de fechadura);

- Maxila, asas nasais ou nariz hipoplásicos;
- Probóscide (apêndice tubular situado acima dos olhos);
- Ausência de ponte nasal;
- Estenose da abertura nasal;
- Filtro nasal hipodesenvolvido;
- Incisivo central maxilar único (ICMU);
- Fissura labiopalatina mediana ou falsa mediana;
- Maloclusão dentária

(RICHIERI-COSTA e RIBEIRO, 2006; SANTIAGO, 2006; HENNEKAM et al., 2009; LIPINSKI et al., 2010; SOLOMON et al., 2010; BANO, 2012; JAVAD, 2013; SWATEK et al., 2013).

Hoje, é sabido que a ampliação deste universo dependia apenas de um meio mais simples e eficaz de diagnóstico, pois grande parte destas anomalias estava predita nos modelos experimentais em outros vertebrados ou em achados clínicos descritos posteriormente, como parte integrante de determinadas mutações (ROESSLER e MUENKE, 2001; RICCOMAGNO et al., 2002; COHEN, 2003; DAKUBO et al., 2003; ROESSLER et al., 2003; SCHIMMENTI et al., 2003).

Em 2003, foi descrito ainda um fenótipo singular dentro do espectro holoprosencefálico, o HPE-*like*, atualmente incorporado ao termo geral **microforma da HPE**, que surge associado ou não a outras anormalidades do processo de separação do prosencéfalo. As características fenotípicas mais comuns são: hipotelorismo isolado, fissura de lábio e/ou palato, presença de incisivo maxilar central único (IMCU) e hipoplasia de face média. É importante salientar que associações entre estes sinais, feitas de forma aleatória, são indicativas de que, até o presente momento, não há definição padronizada para este fenótipo. Pacientes diagnosticados com microforma da HPE, na maior parte dos casos, apresentam desenvolvimento cognitivo e neuropsicomotor normais (RICHIERI-COSTA e RIBEIRO, 2006; SANTIAGO, 2006).

Diversas anomalias, que até há pouco tempo não eram descritas ou relacionadas ao espectro da HPE, foram incorporadas ao diagnóstico após o advento dos exames de neuroimagem, aumentando-se assim o arsenal clínico. Dentre estas anomalias, destacam-se as anomalias estruturais do corpo caloso, marcadamente a agenesia, as anomalias da glândula pituitária, as anomalias dentárias, nasais, oculares, entre outras. (ROESSLER e MUENKE, 2001; RICCOMAGNO et al., 2002; COHEN, 2003; DAKUBO et al., 2003; ROESSLER et al., 2003; SCHIMMENTI et al., 2003; SAVASTANO et al., 2014).

Sabe-se que etiologia da HPE é heterogênea e complexa, causada por fatores

ambientais (conhecido o fator de risco para mães com diabetes gestacional e mães que usam ácido retinóico), forma sindrômica (incluindo síndrome de Smith-Lemli-Opitz), anomalias citogenéticas (detectadas por cariótipo de rotina e alta resolução), anomalias cromossômicas submicroscópicas (detectadas por citogenética molecular) e mutações gênicas nos quatro principais genes da HPE (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3* e *TGIF*) (JHONSON e RASMUSSEN, 2010; ROESSLER e MUENKE, 2010; SOLOMON et al., 2010).

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

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

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

Durante o desenvolvimento crânio facial, a via de sinalização proteica mais estudada e essencial para a diferenciação e padronização dos tecidos mesenquimais é a

via Hedgehog (HH). O funcionamento da via Hedgehog (Hh) foi descrito, inicialmente, em estudos com *Drosophila*, sendo grande parte dos componentes dessa via preservada em humanos (GOODRICH et al., 1997).

A ativação desta via é realizada por três proteínas homólogas: Sonic Hedgehog (SHH), Desert Hedgehog (DHH) e Indian Hedgehog (IHH). SHH participa do desenvolvimento de somitos e do tubo neural; IHH é responsável pelo desenvolvimento de condrócitos, enquanto DHH participa do desenvolvimento de células germinativas (SALES, 2012; PAN et al., 2013).

O gene Hedgehog desempenha um papel crucial no desenvolvimento embrionário normal de órgãos como pulmões (GRINDLEY et al., 1997) e sistema nervoso (WETMORE, 2003); e permanece ativo no indivíduo adulto, onde está envolvido na manutenção de células estaminais. Além disso, no adulto, um padrão de sinalização aberrante nos membros da família Hh pode levar a algumas formas de câncer (COHEN, 2003; WETMORE, 2003).

Geralmente, somente o termo via de sinalização de Hh é comumente usado, no entanto esta é extremamente complexa, englobando mutações em componentes da via Hedgehog, além de outras vias, como TGF/b/NODAL, WNT e BMP. A complexidade desta rede pode trazer como consequência o surgimento de fenótipos muito diferentes, como: HPE, cefalopolisindactilia de Greig, síndrome do carcinoma basocelular nevóide, Síndrome de Pallister-Hall, meduloblastoma, entre outros (COHEN, 2003; (LIPINSKI et al., 2010; DAVID, et al., 2013).

A via de sinalização Hh é composta de duas proteínas transmembrana: Patched (Ptc), uma proteína composta por 12 canais de passagem, que se une ao ligante de Hh; e Smoothened (Smo), uma proteína transdutora de sinal composta por sete canais de passagem. Na ausência do ligante, Ptc interage com Smo e o inibe, direta ou

indiretamente. Esta repressão culmina no fator de transcrição agindo como um repressor da transcrição. Este fator de transcrição existe em três diferentes formas nos vertebrados, sendo chamados de Gli e apresenta funções transcricionais distintas. Quando Hh se liga à Ptc, sua interação com Smo se altera de forma que Smo não seja mais inibida. Assim, a proteína Gli adentra o núcleo da célula e age como um ativador de transcrição para os mesmos genes que esta inibe quando Ptc está livre para interação, inibindo Smo. Estudos em vertebrados indicam que a determinação do destino da célula por vias de sinalização Hh ocorra pela combinação dos genes Gli expressos nesta célula, como mostra a figura 1 (MCMAHON, 2000; GOODRICH e SCOTT, 1998; JOHNSON e SCOTT, 1998; KALDERON, 2000).

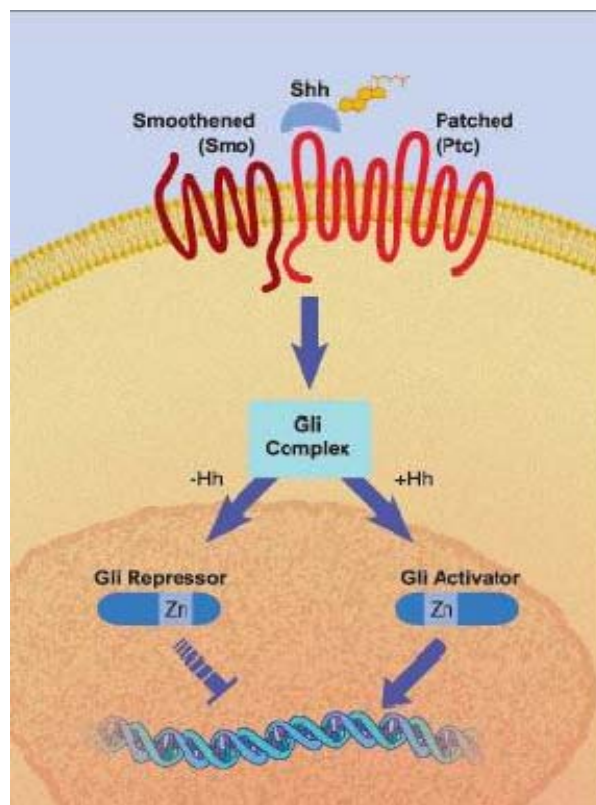


Figura 1. A via de sinalização de Hedgehog envolve duas proteínas transmembrana, Patched (Ptc) e Smoothened (Smo). Ptc liga-se à Shh, ao passo que Smo atua como um transdutor de sinal. Na ausência do ligante, Ptc interage com Smo e a inibe. Esta inibição ativa Gli, o repressor de transcrição. Na presença do ligante, a interação de Ptc e Smo é alterada de forma que Smo deixa de ser inibida. A proteína Gli entra no núcleo celular e age como ativador e transcrição (MCMAHON, 2000).

Estudos experimentais confirmam a função de Shh na célula através da indução de Ciclopamina, uma substância alcaloide-esteroidal (análogo ao colesterol) advinda da planta *Veratrum californicum* e é um importante antagonista da via de sinalização de Hh, atuando na inibição de tecidos-alvo, provavelmente por Smo. A ciclopamina inibe a atividade morfogenética da via Hh por ligação e prevenção da ativação de proteínas transmembrana Smo (CHEN, et al., 2002; LIPINSKI et al., 2010).

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

Quando comprometidos, os mecanismos genéticos (que são múltiplos e complexos) envolvidos nos diversos processos do desenvolvimento craniofacial resultam em uma imensa variedade de síndromes, sequências, associações ou mesmo anomalias isoladas. A classificação de pacientes por síndromes específicas é difícil e, muitas vezes, confusa, resultando em certos quadros dispostos dentro de um espectro contínuo, no qual diferentes mecanismos etiológicos e patológicos também se interpoem (COHEN, 1997), daí a importância da investigação de alterações genéticas menores.

2.2 Interação gênica em HPE

Foram caracterizados quatro principais genes responsáveis pela HPE (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3* e *TGIF*) e outros sete parecem desempenhar um papel menor na ocorrência

de HPE, conforme descrito na tabela 2 (KAMNASARAN et al, 2005; ROESSLER e MUENKE, 2010; JOHNSON e RASMUSSEN, 2010).

A hipótese “*multiple-hit*” é o modelo mais amplamente aceito de HPE. Segundo esta hipótese, combinações de mutações nos genes principais e/ou secundários levam à ocorrência de HPE e podem ser responsáveis pela variabilidade fenotípica em termos de gravidade (MING e MUENKE, 2002). Há muitas interações entre as diversas vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento do prosencéfalo que necessitam ser elucidadas, portanto, o aconselhamento genético continua a ser muito complexo para famílias afetadas pela HPE (MERCIER et al., 2010).

Tabela 2: Principais genes relacionados a HPE e suas contribuições no fenótipo.

| Genes Mutados | Localização | Fenótipo | Frequências |
|----------------------|--------------------|---|---|
| <i>SHH</i> | 7q36 | Alta variabilidade: de suave a grave | 17% dos casos familiares; 3,7% dos casos esporádicos |
| <i>ZIC 2</i> | 13q32 | Graves alterações cerebrais; sutil ou ausência de dismorfismos faciais | 3-4% |
| <i>SIX3</i> | 2p21 | Variável | 4,7% de todos os casos com holoprosencefalia |
| <i>TGIF</i> | 18p11.3 | Variável | 1,50% |
| <i>PTCH1</i> | 9q22.3 | Variável | raro |
| <i>GLI2</i> | 2q14 | Variável | 1,80% |
| <i>DISP1</i> | 1q42 | Microforma de holoprosencefalia: suaves características faciais (fissura de labio-palato, hipotelorismo, ICMU); CNS (esquisofrenia, deficiência mental em alguns casos) | 2 mutações de perda de função |
| <i>NODAL</i> | 10q221 | Variável | aproximadamente 1% na via de sinalização NODAL |
| <i>FOXH1</i> | 8q24.3 | Variável | como parte de aproximadamente 1% da via de sinalização NODAL, |
| <i>TDGF1</i> | 3p21-p23 | Variável | 2 mutações de perda de função em 83 familiares e 327 casos esporádicos de holoprosencefalia |
| <i>DHCR7</i> | 11q12-q13 | Face holoprosencefálica | 5-6% dos casos de síndrome de Smith-Lemli-Opitz; 9 casos relatados e um com ciclopia |

Cohen (2003, 2006), Shaffer et al., (2007) , Lachawan et al., (2009) Roessler e Muenke (2010)

2.3 Evidências citogenéticas em HPE

Análise citogenética constitui uma excelente ferramenta para identificar as causas das síndromes genéticas, particularmente as envolvidas com malformações do SNC (SHAFFER et al., 2007). As primeiras alterações citogenéticas encontradas em HPE foram trissomia 13, trissomia 18 e triploidias (NORMAN, 1995; ROSSELER e MUENKE, 1998).

Um levantamento das principais alterações citogenéticas associadas a casos de HPE permitiu a identificação de 12 *loci* candidatos, a partir dos quais foram identificados os quatro genes principais associados: *SHH* (HPE3 - 7q36, OMIM# 600725) (BELLONI et al., 1996), *ZIC2* (HPE5 - 13q32, OMIM# 603073) (BROWN et al., 1998; BROWN et al., 2001), *SIX3* (HPE2 - 2p21, OMIM# 603714) (WALLIS et al., 1999) e *TGIF* (HPE4 - 18p11.3, OMIM# 602630) (GRIPP et al., 2000). Os outros oito *loci* candidatos são: HPE1 (21q22.3), HPE6 (3p24–pter), HPE7 (13q12–q14), HPE8 (14q13), HPE9 (20p13), HPE10 (1q42–qter), HPE11 (5pter), e HPE12 (6q26–qter) (BENDAVID et al., 2007). Outros genes candidatos já foram identificados. Eles são considerados secundários, pois geralmente correspondem a fatores das vias relacionadas aos genes principais e podem estar ou não relacionados à algum dos outros *loci* da HPE. São eles: *PATCH1* (HPE7 - 9q22, OMIM# 610828), *GLI2* (HPE9 - 20p13, OMIM# 165230) *DISP1* (1q42, OMIM# 607502), *FOXH1* (8q24.3, OMIM# 603621), *NODAL* (10q22.1, OMIM# 601265) (DUBOURG et al., 2011; ROESSLER et al., 2012).

Considerando os aspectos multigênicos, os quais mostram que mutações em um único gene podem não ser suficientes para gerar as alterações fenotípicas típicas de HPE, investigação nos *loci* de HPE conhecidos e a constante busca de novos *loci* candidatos devem continuar. O uso da técnica de *Multiplex Ligand-dependent Probe Amplification* (MLPA) para analisar as regiões subteloméricas ou *Microarray-based*

Comparative Genomic Hybridization (arrayCGH) para verificação genômica, tem aumentado o potencial de detectar anomalias cromossômicas em HPE e acelerar a identificação de novos loci candidatos para a mesma.

Bendavid et al., (2007) analisaram 181 casos de HPE através da técnica de MLPA e detectaram rearranjos em *loci* candidatos para HPE conhecidos (1q, 20p e 21q), bem como em *loci* subteloméricos novos (1p, 5q, 8p, 17q, 18q, 22q e Xq) e em subcentromérico 15q. Associações entre o ganho e perda subtelomérica também foram encontradas e podem ser herdadas por translocação parental equilibrada, o que é útil para o aconselhamento genético. Estes resultados reforçam a origem heterogênea para HPE e contribuem para a explicação do amplo espectro fenotípico descrito neste defeito do desenvolvimento, tornando as análises das regiões subteloméricas, em casos de HPE, uma importante ferramenta.

Um grupo de 111 casos com HPE (64 fetos e 47 nascidos vivos) com cariótipo normal foram analisados, utilizando plataforma de *arrayCGH* de alta performance da Agilent Human Genome Microarray Kit 44A e 244A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) Entre esses pacientes, todos os fetos apresentavam fenótipos característicos de HPE (SNC consistentes com HPE), enquanto que dos 47 casos de nascidos vivos, 32 (68%) apresentavam microformas de HPE, e 15 (32%) expressavam forma grave da doença. Variações cromossômicas não descritas nas bases de dados das Variações no Número de Cópias (CNV) foram detectadas em 28 casos (17 fetos, 11 crianças) (25%), dos quais 19 tinham anomalias *de novo* (17% de toda a coorte). Vários novos loci candidatos foram identificados: alguns eram deleções intersticiais em 1p, 6q, 10p, 16p, 18q, 20p, 21q, e Xp, outros eram deleções subteloméricas em 19pter e 6qter (BENDAVID et al., 2009).

Um estudo envolvendo 86 pacientes com espectro clínico variável de HPE foi realizado por Paulussen et al., (2010) através do sequenciamento dos quatro principais genes envolvidos na HPE (*SHH*, *SIX3*, *ZIC2*, *TGIF*), MLPA (Kit SALA MLPA P187) e *arrayCGH* (*affymetrix 250k NspI SNP array*.) Os autores encontraram 21 alterações genéticas: três mutações pontuais no gene *SHH*, oito mutações pontuais no gene *ZIC2*, oito mutações pontuais no gene *SIX3*, uma deleção total do gene *ZIC2*, uma deleção total no gene *SIX3*, e nenhuma alteração foi detectada no gene *TGIF*. A presença das duas deleções totais encontradas neste estudo foi relevante para destacar a importância da utilização de uma técnica que permite detectar deleções/duplicações de genes inteiros, pois é evidente que a busca de deleções em qualquer um dos quatro genes envolvidos na HPE é útil em teste diagnóstico.

Bendavid et al., (2010) revisaram inúmeros casos isolados de HPE mostrando associação de vários cromossomos envolvidos nesta afecção, corroborando com a heterogeneidade genética (Figura 2).

Os estudos por *arrayCGH* realizados em grupos de HPE demonstram claramente que anormalidades microcitogenéticas são uma causa frequente de HPE, com 17% de frequência (BENDAVID et al., 2010). Além disso, esta alta frequência, independente do tamanho, localização e redundância dos rearranjos, demonstra que *arrayCGH* é uma importante ferramenta para detectar alterações submicroscópicas em pacientes com HPE.

Dados mostram no mínimo 12 diferentes loci genéticos com mutações relacionadas a HPE, porém apenas uma pequena parte dos casos são confirmados por esta estratégia evidenciando a contribuição das alterações submicroscópicas. Recente estudo avaliando quatro fetos suspeitos de HPE, através do *arrayCGH*, mostrou duas alterações recorrentes envolvendo as regiões 15q22 e 15q14 (aproximadamente 40Kb e

174Kb, respectivamente). Ainda é cedo para correlacionar diretamente as alterações em 15q21 com HPE, porém estudos mostram ligação desta região com agenesia de corpo caloso, sinal clínico importante no espectro HPE (KOIVISTO, 1999, COHEN, 2006; LALANI et al., 2006). Deleções recorrentes em 3 casos na região cromossômica 6p21 também foram mostradas no mesmo estudo (MACHADO, HEINRICH e BARINI, 2011).

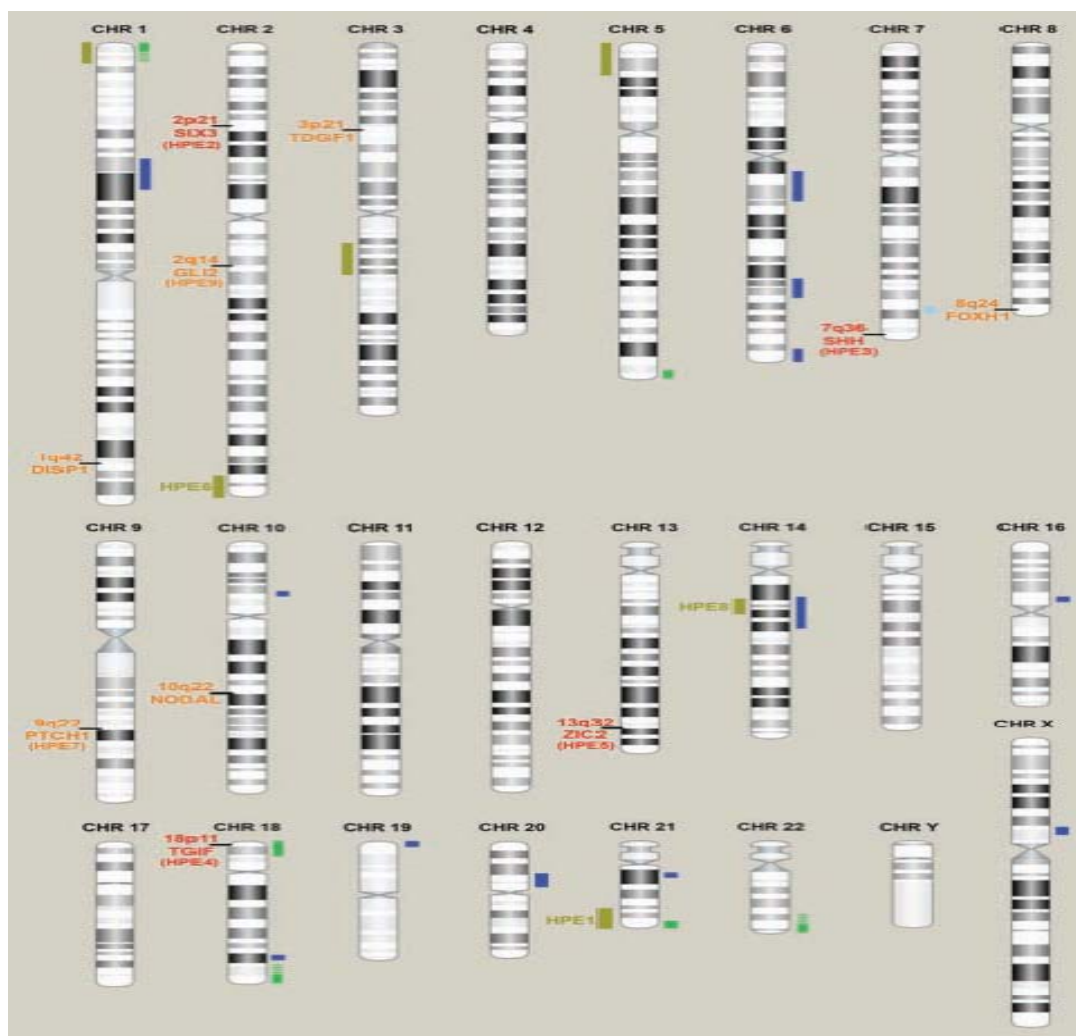


Figura 2: Idiograma dos cromossomos, em bandamento G, mostrando a localização dos genes e deleções envolvidas em HPE. Barras brancas, à esquerda, representam as deleções encontradas em HPE no cariótipo de rotina. Barras verdes, à direita, representam os rearranjos subteloméricos identificados por MLPA. Barras azuis, à direita, representam as deleções identificadas por arrayCGH: barras azuis escuro são deleções *de novo*, enquanto que as barras azuis claro são deleções herdadas. Modificados de Bendavid et al., (2010).

Concomitantemente à busca por novos loci gênicos, muitos trabalhos elencaram novos refinamentos e novas correlações genótipo/fenótipo das diversas anomalias conhecidas. Especificamente, a região 18p foi analisada e correlacionada a alguns fenótipos, entre eles HPE. Yi et al., (2014) descreve uma deleção de 4,5Mb em 18p11.3, não detectada no cariótipo, em um feto com holoprosencefalia semi-lobar, fissura mediana de lábio e palato, arritmia cardíaca e tetralogia de Fallot. Neste trabalho alguns genes foram apontados como responsáveis pelo quadro, como *TGIF*, *USP14*, *THOC1*, *YES1*, *NDC80*, *SMCHD1* e *DLGAP1*, contribuindo com o conhecimento de 18p nas anomalias cardíacas e HPE.

Piccione et al., (2013) relataram um adolescente com deleção em 14q13.1-q21.1 envolvendo a região da HPE8 associado com deficiência intelectual (ID), microftalmia e coloboma bilateral e sem alterações cerebrais. A deleção dos genes candidatos para HPE na região, levanta dúvidas sobre a seu papel na determinação da patologia e evidencia a hipótese de *multiple-hit* na determinação da variabilidade clínica na HPE.

A pesquisa da etiologia dos grupos de malformações do cérebro, como HPE, expandiu-se nos últimos anos como resultado de avanços na neuroimagem, genética e embriologia experimental. Devido ao fato da HPE apresentar uma grande heterogeneidade genética, isto a torna um modelo para o estudo da complexidade genética do desenvolvimento do cérebro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar microdeleções/duplicações e possíveis novos genes ou regiões cromossômicas relacionadas com a Holoprosencefalia.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar novas etiologias para HPE de causa desconhecida;
2. Refinar os loci redundantes candidatos a HPE;
3. Identificar possíveis novas regiões cromossômicas responsáveis pela HPE;
4. Estabelecer correlação genótipo/fenótipo dos casos envolvidos no estudo;
5. Identificar novos genes candidatos para HPE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupo amostral

Incluimos 124 amostras de DNA de pacientes com hipótese diagnóstica clínica para holoprosencefalia, pertencentes ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo – HRAC-USP-Bauru/SP, e previamente triadas para mutação dos genes (*SHH*, *ZIC2*, *TGIF*, *GLI2* e *PTCH1*). As amostras selecionadas foram extraídas de um projeto anterior (Fapesp Proc N° 06/60973-9), onde foi coletado 2ml de sangue para a extração do DNA, sendo o mesmo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (N° 289/2006). Sendo assim, as análises moleculares deste trabalho foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (N° 11/2011) em anexo.

4.2 Análise clínica

Todos os pacientes selecionados foram analisados por um geneticista clínico do Setor de Genética e diagnosticados com hipótese diagnóstica para o espectro fenotípico da HPE. Os pacientes que apresentaram fenótipo facial tais como microcefalia, hipertelorismo, nariz achatado, fissura de lábio/palato com comprometimento do SNC, foram classificados como HPE clássica. Os pacientes que apresentaram fenótipo facial sem comprometimento do SNC e/ou microformas foram classificados como microforma de HPE. Casos com malformações congênicas e que durante sua evolução clínica apresentaram associação com hipótese de HPE foram classificados como malformação múltipla congênita e complexa (MMCC).

4.3 Análise Molecular

4.3.1 *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA*

Todas as amostras de DNA foram submetidas a análise molecular através da técnica MLPA. Para tal, foram utilizados o SALSA[®] MLPA[®] KIT P187-B1 Holoprosencephaly e o SALSA[®] MLPA[®] KIT P036-E1 Human-telomere-3 (MRC Holland[®], Amsterdam, Netherlands), constituído de sondas para os genes da HPE e para as regiões subteloméricas, respectivamente. Nas tabelas 3 e 4 estão elencadas as sondas correspondentes aos *exons* dos diferentes genes envolvidos na HPE e genes das regiões subteloméricas contempladas nos kits, e seus respectivos tamanhos.

A análise pela técnica de MLPA foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do HRAC/USP, seguindo-se o protocolo original descrito por Schouten et al., (2002) com as adaptações descritas a seguir:

I) Desnaturação do DNA e hibridação das sondas:

As amostras de DNA foram diluídas para uma concentração de 50ng de DNA. Após a diluição, 1µL da amostra foi colocado em um microtubo e submetido a temperatura de 95°C por cinco minutos e, em seguida, a 25°C antes de serem retiradas do termociclador. Após a desnaturação, acrescentou-se 1µL da Solução de *Anneling* (0,375µL do SALSA *Probe Mix 1* + 0,375µL do SALSA *Buffer* + 0,25µL de água) a cada tubo. Os tubos foram levados novamente ao termociclador e incubados a 95°C por um minuto e, em seguida, a 60°C por 3 horas.

II) Reação de ligação:

No termociclador, a 54°C, adicionou-se a cada tubo 8µL do *Master Mix I* (6,25µL + 0,75µL de *Ligase Buffer A* + 0,75µL de *Ligase Buffer B* + 0,25µL da enzima *Ligase*). As amostras foram incubadas a 54°C por 15 minutos, em seguida, a 98°C por 5 minutos e mantidos a 4°C (temperatura de estocagem).

III) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Após a reação de ligação, o termociclador foi colocado a 60°C e adicionou-se 20µL do *Master Mix II* (15,75µL de água + 2µL de *SALSA PCR* + 1µL de *PCR Buffer* + 1µL de *Primer* + 0,25µL da enzima Taq Polimerase) a cada tubo. Iniciou-se imediatamente a reação de PCR nas seguintes condições: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C, por 35 ciclos. E ao final dos ciclos, 20 minutos a 72°C.

IV) Separação dos Produtos Amplificados (Eletroforese Capilar):

O produto da PCR foi diluído em água na proporção de 1:20. Em uma placa de sequenciamento foi colocado 1µL da PCR diluída + 9µL de formamida + 0,075µL de marcador de tamanho padrão (ROX500). A placa foi levada ao termociclador a 96°C por 3 minutos, incubada imediatamente no gelo por cerca de 3 minutos e levada para leitura em sequenciador automático *ABI3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®).

V) Visualização e Análise dos Resultados:

A visualização e análise dos resultados foi realizada com o programa *SoftGenetics GeneMarker*® V2.2.0 (Copyright *SoftGenetics LLC*) com base em planilhas fornecidas *on line* no site <<http://www.softgenetics.com>>.

Para as amostras que apresentaram alguma alteração, a análise foi repetida para confirmação do resultado.

Tabela 3: Sondas do Kit *SALSA MLPA P187-B1 holoprosencephaly*

| | <i>Gene</i> | <i>Exon</i> | <i>Tamanho da Sonda (nt)</i> | | <i>Gene</i> | <i>Exon</i> | <i>Tamanho da Sonda (nt)</i> |
|----|---------------|-------------|------------------------------|----|-------------------------|-------------|------------------------------|
| 1 | <i>GLI2</i> | | 195 | 25 | <i>FBXW11</i> | Exon14 | 301 |
| 2 | <i>GLI2</i> | | 154 | 26 | <i>SIX3</i> | Exon1 | 436 |
| 3 | <i>GLI2</i> | Exon1 | 265 | 27 | <i>SIX3</i> | Exon1 | 214 |
| 4 | <i>GLI2</i> | Exon1 | 355 | 28 | <i>SIX3</i> | Exon2 | 463 |
| 5 | <i>GLI2</i> | Exon 2 | 166 | 29 | <i>SIX2</i> | Exon2 | 123 |
| 6 | <i>GLI2</i> | Exon3 | 472 | 30 | <i>SIX2</i> | Exon1 | 346 |
| 7 | <i>GLI2</i> | Exon4 | 418 | 31 | <i>TGIF1</i> | Exon3 | 292 |
| 8 | <i>GLI2</i> | Exon5 | 232 | 32 | <i>TGIF1</i> | Exon6 | 445 |
| 9 | <i>GLI2</i> | Exon6 | 283 | 33 | <i>TGIF1</i> | Exon8 | 142 |
| 10 | <i>GLI2</i> | Exon7 | 364 | 34 | <i>TGIF1</i> | Exon9 | 208 |
| 11 | <i>GLI2</i> | Exon8 | 337 | 35 | <i>TGIF1</i> | Exon9 | 391 |
| 12 | <i>GLI2</i> | Exon8 | 220 | 36 | <i>ZIC2</i> | Exon1 | 318 |
| 13 | <i>GLI2</i> | Exon9 | 274 | 37 | <i>ZIC2</i> | Exon3 | 498 |
| 14 | <i>GLI2</i> | Exon9 | 226 | 38 | <i>ZIC2</i> | Exon3 | 130 |
| 15 | <i>GLI2</i> | Exon10 | 382 | 39 | <i>PTCH1</i> | Exon16 | 148 |
| 16 | <i>GLI2</i> | Exon11 | 427 | 40 | <i>TRAPPC10 (TMEM1)</i> | Exon3 | 325 |
| 17 | <i>GLI2</i> | Exon12 | 160 | 41 | <i>TRAPPC10 (TMEM1)</i> | Exon7 | 202 |
| 18 | <i>GLI2</i> | Exon13 | 178 | 42 | <i>TRAPPC10 (TMEM1)</i> | Exon21 | 247 |
| 19 | <i>SHH</i> | Exon1 | 184 | 43 | Controle | 11q24 | 171 |
| 20 | <i>SHH</i> | Exon1 | 238 | 44 | Controle | 11q13 | 190 |
| 21 | <i>SHH</i> | Exon2 | 136 | 45 | Controle | 7q31 | 310 |
| 22 | <i>SHH</i> | Exon3 | 373 | 46 | Controle | 22q11 | 454 |
| 23 | <i>FBXW11</i> | Exon2 | 409 | 47 | Controle | 1p21 | 481 |
| 24 | <i>FBXW11</i> | Exon8 | 256 | 48 | Controle | 7q22 | 490 |

nt = Nucleotídeos.

Tabela 4: Sondas do Kit *SALSA MLPA probemix P036-E1 Human-telomere-3*.

| Tamanho (nt) | Posição cromossômica | Gene detectado | |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 1 | 130 | 1p | <i>TNFRSF4</i> |
| 2 | 136 | 2p | <i>ACPI</i> |
| 3 | 142 | 3P | <i>CHL1</i> |
| 4 | 151 | 4P | <i>PIGG (FLJ20265)</i> |
| 5 | 158 | 5P | <i>PDCD6</i> |
| 6 | 166 | 6P | <i>IRF4</i> |
| 7 | 172 | 7p | <i>ADAPI (CENTA1)</i> |
| 8 | 179 | 8p | <i>FBXO25</i> |
| 9 | 186 | 9p | <i>DMRT1</i> |
| 10 | 193 | 10p | <i>DIP2C (KIAA0934)</i> |
| 11 | 202 | 11p | <i>RIC8A (RIC-8)</i> |
| 12 | 208 | 12p | <i>SLC6A12</i> |
| 13 | 219 | 13q-cen | <i>PSPCI</i> |
| 14 | 227 | 14q-cen | <i>CONB1IP1 (HEI10)</i> |
| 15 | 235 | 15q-cen | <i>MKRN3</i> |
| 16 | 242 | 16p | <i>POLR3K</i> |
| 17 | 250 | 17p | <i>RPH3AL</i> |
| 18 | 258 | 18p | <i>USP14</i> |
| 19 | 265 | 19p | <i>CDC34</i> |
| 20 | 274 | 20p | <i>SOX12</i> |
| 21 | 283 | 21q-cen | <i>RBM11</i> |
| 22 | 289 | 22q-cen | <i>BID</i> |
| 23 | 298 | Xp/Yp (PAR1) | <i>SHOX</i> |
| 24 | 307 | 1q | <i>SH3BP5L (KIAA1720)</i> |
| 25 | 313 | 2q | <i>CAPN10</i> |
| 26 | 322 | 3q | <i>BDHI</i> |
| 27 | 330 | 4q | <i>TRIML2</i> |
| 28 | 337 | 5q | <i>GNB2L1</i> |
| 29 | 346 | 6q | <i>PSMB1</i> |
| 39 | 355 | 6q | <i>VIPR2</i> |
| 31 | 361 | 7q | <i>ZC3H3 (KIAA0150)</i> |
| 32 | 372 | 9q | <i>EHMT1</i> |
| 33 | 379 | 10q | <i>PAOX (PAO)</i> |
| 34 | 386 | 11q | <i>NCAPD3 (KIAA0056)</i> |
| 35 | 395 | 12q | <i>ZNF10</i> |
| 36 | 402 | 13q | <i>F7</i> |
| 37 | 411 | 14q | <i>MTA1</i> |
| 38 | 418 | 15q | <i>ALDH1A3</i> |
| 39 | 426 | 16q | <i>GAS8 (GAS11)</i> |
| 40 | 434 | 17q | <i>TBCD</i> |
| 41 | 441 | 18q | <i>RBFA (C18orf22)</i> |
| 42 | 450 | 19q | <i>CHMP2A (BC-2)</i> |
| 43 | 458 | 20q | <i>OPRL1</i> |
| 44 | 466 | 21q | <i>PRMT2 (HMT1)</i> |
| 45 | 475 | 22q | <i>RABL2B</i> |
| 46 | 483 | Xq/Yq (PAR2) | <i>VAMP7 (SYBL1)</i> |

nt = Nucleotídeos.

4.3.2 Microarray-based Comparative Genomec Hybridization - *arrayCGH*

A presença de desequilíbrios genômicos submicroscópicos foi investigada pela técnica de hibridação genômica comparativa baseada em microarranjo - *arrayCGH*. Utilizamos a plataforma *CytosureTM, ISCA v2 array 4X180K* (Oxforg Gene Technology, OGT, UK), esta análise foi realizada no Centro de Estudo do Genoma Humano na Universidade de São Paulo - USP, SP.

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 - 1.000 ng de DNA, em volume final de 18 μ L de reação, contendo 5 U de cada uma das enzimas AluI e RsaI, 1,7 μ g 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 min 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 min a 95°C e a incubação em gelo por 5 min. 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 min 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, 50µL do DNA teste (marcado com *Cy3*) e 50µL do DNA referência (marcado com *Cy5*) foram adicionados a 10µg de *Human Cot-1 DNA* (Invitrogen®), para o volume final de 105µL. 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 min a -80°C ou por duas horas a -20°C. Após centrifugação a 13.200 rpm, por 15 min a 4°C, adicionou-se etanol 70% gelado às amostras e procedeu-se a centrifugação por mais 5 min a 13.200 rpm, descartando-se o sobrenadante. Seguiu-se nova centrifugação por 1 min, descartando-se o sobrenadante.

O DNA marcado foi então ressuspendido em TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) previamente aquecido a 72°C e mantido por 2 min 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 min a 95°C, seguindo-se 30 min 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 min, depois em *Buffer 2* (previamente aquecido a 37°C) por 1 min, seguindo 10 segundos 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 \log_2 alterada foram consideradas pelo programa como possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico.

4.3.3 Multiplex PCR Liquid Chromatography - MPLC

A técnica MPLC foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Desenvolvimento da Faculdade de Medicina da Universidade de Rennes 1, na cidade de Rennes, França. Esta técnica foi desenvolvida no referido centro devido a colaboração existente com a Profa. Dra. Veronique David, o que proporcionou um período de 06 meses na França para o aprendizado do estudo de expressão do Sonic Hedgehog (APENDICE E). A MPLC foi utilizada para confirmar pequenas alterações genômicas, menores de 1Mb, encontradas em amostras de pacientes pela técnica de *arrayCGH*. Consiste em uma PCR semiquantitativa e baseia-se na co-amplificação de duas curtas sequências do DNA (menores de 300pb), uma sequência do gene estudado e outra do gene de referência.

Inicialmente obtivemos as sequências dos *primers* flanqueando as regiões de interesse a partir do software *Primer Premier 5* (tabela 5).

Tabela 5: sequência dos *primers* utilizados na análise de MPLC e o tamanho do respectivo fragmento gerado.

| Nome do Gene | Nome do <i>Primer</i> | Sequência do <i>Primer</i> | Tamanho do <i>amplicon</i> (pb) |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| RB1 | RB1F | 5' cctccttaatttggaagggtt 3' | 151 |
| | RB1R | 5' tggactagaaataatgtggtttg 3' | |
| SIX3 | SIX3BF | 5' caagccacaacgacacg 3' | 114 |
| | SIX3BR | 5' aatgcacctaatgacaacagc 3' | |

A PCR foi realizada utilizando-se 50ng/uL de DNA e o *mix* da reação descrito na tabela 6.

Tabela 6. Mix da reação da PCR e o respectivo ciclo.

| Reagentes | 1 reação | Temperatura °C | Tempo | Número de ciclo |
|-----------------------------------|--------------|----------------|-------|-----------------|
| Água ultrapura | 3,8 µL | 94 | 7min | x23 |
| DMSO | 3,5 µL | 94 | 10seg | |
| Go Taq Buffer 5X | 5 µL | 50 | 15seg | |
| dNTP 4 mM | 1,25 µL | 72 | 20seg | |
| MgCl ₂ 25 mM | 1,25 µL | 72 | 5min | |
| Go Taq 5U / µL | 0,2 µL | 72 | ∞ | |
| Volume total do mix / tube | 15 µL | 10 | | |

A análise foi feita por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), e um fluoróforo intercalante (SYBRgreen®) foi utilizado para marcar as sequências amplificadas afim de capturar a fluorescência na saída da coluna. Um cromatograma das sequências amplificadas de DNA referência e amostra estudada foi produzido para visualização dos picos formados. Um pico é equivalente ao gene de interesse e o outro ao gene de referência, permitindo comparar e inferir a quantidade de ampliações dos fragmentos gerados, confirmando ou excluindo as evidências de deleção/duplicação encontrada no *arrayCGH* (figura 3).

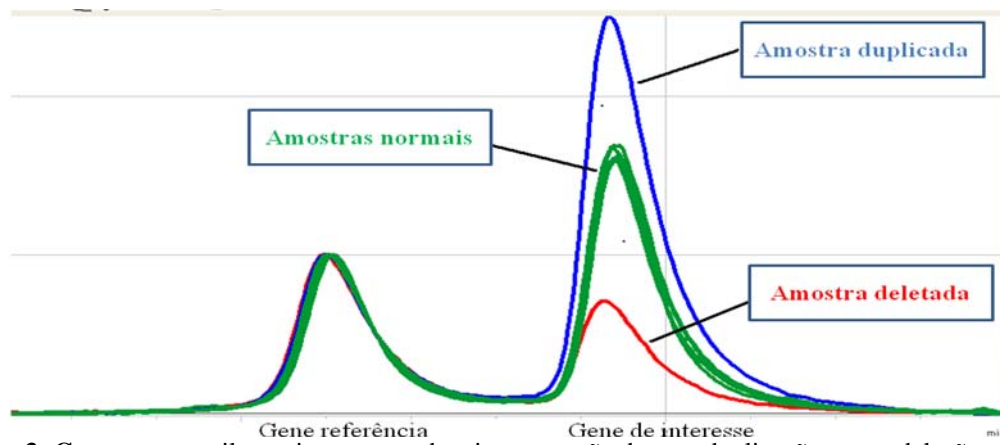


Figura 3: Cromatograma ilustrativo mostrando a interpretação de uma duplicação e uma deleção.

5. RESULTADOS

5.1 Grupo amostral

A avaliação clínica foi realizada em 124 pacientes pertencente ao HRAC com hipótese diagnóstica para HPE. Após avaliação, os pacientes foram classificados em três grupos de acordo com a apresentação fenotípica: 46 pacientes com HPE clássica, 70 pacientes com microforma da HPE, e 08 pacientes com malformação múltipla congênita complexa (MMCC), os quais apresentavam algum sinal facial da HPE.

O grupo amostral deste trabalho apresentou ampla variação fenotípica (Figura 4), como os casos clássicos de HPE isolados (Figura 4a), casos no qual um progenitor apresentava fenótipo brando com hipotelorismo aparente (Figura 4b) e possuía filho com fenótipo clássico da HPE (Figura 4c), casos típicos de microforma da HPE (Figura 4d), paciente com apenas hipotelorismo mas que ainda não tiveram filhos (Figura 4e), irmãos com anomalias brandas, tais como fissura de lábio/ palato e incisivo maxilar central único (ICMU), respectivamente (Figura 4f), e paciente com ICMU (Figura 4g).



Figura 4: Aspectos faciais de alguns pacientes com hipótese diagnóstica para HPE pertencentes a caústica deste trabalho. a) Fenótipo clássico para HPE; b) pai com hipotelorismo aparente; c) filho de B, fenótipo clássico para HPE; d) paciente com microforma da HPE; e) paciente com FLP e hipotelorismo aparente; f) irmãos com anomalias, FLP na menina e ICMU no menino; g) caso isolado de ICMU.

5.2 Avaliação molecular

A análise molecular foi realizada em 124 pacientes com hipótese diagnóstica para HPE e as técnicas utilizadas foram MLPA, *arrayCGH* e MPLC. As três técnicas não foram utilizadas em todas as amostras, assim segue o cronograma de aplicação das mesmas.

A primeira avaliação genética realizada foi para detectar deleções/duplicações nos loci já conhecidos para HPE e regiões subteloméricas, através da técnica de MLPA, utilizando o Kit SALSA MLPA P187. Foram incluídas na análise as 124 amostras de DNA, das quais cinco apresentaram deleção/duplicação (4%). Destes, três casos apresentaram deleção no gene *SHH* (3/5), um caso apresentou deleção no gene *TGIF* (1/5) e um outro caso mostrou duplicação no gene *ZIC2* (1/5).

As sondas deletadas por MLPA estão descritas na tabela 7.

Tabela7: Relação das deleções/duplicações encontradas por MLPA e os respectivos éxons dos genes relacionados.

| Casos | Exons alterados | Gene | Tipo de HPE |
|-------|-----------------|-----------------|-------------|
| 1 | 1, 2 e 3 | del <i>SHH</i> | Semilobar |
| 2 | 1, 2 e 3 | del <i>SHH</i> | Lobar |
| 3 | 1, 2 e 3 | del <i>SHH</i> | Semilobar |
| 4 | 3, 6, 8 e 9 | del <i>TGIF</i> | Alobar |
| 5 | 1 e 3 | dup <i>ZIC2</i> | Lobar |

del= deleção; dup= duplicação

A segunda avaliação molecular foi a análise por MLPA utilizando o Kit SALSA MLPA P036. Nessa avaliação, analisamos todas as amostras de DNA, excetuando-se aquelas que apresentaram variações na análise realizada pelo Kit SALSA MLPA P187, totalizando 119 amostras de DNA. Nenhuma alteração foi identificada, mostrando que na presente casuística parece não haver comprometimento das regiões cromossômicas subteloméricas.

Após a verificação por MLPA, 26 amostras, excluindo as com alterações já identificadas, foram selecionadas para a realização da próxima etapa. A seleção ocorreu pela relevância clínica apresentada pelos pacientes, dessa forma foram incluídos nesta análise 19 casos com fenótipo clássico da HPE, quatro casos com microforma da HPE, sendo dois com FLP e hipotelorismo e dois com ICMU isolados, e 3 casos com malformações múltiplas. Utilizou-se a técnica de *arrayCGH* para detectar deleções/duplicações em outras regiões do genoma que pudessem ser associadas ou não com o espectro clínico de HPE.

Neste grupo amostral encontramos nove alterações cromossômicas (34,6%), sendo quatro duplicações (4/9), quatro deleções (4/9) e um rearranjo complexo (1/9). Os resultados estão descritos na tabela 8.

Tabela 8: Alterações cromossômicas encontradas na análise genética através da técnica de *array*CGH.

| Caso | Banda cromossômica | Alteração | Tamanho (Mb) | Posição | Fenótipo |
|-------------|---------------------------|------------------|---------------------|-------------------------|-----------------|
| 6 (RCC) | 1p36.33-p36.32 | del | 1,7 | chr1:1023846-2761528 | MMCC |
| | 1p36.32 | del | 1,4 | chr1:3696933-5200401 | |
| | 1p36.31-p36.23 | del | 0,83 | chr1:6882352-7718050 | |
| | 1p36.21 | del | 0,94 | chr1:14012378-14992103 | |
| | 1p36.13-p36.12 | del | 3,7 | chr1:17213968-20934341 | |
| | 1p36.11-p35.3 | dup | 5,9 | chr1:24146844-30208750 | |
| 7 | 2p25.2 - 2p25.1 | dup | 1,2 | chr2:6303390-7531358 | Microforma |
| 8 | 2p21 | del | 0,01 | chr2:45168227-45169397 | HPE |
| 9 | 2p21 | del | 0,012 | chr2:45168083-45169270 | HPE |
| 10 | 2p21 | dup | 0,01 | chr2:45168083-45169270 | HPE |
| 11 | 8p23.3 | del | 0,13 | chr8:229644-360626 | HPE |
| 12 | 10p15.3 | del | 5,6 | chr10:2844518-8445789 | FLP |
| 13 | 13q14.2 | dup | 0,014 | chr13:49050517-49065273 | HPE |
| 14 | Xq13.3 | dup | 0,18 | chrX:74463936-74647795 | MMCC |

Após análise por *arrayCGH*, as alterações cromossômicas (deleções/duplicações) menores que 1Mb foram validadas pela técnica MPLC.

De acordo com a tabela 9, quatro alterações apresentaram tamanho inferior a 1Mb: duas deleções em 2p21 (casos 8 e 9), uma duplicação em 2p21 (caso 10) e uma duplicação em 13q14.2 (caso 13). Na análise por MPLC, apenas duas alterações foram confirmadas, uma duplicação em 2p21 (caso 10) (Figura 5) e uma deleção em 13p14.2 (caso 13) (Figura 6).

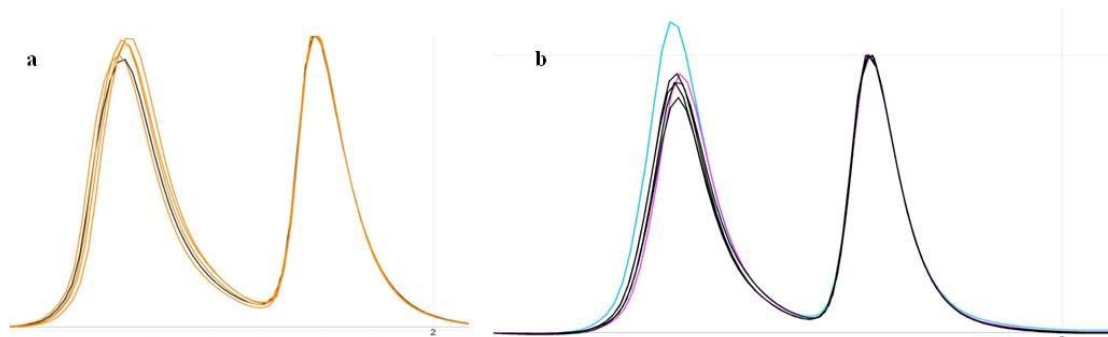


Figura 5: Análise de H-MPLC para confirmar as 3 detectadas por *arrayCGH* no gene *SIX3* localizado em 2p21. (a e b) O primeiro pico refere-se ao gene de interesse *SIX3* e o segundo pico, pico controle, refere-se ao gene *PGDI* localizado no cromossomo 11. (a) a linha preta refere-se ao caso 8, mostrando que não houve alteração no gene *SIX3*. (b) A linha rosa refere-se ao caso 9 e a linha azul refere-se ao caso 10, mostrando duplicação no gene *SIX3* no caso 10.

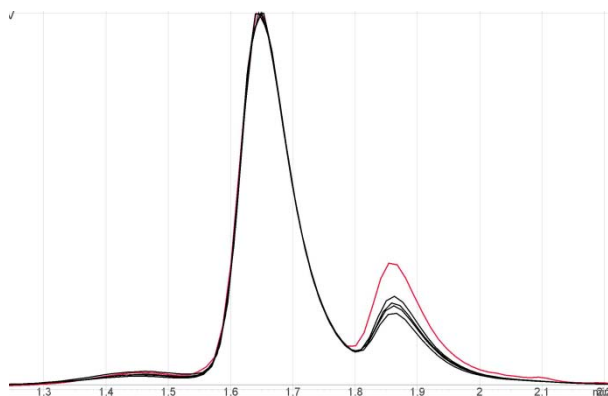


Figura 6: Análise de H-MPLC para confirmar a deleção detectada por *arrayCGH* no gene *RBI* localizado em 13q14.2. O primeiro pico refere-se ao gene *PGDI*, pico controle, e o segundo pico refere-se ao gene de interesse, o *RBI*. A linha rosa refere-se ao caso 13, mostrando a duplicação do gene *RBI*.

Dentre os pacientes analisados neste trabalho, 14 apresentaram deleções ou duplicações em genes da HPE ou em outras regiões cromossômicas. Os dados referentes às características faciais dismórficas, bem como outras características clínicas, e os resultados moleculares estão descritos na tabela 9. A descrição clínica dos 14 pacientes está apresentada no apêndice A.

Tabela 9: Característica clínica e gene/região cromossômicas alteradas na casuística deste trabalho (continuação).

| | Pacientes | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|------------|------------|-------------|-------------|------------------------------|--------|------|------|------|--------|---------|---------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| | genes alterados | | | | | região cromossômica alterada | | | | | | | | |
| Anomalias | <i>SHH</i> | <i>SHH</i> | <i>SHH</i> | <i>TGIF</i> | <i>ZIC2</i> | 1p36 | 2p25.2 | 2p21 | 2p21 | 2p21 | 8p23.3 | 10p15.3 | 13q14.4 | Xq13.3 |
| Fenda palpebrais | | | | | | | | | | | | | | |
| pequena e estreita | | | | | | x | | | | | | | | |
| Obliqua para cima | | | x | x | | | x | | | x | | x | | |
| Nariz | | | | | | | | | | | | | | |
| Hipoplasia | | | | | | x | | | | | | | | |
| Base baixa | | x | x | | x | | | x | | | | x | | x |
| Ponte larga | | | | | x | | | | | | | | | |
| Ponte baixa | | x | x | | x | | | | | | | | | x |
| ponte estreita | | | | x | | | | | | | | | | |
| agenesia de septo | | | | x | | | | | x | | | | | |
| Hipoplasia de septo | | | | | | | | x | | | | | | |
| narina antivertida | | | | | | | | | | | | | | x |
| Boca | | | | | | | | | | | | | | |
| Pré maxila hipoplásica | | | | | | x | | | | | | | | |
| Maxila Hipoplásica | | | | | | | | | | x | | | | x |
| agenesia de pró lábio | | | | | x | | | | | | | | | |
| retrognatia | | | x | | | | | | | | | | | |
| queixo proeminente | x | | | | | | | | | | | | | |
| Fissura | | | | | | | | | | | | | | |
| Pré forame bilateral completa | | | | | | x | | | | | | | | |
| Pré forame mediana completa | | | | x | | | | | | | | | | |
| transforame mediana | | x | | | | | | | | | | | | |
| Transforame bilateral | | | | | x | | x | | | | | x | | |
| Transforame Unilateral a esquerda | | | | | | | | x | | | | | | |
| Pré forame unilateral a esquerda | | | | | | | | | x | | x | | | |
| Tranforame unilateral a direita | x | | x | | | | | | | x | | | | |

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, analisamos 124 indivíduos com defeito na linha média craniofacial utilizando as técnicas de MLPA, para todos os 124 indivíduos, e arrayCGH, para um grupo de 24 indivíduos selecionados pela similaridade clínica ou pela presença de algum aspecto relevante no fenotipo. Os resultados clínico e molecular dos indivíduos os quais apresentaram deleção e/ou duplicação, mas que necessitam de estudos adicionais, serão discutidos a seguir. Na sequência, apresentaremos os casos que foram submetidos para publicação e estão descritos e discutidos em forma de artigo científico no apêndice desta tese. O genoma humano pode ser moldado por muitos mecanismos mutacionais os quais resultam em variações estruturais causadoras de anomalias congênitas ou doenças. Alguns rearranjos são causados por quebra na dupla fita do DNA (DSBs), geralmente deleções, duplicações, inversões ou translocações e acontecem em células germinativas ou somáticas. (HOLLAND e CLEVELAND, 2012; SOBREIRA et al., 2011).

O caso 7 (figura 13a) relatado no presente trabalho apresenta fissura transforame bilateral, fendas palpebrais para cima e ICMU, caracterizando o indivíduo como portador de microforma da HPE. Esse indivíduo apresentou uma deleção cromossômica de 1,2Mb em 2p25.2-p25.1 (figura 13b).

Monossomia de 2p é frequentemente encontrada em casos com grandes deleções/duplicações devido a presença de translocações balanceadas/recíprocas ou cromossomos em anel presentes nos progenitores. Assim, a correlação genótipo/fenótipo é complexa, uma vez que as monossomias/trissomias de 2p variam em tamanho (Mb) e composição gênica. Deleções subteloméricas 2pter foram encontradas em alguns casos associados a ADNPM, microcefalia e características dismórficas (AVIRAM-GOLDRING et al., 2000; DEE et al., 2001; RAVNAN et al., 2006; GRUCHY et al., 2007; ZOU et al., 2007).

Dois dos casos anteriormente relatados foram estudados utilizando a técnica de arrayCGH. Aviram- Oldring et al. (2000) identificaram uma duplicação de novo em 2p23-p25.2 seguida de uma deleção em 2p25.3 em uma menina com características dismórficas, atraso no desenvolvimento, hipotonia e cegueira cortical transitória. Zou et al. (2007) descreveram uma paciente com retardo mental e problemas comportamentais, portadora de uma translocação desequilibrada der(2)t(2;16) p25.3;q24.3) resultando em deleção de 2p25.3 e uma duplicação de 16p24.3. Além desses, Lo-Castro et al. (2009) relataram uma menina portadora de uma deleção de novo 2p25.2 com autismo, ADNPM moderado, microcefalia, agenesia do nervo óptico direito e características dismórficas.

Shaffer et al. (2006) usando arrayCGH, identificaram alguns indivíduos portadores de CNVs em 2p25 em um grande número de casos com amplo espectro clínico, incluindo ADNPM, convulsões e anomalias congênitas. No entanto, o significado clínico das alterações identificadas em 2p ainda não está claro devido ao tamanho pequeno e à indisponibilidade de verificação da origem dessas alterações (herdadas/de novo).

De acordo com o Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER, <http://decipher.sanger.ac.uk/>) há uma paciente (#249996-DECIPHER) que apresenta uma deleção de novo em 2p25.1, CNV, com hipertelorismo, ADNPM, hipotonia, crises convulsivas e ICMU.

Destacamos que o caso 7 é o sexto filho fissurado de casal consanguíneo e que apresenta ICUM como único estigma clínico, em comum, quando comparado com o caso (#249996-DECIPHER). Esses resultados nos direcionam para uma investigação genética nos pais e irmãos do paciente para elucidar fatores genéticos em 2p25.2-p25.1 para o referido fenótipo. No entanto, comparando-se os achados clínicos em todos esses pacientes relatados, não foi possível estabelecer uma correlação definitiva entre a gravidade do fenótipo e do

tamanho ou tipo de alteração. Assim, outros casos deverão ser apresentados para que consigamos realizar correlações genótipo/fenótipo e esclarecer a importância desta região cromossômica na genética clínica.

O caso 14 apresentou uma duplicação envolvendo o cromossomo X (tabela 8), de 18Kb em Xq13.3 identificada por arrayCGH. Ele é um indivíduo do sexo masculino que apresenta características clínicas como: estrabismo divergente, narinas antivertidas, “abertura” do palato mole devido teratomas faríngeos, baixa implantação das orelhas, hélices simplificadas e malformadas, anti hélice anômala, disfagia, punhos cerrados, hipotonia e ADNMP (figura 20a).

Mansouri et al. (2005) relataram uma menina com t(X;15)(q13.3;cen) que apresentou grave deficiência intelectual e QI inferior a 30, dismorfismo facial caracterizado por nariz pequeno, epicanto, palato alto, grandes incisivos, linha capilar posterior baixa, mãos pequenas com clinodactilia no quinto dedo, pés pequenos com posição de plano-valgo, ausência da fala, dificuldades sociais com episódios de raiva e dificuldade em realizar tarefas diárias.

ArrayCGH identificou pontos de quebra no cromossomo 15, 4,5Mb distal a posição da síndrome de Prader-Willi (PWS), e no cromossomo X a quebra ocorreu no éxon 1 do gene ZDHHC15. Estudo de metilação confirmou a inativação total dos cromossomos X normais, evidenciando que deleção no gene ZDHHC15 está relacionada a deficiência intelectual não síndrômica ligado ao X (XLMR). Duplicação no braço longo do cromossomo X (Xq) inclui duplicações intra cromossômica, trissomias parciais resultantes de translocação não balanceada entre cromossomos autossomo ou cromossomo Y e outras alterações ligadas ao X. A inativação do cromossomo X desempenha um importante papel na expressão clínica destes desequilíbrios cromossômicos gerando um fenótipo mais sutil nas mulheres que nos homens (CHEN et al., 2005). Grandes duplicações Xq são raras, e nos homens estão associadas a

múltiplas anomalias congênitas e ADNPM (CHEN et al., 2005; GABBETT et al., 2008; LUGTENBERG et al., 2009). Chen et al. (2005) caracterizaram o fenótipo da duplicação Xq em homens basicamente como a presença de hipotonia, genitália hipoplásica, criptorquidismo, malformação craniofacial, dificuldades para alimentação, alterações endócrinas e ADNPM.

Sismani et al. (2013) descrevem, pela primeira vez, uma autópsia em um feto masculino portador de uma duplicação de 14,5Mb em Xq13.2-q21.3. O feto apresentou aumento de translucência nugal, polidrâmnio, macrossomia simétrica, hipertelorismo, olhos proeminentes, prega simiesca, atreseia esofágica, anomalias cardíacas, hepatomegalia, esplenomegalia e tórax saliente, demonstrando que o fenótipo da duplicação Xq é variado e associado aos genes presentes na duplicação.

O caso relatado no presente estudo, associado aos casos da literatura citada, demonstra que o fenótipo para dup(Xq) é variado. Mansouri et al., (2005) sugerem que o gene ZDHHC15 é candidato para LXMR não sindrômica devido ao alto grau de conservação deste gene em diferentes espécies e com aparente função no desenvolvimento. A duplicação em Xq13.3, no nosso caso é, insuficiente para justificar o quadro clínico descrito, porém corrobora para a necessidade de descrição de outros casos para possibilitar correlação genótipo/fenótipo mais precisa.

Os casos 08 e 09 apresentaram deleção de aproximadamente 1 Kb na região cromossômica 2p21 pela análise de arrayCGH, no entanto esta alteração não foi confirmada pela análise MPLC. Ambos os casos apresentam fenótipo clássicos da HPE e, o fato do gene SIX3 estar localizado nessa região cromossômica, esta deleção explicaria o fenótipo dos indivíduos. Contudo, como a deleção é pequena e não foi possível validar o resultado do arrayCGH, consideramos o resultado normal. Mantivemos a apresentação dos casos no estudo

para ressaltar a importância da validação das análises, mesmo que genes na região alterada estejam associados ao fenótipo do paciente.

Os resultados clínicos e moleculares dos outros dez casos pertencentes a este estudo resultaram na elaboração de 03 artigos científicos submetidos à publicação. O primeiro refere-se ao relato clínico e molecular do paciente 12. Este paciente apresentou apenas fissura de lábio/palato e leve hipotelorismo como características da HPE, assim fizemos um relato separado pois diferia do fenótipo típico da microforma de HPE. O artigo foi aceito para publicação no periódico *Molecular Syndromology*. Portanto, a discussão referente a este caso encontra-se no apêndice - artigos enviados para publicação (APÊNDICE B).

O segundo artigo elaborado relata os achados clínicos e moleculares dos pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11 e 13. Portanto, a discussão pertinente a estes casos encontra-se no artigo submetido ao periódico *American Journal of Medical Genetics*, em avaliação pela revista, no apêndice - artigos enviados para publicação (APÊNDICE C).

O caso 6, o qual apresentou fenótipo sindrômico associado ao espectro de HPE com cinco deleções e uma duplicação está descrito no artigo submetido a publicação no periódico *Molecular Genetics and Genomics*, em avaliação pela revista, no apêndice - artigos enviados para publicação (APÊNDICE D).

7. CONCLUSÃO

A HPE é uma malformação do SNC devido a uma falha na divisão dos hemisférios direito e esquerdo do cérebro. Sabe-se que sua etiologia é múltipla e complexa. Evidências genéticas são apresentadas todo ano por diversos grupos que estudam HPE e a correlação genótipo/fenótipo continua sendo um desafio para os geneticistas.

O presente estudo teve como objetivo identificar microdeleções/duplicações e novos genes ou regiões cromossômicas relacionadas com a HPE. Após análise molecular concluímos que:

- a metodologia utilizada neste estudo permitiu a identificação de deleções/duplicações presentes nos indivíduos estudados, destacando deleções/duplicações nos genes já descritos como SHH, ZIC2, SIX3 e TGIF; e suas correlações genótipo/fenótipo.

- microdeleções/microduplicações em novas regiões cromossômicas foram identificadas como deleção em 8p23.3 e duplicação em 13q14.2;

- identificamos um recente mecanismo de rearranjo cromossômico, chromotrypsis, em um caso cujo fenótipo envolvia múltiplas malformações e sinais faciais de HPE.

A identificação de novos genes para HPE, como proposto neste trabalho, não foi realizada uma vez que as alterações genéticas apresentadas não permitiram a nomeação de um gene específico que pudesse interferir diretamente no fenótipo dos pacientes envolvidos.

Análises de expressão gênica em modelo animal é uma boa estratégia a ser utilizada, em trabalhos futuro, na validação de novos genes ou vias metabólicas associadas ao desenvolvimento da linha média. No apêndice E apresentamos um breve relatório sobre as atividades realizadas durante o Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de Rennes I, Rennes - França, onde a participação no projeto de pesquisa ,vinculado a Universidade de Rennes I,

intitulado “Entendendo as bases moleculares de uma doença do prosencéfalo: holoprosencefalia”, permitiu o aprendizado das técnicas de expressão para que as mesmas possam ser implantadas e desenvolvidas em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

ALAPPAT, S.; ZHANG, Z.Y; CHEN, Y.P. Msx homeobox gene family and craniofacial development. **Cell research**, v. 13, n. 6, p. 429-442, 2003.

AVIRAM-GOLDRING, A. et al. Molecular cytogenetic studies in three patients with partial trisomy 2p, including CGH from paraffin-embedded tissue. **American journal of medical genetics**, v. 91, n. 1, p. 74-82, 2000.

BANO, S.; CHAUDHARY, V. and YADAV, S. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/31404/InTech-congenital_malformation_of_the_brain.pdf>. Acessado em 10/10/2014.

BATTAGLIA, A. et al. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. **Pediatrics**, v. 121, n. 2, p. 404-410, 2008.

BECCARI, L.; MARCO-FERRERES, R.; BOVOLENTA, P. The logic of gene regulatory networks in early vertebrate forebrain patterning. **Mechanisms of development**, v. 130, n. 2, p. 95-111, 2013.

BELLONI, E. et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. **Nature genetics**, v. 14, 1996.

BENDAVID, C. et al. MLPA screening reveals novel subtelomeric rearrangements in holoprosencephaly. **Human mutation**, v. 28, n. 12, p. 1189-1197, 2007.

BENDAVID, C. et al. Array-CGH analysis indicates a high prevalence of genomic rearrangements in holoprosencephaly: An updated map of candidate loci. **Human mutation**, v. 30, n. 8, p. 1175-1182, 2009.

BENDAVID, C. et al. Holoprosencephaly: an update on cytogenetic abnormalities. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2010. p. 86-92.

BROWN, J. et al. Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). **Nature medicine**, v. 7, n. 4, p. 497-501, 2001.

BROWN, S.A. et al. Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. **Nature genetics**, v. 20, n. 2, p. 180-183, 1998.

CHABCHOUB, E. et al. Holoprosencephaly and ZIC2 microdeletions: novel clinical and epidemiological specificities delineated. **Clinical genetics**, v. 81, n. 6, p. 584-589, 2012.

CHAI, Y. et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. **Development**, v. 127, n. 8, p. 1671-1679, 2000.

CHANG, L. Alobar holoprosencephaly: report of two cases with unusual findings. **Chang Gung medical journal**, v. 26, n. 9, p. 700-706, 2003.

CHEN, J.K. et al. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. **Genes & development**, v. 16, n. 21, p. 2743-2748, 2002.

CHENG, S.F. et al. Xq chromosome duplication in males: clinical, cytogenetic and array CGH characterization of a new case and review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 135, n. 3, p. 308-313, 2005.

CHEN, E. et al. Cytogenetic and array CGH characterization of de novo 1p36 duplications and deletion in a patient with congenital cataracts, hearing loss, choanal atresia, and mental retardation. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146, n. 21, p. 2785-2790, 2008.

CHIANG, C. et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. **Nature** n.383, p.407-413, 1996.

CHIANG, C. et al. Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. **Nature genetics**, v. 44, n. 4, p. 390-397, 2012.

COHEN, M. Michael. Perspectives on holoprosencephaly: Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. **Teratology**, v. 40, n. 3, p. 211-235, 1989.

COHEN M.M.Jr. **The Child with Multiple Birth Defects**. 2nd Edition. Oxford Monographs on Medical Genetics. n.31. New York – Oxford, Oxford University Press. 1997.

COHEN, M.M. The hedgehog signaling network. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 123, n. 1, p. 5-28, 2003.

COHEN, M.M. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. Birth Defects Research Part A: **Clinical and Molecular Teratology**, v. 76, n. 9, p. 658-673, 2006.

DAKUBO, G.D. et al. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. **Development**, v. 130, n. 13, p. 2967-2980, 2003.

Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources – DECIPHER #249996.[home page internet]. [10 Outubro 2014].
<https://decipher.sanger.ac.uk/patient/249996#overview>

DEE, S.L. et al. A case of ring chromosome 2 with growth retardation, mild dysmorphism, and microdeletion of 2p detected using FISH. **Journal of medical genetics**, v. 38, n. 9, p. e32-e32, 2001.

DYMENT, D.A. et al. Recent advances in the genetic etiology of brain malformations. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 13, n. 8, p. 1-10, 2013.

DEMYER, W.; ZEMAN, W.; PALMER, C.G. The face predicts the brain: diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arhinencephaly). **Pediatrics**, v. 34, n. 2, p. 256-263, 1963.

DOUBOURG C. Holoprosencephaly. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v.2.n8. 2007.

DUBOURG, C. et al. Clinical utility gene card for: Holoprosencephaly. **European journal of human genetics**, v. 19, n. 1, 2011.

FRANCIS-WEST, P. et al. Signalling interactions during facial development. **Mechanisms of development**, v. 75, n. 1, p. 3-28, 1998.

FRASER, S.; KEYNES, R.; LUMSDEN, A. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. **Nature**, v. 344, n. 6265, p. 431-435, 1990.

GABBETT, M. T. et al. Prader–Willi syndrome phenocopy due to duplication of Xq21. 1–q21. 31, with array CGH of the critical region. **Clinical genetics**, v. 73, n. 4, p. 353-359, 2008.

GAJECKA, M.; MACKAY, K.L.; SHAFFER, L.G. Monosomy 1p36 deletion syndrome. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2007. p. 346-356.

GIANNIKOU, K. et al. Further delineation of novel 1p36 rearrangements by array-CGH analysis: narrowing the breakpoints and clarifying the “extended” phenotype. **Gene**, v. 506, n. 2, p. 360-368, 2012.

GOODRICH, L.V. et al. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1109-1113, 1997.

GOODRICH, L.V.; SCOTT, M.P. Hedgehog and patched in neural development and disease. **Neuron**, v. 21, n. 6, p. 1243-1257, 1998.

GORLIN, R.J. et al. **Syndromes of the Head and Neck**. New York: Oxford University Press. p. 707-9, 977-81, 1990.

GORLIN, R.J., COHEN, M.M., RAOUL, C.M. **Syndromes of head and neck**. 4th ed. New York, NY: Oxford University press; 2001, p. 707-9, 977-81.

GRINDLEY, J.C. et al. Evidence for the Involvement of the Gli gene Family in Embryonic Mouse Lung Development. **Developmental biology**, v. 188, n. 2, p. 337-348, 1997.

GRIPP, K.W. et al. Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. **Nature genetics**, v. 25, n. 2, p. 205-208, 2000.

GRUCHY, N. et al. Recurrent inverted duplication of 2p with terminal deletion in a patient with the classical phenotype of trisomy 2p23-pter. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143, n. 20, p. 2417-2422, 2007.

HEILSTEDT, H.A. et al. Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 5, p. 1200-1212, 2003.

HENNEKAM, R. et al. Elements of morphology: Standard terminology for the nose and philtrum. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149, n. 1, p. 61-76, 2009.

HOLLAND, A.J.; CLEVELAND, D.W. Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. **Nature medicine**, v. 18, n. 11, p. 1630-1638, 2012.

JAVAD, H. et al. Semilobar Holoprosencephaly with Neurogenic Hypernatraemia: Two new cases. **Sultan Qaboos University medical journal**, v. 13, n. 3, p. E463, 2013.

JOHNSON, C.Y.; RASMUSSEN, S.A. Non-genetic risk factors for holoprosencephaly. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company**, 2010. p. 73-85.

JOHNSON, R.L.; SCOTT M.P. Hedgehog signaling: New players and perplexities join the pathway. **Currium Opinion Genetic Development**. v. 8, p. 450-456, 1998.

KALDERON, D. Transducing the hedgehog signal. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 371-374, 2000.

KAMNASARAN, D. et al. Defining a holoprosencephaly locus on human chromosome 14q13 and characterization of potential candidate genes. **Genomics**, v. 85, n. 5, p. 608-621, 2005.

KLOOSTERMAN, W.P. et al. Constitutional chromothripsis rearrangements involve clustered double-stranded DNA breaks and nonhomologous repair mechanisms. **Cell reports**, v. 1, n. 6, p. 648-655, 2012.

KLOOSTERMAN, W. P.; CUPPEN, E. Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. **Current opinion in cell biology**, v. 25, n. 3, p. 341-348, 2013.

KOIVISTO, P.A. et al. A de novo deletion of chromosome 15(q15.2q21.2) in a dysmorphic, mentally retarded child with congenital scalp defect. **Clinical dysmorphology**, v. 8, n. 2, p. 139-141, 1999.

LACBAWAN, F.L.; MUENKE, M. Central nervous system embryogenesis and its failures. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 5, n. 5, p. 425-447, 2002.

LACBAWAN, F. et al. Clinical Spectrum of SIX3-Associated Mutations in Holoprosencephaly: Correlation between Genotype, Phenotype, and Function. **Journal of medical genetics**, 2009.

LAI, K.; ROBERTSON, M.J.; SCHAFFER, D.V. The sonic hedgehog signaling system as a bistable genetic switch. **Biophysical journal**, v. 86, n. 5, p. 2748-2757, 2004.

LALANI, S.R. et al. Coarctation of the aorta and mild to moderate developmental delay in a child with a de novo deletion of chromosome 15 (q21. 1q22. 2). **BMC medical genetics**, v. 7, n. 1, p. 8, 2006.

LIPINSKI, R.J. et al. Cleft lip and palate results from Hedgehog signaling antagonism in the mouse: phenotypic characterization and clinical implications. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 88, n. 4, p. 232-240, 2010.

LIU, P. et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 889-903, 2011.

LO-CASTRO, Adriana et al. Deletion 2p25. 2: a cryptic chromosome abnormality in a patient with autism and mental retardation detected using aCGH. **European journal of medical genetics**, v. 52, n. 1, p. 67-70, 2009.

LOWE, L.H. et al. Midface Anomalies in Children 1. **Radiographics**, v. 20, n. 4, p. 907-922, 2000.

LUGTENBERG, D. et al. Xq13. 2q21. 1 duplication encompassing the ATRX gene in a man with mental retardation, minor facial and genital anomalies, short stature and broad thorax. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149, n. 4, p. 760-766, 2009.

LUMSDEN, A.; KEYNES, R. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. **Nature**, v. 337, n. 6206, p. 424-428, 1989.

LUPSKI, J.R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. **Trends in genetics**, v. 14, n. 10, p. 417-422, 1998.

MACHADO, I.N.; HEINRICH, J.K.; BARINI, R. Genomic imbalances detected through array CGH in fetuses with holoprosencephaly. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 69, n. 1, p. 3-8, 2011.

MANSOURI, M.R. et al. Loss of ZDHHC15 expression in a woman with a balanced translocation t (X; 15)(q13.3; cen) and severe mental retardation. **European journal of human genetics**, v. 13, n. 8, p. 970-977, 2005.

MAO, J.J.; NAH, H. Growth and development: hereditary and mechanical modulations. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 125, n. 6, p. 676-689, 2004.

MARAZITA, M.L.; MOONEY, M.P. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. **Clinics in plastic surgery**, v. 31, n. 2, p. 125-140, 2004.

MARTÍ, E.; BOVOLenta, P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 2, p. 89-96, 2002.

MATSUNAGA, E.I.; SHIOTA, K. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. **Teratology**, v. 16, n. 3, p. 261-272, 1977.

MAZZOLA, R. F. Congenital malformations in the frontonasal area: their pathogenesis and classification. **Clinics in plastic surgery**, v. 3, n. 4, p. 573-609, 1976.

McMAHON, A.P. More surprises in the Hedgehog signaling pathway. **Cell**, v. 100, n. 2, p. 185-188, 2000.

MERCIER, S. et al. Genetic counseling and “molecular” prenatal diagnosis of holoprosencephaly (HPE). In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2010. p. 191-196.

MERCIER, S. et al. New findings for phenotype–genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. **Journal of medical genetics**, v. 48, n. 11, p. 752-760, 2011.

MERRITT, L. Part 1. Understanding the embryology and genetics of cleft lip and palate. **Advances in neonatal care**, v. 5, n. 2, p. 64-71, 2005.

MING, J.E.; MUENKE, M. Holoprosencephaly: from Homer to hedgehog. **Clinical genetics**, v. 53, n. 3, p. 155-163, 1998.

MING, J.E.; MUENKE, M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. **American journal of human genetics**, v. 71, n. 5, p. 1017, 2002.

MONUKI, E.S. The morphogen signaling network in forebrain development and holoprosencephaly. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 66, n. 7, p. 566-575, 2007.

NAZARYAN, L. et al. The strength of combined cytogenetic and mate-pair sequencing techniques illustrated by a germline chromothripsis rearrangement involving FOXP2. **European Journal of Human Genetics**, 2013.

NORMAN M. **Congenital malformations of the brain. Pathological, embryonal, clinical, radiological and genetics aspects**. Oxford: Oxford University Press. p. 9, 187–221, 1995.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#236100: Holoprosencephaly. [home page internet]. Baltimore: Jonhs Hopkins University; 2010 [10 novembro 2010]. Aavailable from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/236100>.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#165230: Gli-kruppel Family Member 2; gli2. [home page internet]. Baltimore: Jonhs Hopkins University; 2010 [10 novembro 2010]. Aavailable from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/165230>.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#601309: Patched homolog of 1; ptch1. [home page internet]. Baltimore: Jonhs Hopkins University; 2010 [10 novembro 2010]. Aavailable from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/601309>.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#602630: Transforming Growth Factor-Beta-Induced Factor; TGIF. [home page internet]. Baltimore: Jonhs Hopkins University; 2010 [10 novembro 2010]. Aavailable from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/602630>.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#603714: Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog of, 3; SIX3. [home page internet]. Baltimore: Jonhs Hopkins University; 2010 [10 novembro 2010]. Aavailable from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/603714>.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#603073: Zinc Finger Protein of Cerebellum 2; ZIC2. [home page internet]. Baltimore: Jonhs Hopkins University; 2010 [10 novembro 2010]. Aavailable from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/603073>.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#600725: Sonic Hedgehog; SHH. [home page internet]. Baltimore: Jonhs Hopkins University; 2010 [10 novembro 2010]. Aavailable from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/600725>.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#607872: CHROMOSOME 1p36 DELETION SYNDROME [home page internet]. Baltimore: Jonhs Hopkins University; 2014 [10 outubro 2014]. Aavailable from: <http://omim.org/entry/607872>.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#607502: DISPATCHED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 1; DISP1 [home page internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2014 [10 outubro 2014]. Available from: <http://omim.org/entry/607502?search=607502&highlight=607502>

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#603621: FORKHEAD BOX H1; FOXH1 [home page internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2014 [10 outubro 2014]. Available from: <http://omim.org/entry/603621?search=603621&highlight=603621>

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#601265: NODAL, MOUSE, HOMOLOG OF; NODAL [home page internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2014 [10 outubro 2014]. Available from: <http://omim.org/entry/601265?search=601265&highlight=601265>

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.#610828: HOLOPROSENCEPHALY 7; HPE7 [home page internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2014 [10 outubro 2014]. Available from: <http://omim.org/entry/610828?search=610828&highlight=610828>

ORIOLI, I.M. et al. Identification of novel mutations in SHH and ZIC2 in a South American (ECLAMC) population with holoprosencephaly. **Human genetics**, v. 109, n. 1, p. 1-6, 2001.

ORIOLI, I.M.; CASTILLA, Eduardo E. Epidemiology of holoprosencephaly: Prevalence and risk factors. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2010. p. 13-21.

PAN, A. et al. A review of hedgehog signaling in cranial bone development. **Frontiers in physiology**, v. 4, 2013.

PASSOS-BUENO, M.R.; ORNELAS, C.C.; FANGANIELLO, R.D. Syndromes of the first and second pharyngeal arches: a review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149, n. 8, p. 1853-1859, 2009.

PAULUSSEN, A.D.C. et al. The unfolding clinical spectrum of holoprosencephaly due to mutations in SHH, ZIC2, SIX3 and TGIF genes. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. 9, p. 999-1005, 2010.

PICCIONE, M. et al. 14q13. 1-21.1 deletion encompassing the HPE8 locus in an adolescent with intellectual disability and bilateral microphthalmia, but without holoprosencephaly. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 158, n. 6, p. 1427-1433, 2012.

PLAISANCIE, J. et al. Constitutional chromoanasythesis: Description of a rare chromosomal event in a patient. **European journal of medical genetics**, 2014.

RAVNAN, J.B. et al. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. **Journal of medical genetics**, v. 43, n. 6, p. 478-489, 2006.

RICCOMAGNO, M.M. et al. Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. **Genes & development**, v. 16, n. 18, p. 2365-2378, 2002.

RICHIERI-COSTA, A.; RIBEIRO, L.A. Holoprosencephaly-like phenotype: Clinical and genetic perspectives. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 140, n. 23, p. 2587-2593, 2006.

RIBEIRO, L.A.; MURRAY, J.C.; RICHIERI-COSTA, A. PTCH mutations in four Brazilian patients with holoprosencephaly and in one with holoprosencephaly-like features and normal MRI. **American journal of medical genetics Part A**, v. 140, n. 23, p. 2584-2586, 2006.

RHINN, M.; PICKER, A.; BRAND, M. Global and local mechanisms of forebrain and mid-brain patterning. **Current opinion in neurobiology**, v. 16, n. 1, p. 5-12, 2006.

ROACH, E. et al. Holoprosencephaly: birth data, genetic and demographic analyses of 30 families. **Birth defects original article series**, v. 11, n. 2, p. 294-313, 1974.

ROESSLER, E. et al. Structure of the human Lanosterol synthase gene and its analysis as a candidate for holoprosencephaly (HPE1). **Human genetics**, v. 105, n. 5, p. 489-495, 1999.

ROESSLER, E.; MUENKE, M. Holoprosencephaly: a paradigm for the complex genetics of brain development. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 21, n. 5, p. 481-497, 1998.

ROESSLER, Erich; MUENKE, Maximilian. Midline and laterality defects: Left and right meet in the middle†. **Bioessays**, v. 23, n. 10, p. 888-900, 2001.

ROESSLER, E.; MUENKE, M. The molecular genetics of holoprosencephaly. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2010. p. 52-61.

ROESSLER, E. et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p. 13424-13429, 2003.

ROESSLER, E. et al. Utilizing prospective sequence analysis of SHH, ZIC2, SIX3 and TGIF in holoprosencephaly probands to describe the parameters limiting the observed frequency of mutant gene x gene interactions. **Molecular genetics and metabolism**, v. 105, n. 4, p. 658-664, 2012.

ROSENBERG, C. et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. **Journal of medical genetics**, v. 43, n. 2, p. 180-186, 2006.

SALES, C.B.S. Expressão de componentes da via de sinalização Sonic hedgehog (HHI, PTCH1 e SHH) e VEGF-A em carcinoma escamocelular: associação com imunomarcção de

VEGF-A e microdensidade vascular. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, 2012.

SANTIAGO G. Holoprosencefalia: Clínica e Linguagem. Dissertação para a obtenção do título de Mestre, HRAC/USP, Bauru-SP, 2006.

SAVASTANO, C.P. et al. Rare nasal cleft in a patient with holoprosencephaly due to a mutation in the ZIC2 gene. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 100, n. 4, p. 300-306, 2014.

SCHIMMENTI, L.A. et al. Novel mutation in sonic hedgehog in non-syndromic colobomatous microphthalmia. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 116, n. 3, p. 215-221, 2003.

SCHOUTEN, J.P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. e57-e57, 2002.

SHAFFER, L.G. et al. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. **The Journal of pediatrics**, v. 149, n. 1, p. 98-102. e5, 2006.

SHAFFER, L.G. et al. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2007. p. 335-345.

SHANSKE, A.L. Introductory comments on special section—New developments in craniofacial biology: Putting on a happy face. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152, n. 12, p. 2943-2946, 2010.

SISMANI, C. et al. A prenatally ascertained, maternally inherited 14.8 Mb duplication of chromosomal bands Xq13. 2–q21. 31 associated with multiple congenital abnormalities in a male fetus. **Gene**, v. 530, n. 1, p. 138-142, 2013.

SOBREIRA, N.L.M. et al. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. **Genome research**, v. 21, n. 10, p. 1720-1727, 2011.

SOLOMON, B.D. et al. Mutations in ZIC2 in human holoprosencephaly: description of a novel ZIC2 specific phenotype and comprehensive analysis of 157 individuals. **Journal of medical genetics**, p. jmg. 2009.073049, 2009.

SOLOMON, B.D. et al. Analysis of genotype–phenotype correlations in human holoprosencephaly. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2010. p. 133-141.

STEPHENS, P.J. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 27-40, 2011.

SWATEK, Jarosław; SZUMIŁO, Justyna; BURDAN, Franciszek. Alobar holoprosencephaly with cyclopia–Autopsy-based observations from one medical center. **Reproductive Toxicology**, v. 41, p. 80-85, 2013.

THOROGOOD, P.; FERRETTI, P. Heads and tails: recent advances in craniofacial development. **British dental journal**, v. 173, n. 9, p. 301-306, 1992.

WALLIS, D.E. et al. Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. **Nature genetics**, v. 22, n. 2, p. 196-198, 1999.

WETMORE, C. Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models. **Current opinion in genetics & development**, v. 13, n. 1, p. 34-42, 2003.

WILKIE, A.O.M; MORRISS-KAY, G.M. Genetics of craniofacial development and malformation. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 6, p. 458-468, 2001.

WILSON, S.W.; HOUART, C. Early steps in the development of the forebrain. **Developmental cell**, v. 6, n. 2, p. 167-181, 2004.

YI, Z. et al. Prenatal diagnosis of pure partial monosomy 18p associated with holoprosencephaly and congenital heart defects. **Gene**, v. 533, n. 2, p. 565-569, 2014.

ZANARDO, É.A. et al. Complex structural rearrangement features suggesting chromoanagenesis mechanism in a case of 1p36 deletion syndrome. **Molecular Genetics and Genomics**, p. 1-7, 2014.

ZHANG, F.; CARVALHO, C.; LUPSKI, R. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. **Trends in genetics**, v. 25, n. 7, p. 298-307, 2009.

ZOU, Y.S.; VAN DYKE, D.L.; ELLISON, J.W. Microarray comparative genomic hybridization and FISH studies of an unbalanced cryptic telomeric 2p deletion/16q duplication in a patient with mental retardation and behavioral problems. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143, n. 7, p. 746-751, 2007.

APÊNDICE A

Descrição clínica e molecular dos casos

Caso 1. O paciente foi avaliado aos quatro anos de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados coletados informaram que houve acompanhamento pré-natal materno, nascimento pré-termo de 36 semanas, sem intercorrências. O histórico pediátrico revelou ser filho de casal não consanguíneo (idade materna 26a e paterna 40a), relata que irmão apresenta FLP sem outras anomalias (irmão não estava presente na consulta). Na avaliação genético clínica aos quatro anos seus dados antropométricos foram, peso (P) = 12,000g e estatura (E)= 88cm; fissura unilateral transforame direita; microcefalia; defeito de escarpa não congênito; fâcies grosseira; microftalmia bilateral; queixo proeminente com reentranças; hipospádia; escroto bífido; criptorquidia; mega colon congênito; sindactilia dos arelhos 2 e 3 à esquerda e 2 e 3 e 4 e 5 à direita; distúrbio de linguagem; hipotonia generalizada; crises convulsivas e ADNPM. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XY. A avaliação molecular por MLPA realizada no presente estudo revelou 46,XY.mlpaSHH(P187)x1. Figura 7.

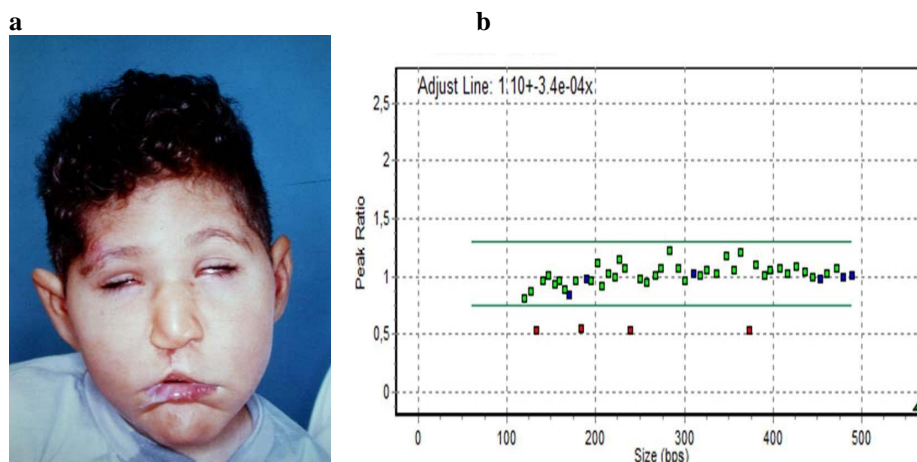


Figura 7: a) Aspecto facial do caso 1; b) deleção no gene *SHH* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *SHH*, deletadas.

Caso 2. A paciente foi avaliada aos quatro meses pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram que houve acompanhamento pré-natal materno, porém relata dois abortos espontâneos ao sétimo e oitavo mês de gestação, respectivamente. Seu histórico pediátrico revelou ser filha de casal não consanguíneo (idade materna 26a e paterna 28a). Durante a avaliação genética clínica os dados antropométricos foram, P= 4,850g, E= 57cm, perímetro cefálico (PC)= 34 cm; fissura mediana transforame;, microcefalia; frontal pequeno; base baixa; anoftalmia à E; microftalmia à D; artelhos sobrepostos; orelhas rodadas e anômalas e posição do pescoço reclinada para trás. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XX. A avaliação molecular por MLPA realizada nesse estudo revelou 46,XX.mlpaSHH(P187)x1. Não há registro fotográfico do presente caso. Figura 8.

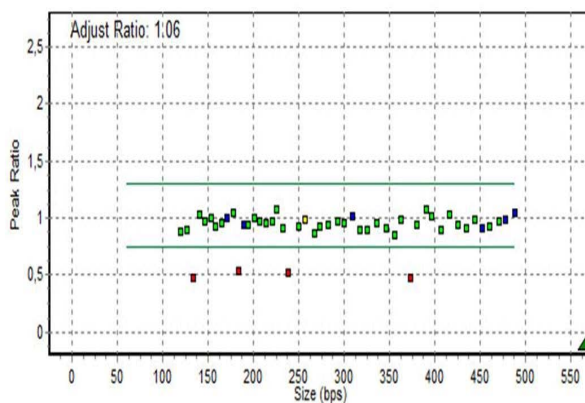


Figura 8: Deleção no gene *SHH* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *SHH*, deletadas.

Caso 3 – O paciente foi avaliado aos 30 dias de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno; episódio de infecção vaginal tratada rapidamente com aplicação de pomada no local e diabetes no oitavo mês de gestação (controlada com alimentação); nascimento pré-termo de 37 semanas, sem intercorrências. Seu histórico pediátrico revelou ser filho de casal não consanguíneo (idade materna 24a e paterna 25a). Durante a avaliação genética clínica seus dados antropométricos foram, P= 4400g, E= 51,7cm, PC= 34cm; fissura unilateral transforame direita; hipotelorismo ocular; base e ponte nasal achatadas; agenesia de septo nasal; retrognatia; anti hélice invertida; pescoço curto; cardiopatia congênita; hidronefrose a direita; penis invertido na bolsa escrotal; sindactilia parcial 2° e 3° artelhos à direita e implantação anômala de 3° artelho à esquerda. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XY. A avaliação molecular por MLPA realizada no presente trabalho revelou 46,XY.mlpSHH(P187)x1. Figura 9.

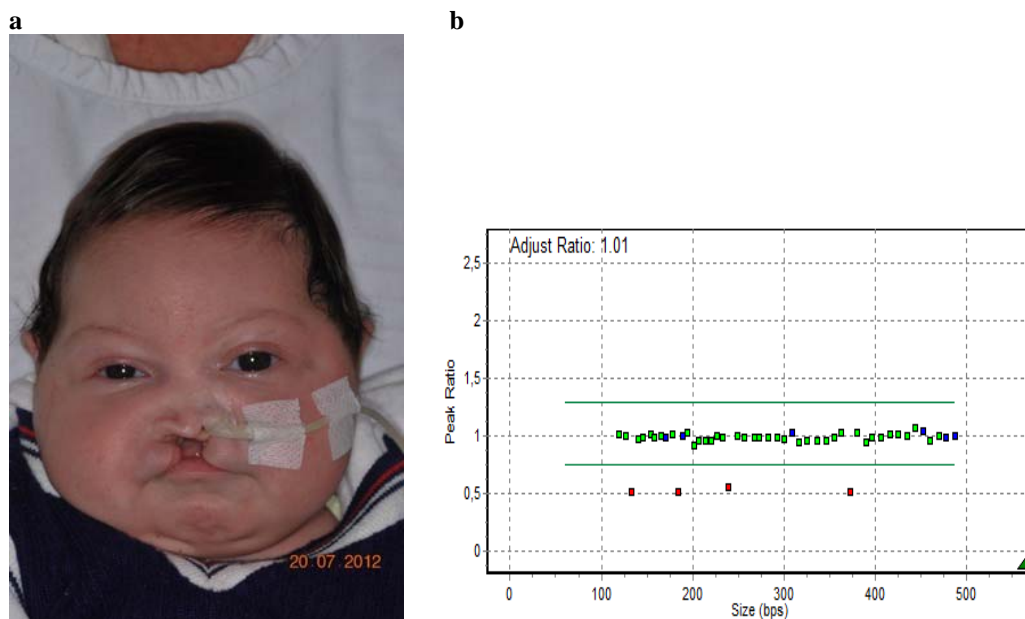


Figura 9: a) Aspecto facial do caso 3; b) deleção no gene *SHH* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *SHH*, deletadas.

Caso 4 – A paciente foi avaliada aos três meses de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno, ameaça de aborto no sexto mês, e parto cesariano com 37 semanas, sem intercorrências. Seu histórico pediátrico revelou ser filho de casal não consanguíneo (idade materna 27a e paterna 28a), peso ao nascimento (PN)=2,500g, estatura ao nascimento (EN)= 46cm e perímetro cefálico ao nascimento (PCN)= 31cm, necessitou de internação com um mês devido a febre persistente não acompanhado de crises convulsivas. Durante a avaliação genético clínica seus dados antropométricos foram, P= 4,600g , E= 55,8cm, PC= 34cm, fissura mediana pré-forame completa, microcefalia, fonte estreita, sutura metópica proeminente, hipotelorismo ocular, fendas palpebrais para cima, agenesia de septo nasal, aparente distúrbio do sono. Seu pai apresenta hipotelorismo aparente. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XX. A avaliação molecular por MLPA revelou 46,XY.mlpaTGIF(P187)x1. Figura 10.

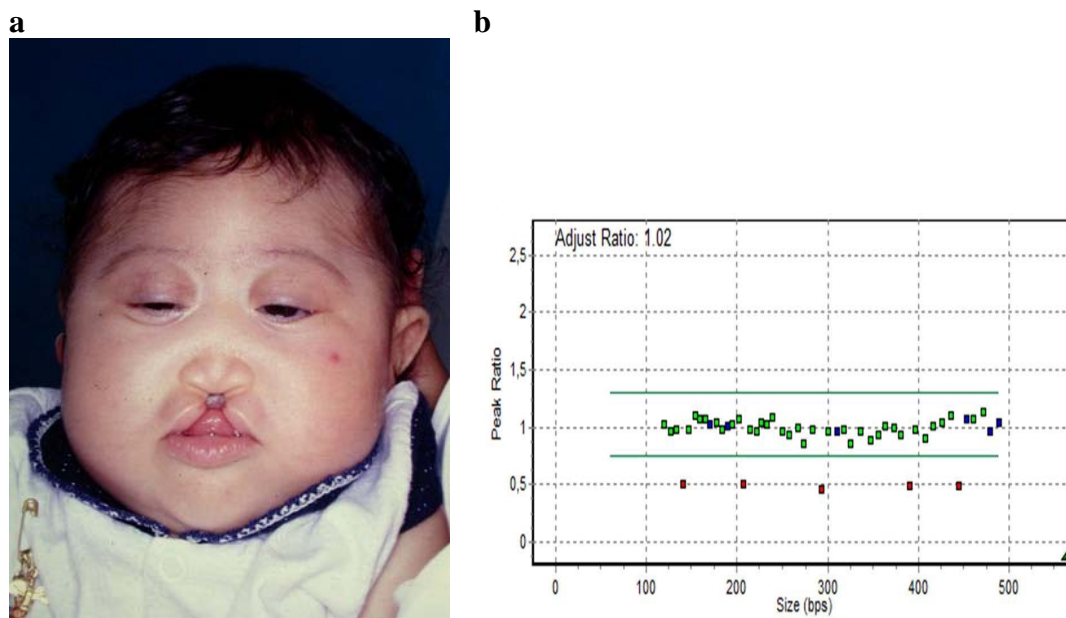


Figura 10: a) Aspecto facial do caso 4; b) deleção no gene *TGIF* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *TGIF*, deletadas.

Caso 5 – A paciente foi avaliada aos dois meses de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno, porém relata uso de medicamentos referentes a um episódio de gripe forte acompanhada de febre alta, sem intervenções gestacionais e nega uso abusivo de álcool e cigarro. Seu histórico pediátrico revelou ser terceira filha de casal não consanguíneo (idade materna 40a e paterna 31a) com histórico de um aborto espontâneo, nascimento pré-termo de 36 semanas, PN= 2,675g e EN= 45cm. No primeiro mês de vida a menor precisou de ventilação mecânica por duas vezes e teve crises convulsivas seguidas de internações recorrentes. Durante a avaliação genético clínica seus dados antropométricos foram, P= 4,095g, E= 51,5cm e PC= 36,5; fissura transforame bilateral atípica; agenesia de pró lábio; ponte nasal baixa; hemangioma plano na região das pálpebras e occipital; hipotelorismo aparente; base e ponte nasal baixa; perfil plano; lóbulo esquerdo anômalo; polidactilia pós axial de mãos; dígitos afilados; cardiopatia congênita; hipoplasia ungueal nos pés; crises convulsivas; disfagia e ADNPM. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XX. A avaliação molecular por MLPA revelou 46,XX.mlpZIC2(P187)x3. Figura 11.

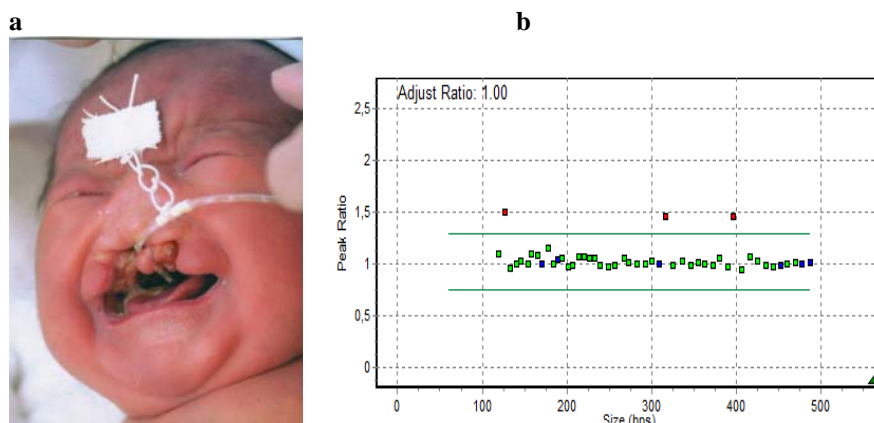


Figura 11: a) Aspecto facial do caso 5; b) duplicação no gene *ZIC2* detectada por MLPA. Os pontos verdes são sondas presentes nos genes relacionados à HPE, azuis são sondas controle e vermelhos são sondas presentes no gene *ZIC2*, duplicados.

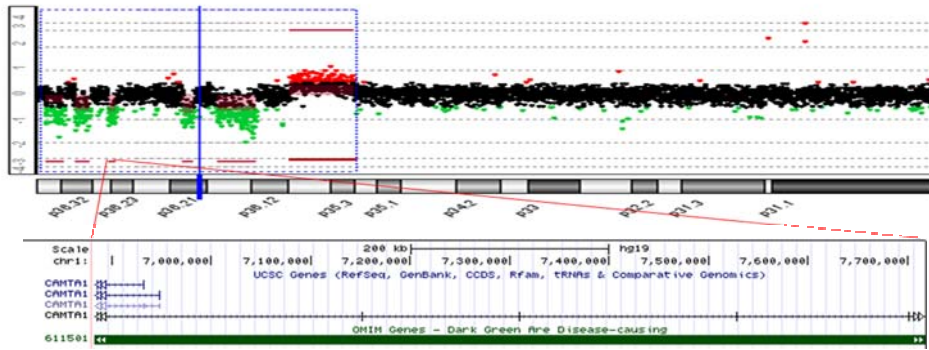
Caso 6 – O paciente foi avaliado aos cinco meses de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno, sem intervenções gestacionais. Mãe nega uso de álcool, drogas e medicamentos durante a gravidez. Seu histórico pediátrico revelou ser primeiro filho de casal não consanguíneo (idade materna 18a e paterna 29a), nascimento à termo, ausência dos dados antropométricos, quadro sindrômico associado a holoprosencefalia, dificuldade respiratória e crises convulsivas. Durante a avaliação genético clínica apresentou P= 4,715g, E= 59,4cm e PC= 38,1; microcefalia; hidrocefalia; FLP pré forame completa; hipotelorismo ocular; fendas palpebrais pequenas e estreitas; nariz hipoplásico; pré maxila hipoplásica; orelhas largas e proeminentes; desvio ulnar das mãos; polegar largo; genitália ambígua; pés tortos; halux curto e largo; ADNPM e meningocele. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XY. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou *[arr 1p36.33-p36.32 (1023846-2761528)x1]*; *[arr 1p36.32 (3696933-5200401)x1]*; *[arr 1p36.31-p36.23 (6882352-7718050)x1]*; *[arr 1p36.21 (14012378-14992103)x1]*; *[arr 1p36.13-p36.12 (17213968-20934341)x1]*; *[arr 1p36.11-p35.3 (24146844-30208750)x3]*.

Figura 12.

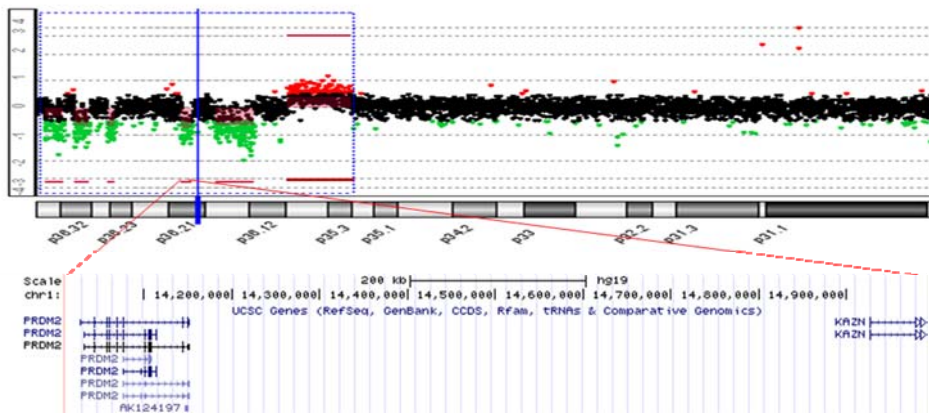
a



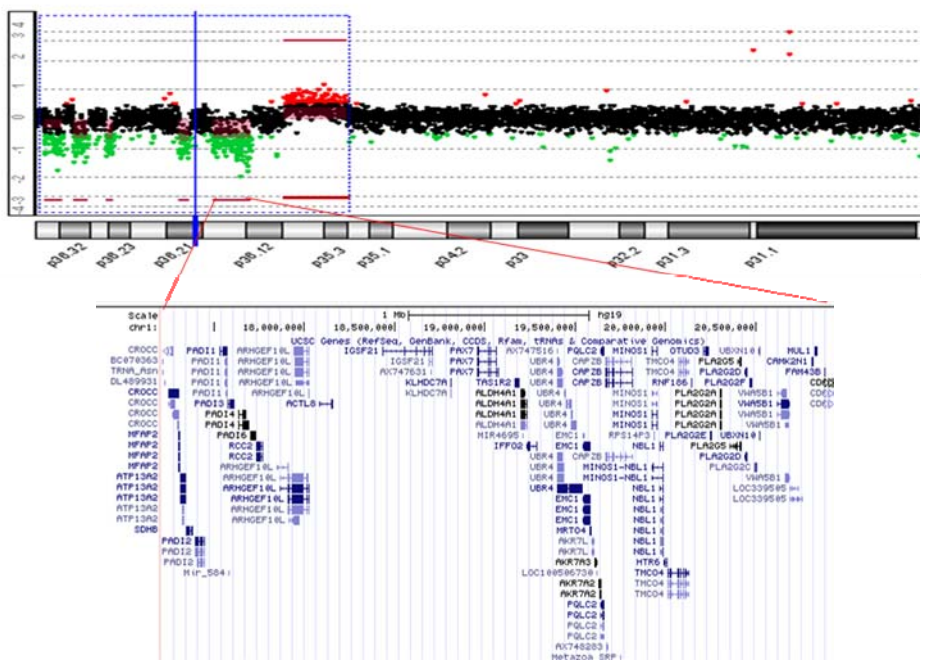
d



e



f



g

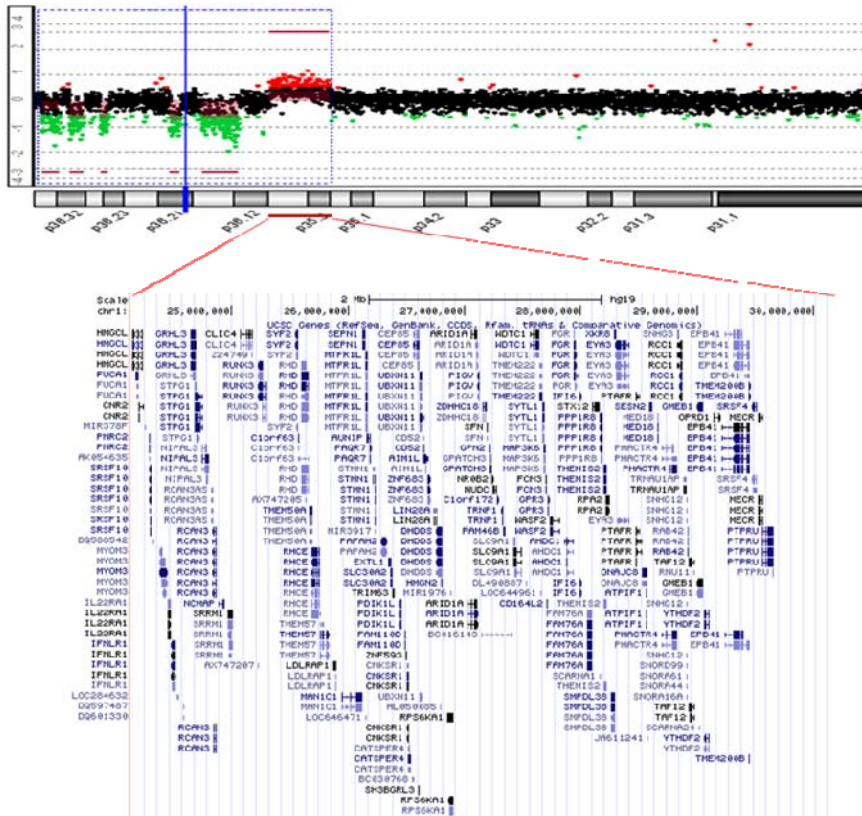


Figura 12: a) aspecto facial do caso 6; (b,c, d, e, f, g) deleções/duplicação detectada por *array*-CGH mostrando um rearranjo complexo em 1p36.33 – 1p35.3. b) deleção de 1,7Mb em 1p36.33-p36.32; c) deleção de 1,4Mb em 1p36.32; d) deleção de 0,83Mb em 1p36.31-p36.23; e) deleção de 0,94Mb em 1p36.21; f) deleção de 3,7Mb em 1p36.13-p36.12 e g) duplicação de 5,9Mb em 1p36.11-p35.3.

Caso 7 – O paciente foi avaliado aos seis anos de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram ausência de pré-natal materno, mas relata não haver intervenções gestacionais. Mãe negou uso de álcool, cigarro e medicamentos durante a gravidez. Seu histórico pediátrico revelou ser o sexto filho fissurado entre 17 filhos gerados (6 fissurados e 11 sem fissuras) de casal consanguíneo (idade materna 39a e paterna 42a), nascimento à termo, P=2,500g , choro imediato e crises convulsivas a partir do terceiro mês de idade. Durante a avaliação genético clínica apresentou P= 16,200g, E= 108cm, PC= 47,5; fissura transforame bilateral; fendas palpebrais obliquas para cima e ICMU. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou *[arr 2p25.2-p25.1 (6303390-7531358)x3]*. Figura 13.

a



b

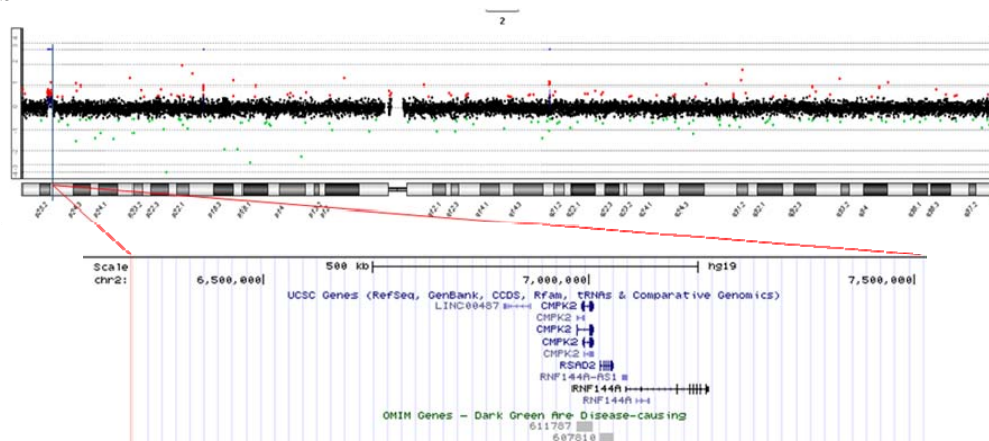


Figura 13: a) aspecto facial do caso 7; b) duplicação detectada por *arrayCGH* de 1,2Mb em 2p25.2-p25.1.

Caso 8 – A paciente foi avaliada aos 6 meses de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram pré-natal materno com ingestão de ácido fólico e sulfato de ferro a partir do terceiro mês de gestação, sem intervenções gestacionais, mãe negou uso de álcool, cigarro e medicamentos durante a gravidez. O histórico pediátrico revelou ser filho de casal não consanguíneo (idade materna 29a e paterna 34a), nascimento a termo, P=4,350g, EN= 54cm, PC=47cm, apgar 3/5; fissura transforame unilateral a esquerda; macrocefalia e hipotelorismo ocular. Durante a avaliação genético clínica apresentou P= 8,350g, E= 70cm e PC= 52; fissura transforame unilateral a esquerda; macrocefalia; hidrocefalia; estreitamento bitemporal; hipotelorismo ocular; base nasal baixa; hipoplasia de septo nasal; crises convulsivas e ADNPM. Ressonância magnética do crânio revelou holoprosencefalia alobar e agenesia de corpo caloso. A análise citogenética revelou cariótipo 46,XX. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou [*arr 2p21 (45168227-45169397)x1*]. Figura 14.

a



b

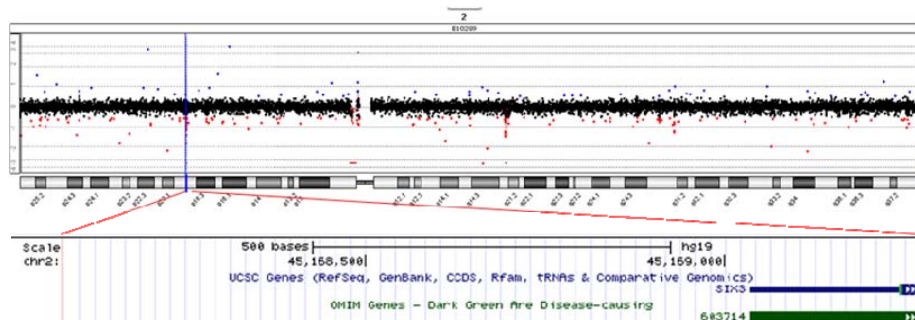


Figura 14: a) aspecto facial do caso 8; b) deleção detectada por *arrayCGH* de 0,01Mb em 2p21.

Caso 9 – O paciente foi avaliado aos 40 dias de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno, nascimento pré-termo de 38 semanas, sem intercorrências. O histórico pediátrico revelou ser segundo filho de casal não consanguíneo (idade materna 22a e paterna 24a), PN= 3,300g , EN= 49cm), mãe relata que irmão não apresenta anomalias (irmão não estava presente na consulta). Durante a avaliação genético clínica seus dados antropométricos foram, P= 3,560g, A= 53,2cm, PC= 33,5cm, DICI (distância intercantal interna) = 1,9cm, DICE (distância intercantal externa)=6,3cm; fissura unilateral transforame direita; microcefalia; hipotelorismo ocular; ponte supra orbitária rasas; agenesia do septo nasal; TC do crânio mostra holoprosencefalia lobar e ADNPM. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XY. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou *[arr 2p21 (45168083-45169270)x1]*. Figura 15.

a



b

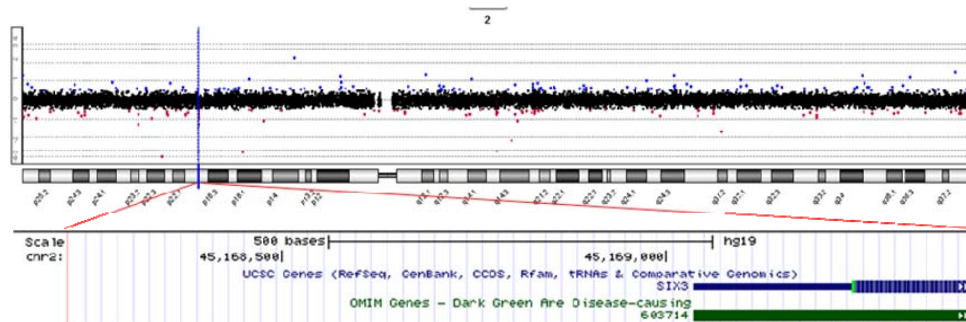


Figura 15: a) aspecto facial do caso 9; b) deleção detectada por *arrayCGH* de 0,012Mb em 2p21.

Caso 10 – O paciente foi avaliado aos três meses de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno, com relato de sangramento durante o primeiro mês da gestação. O histórico pediátrico revelou ser filho de casal não consanguíneo (idade materna 23a e paterna 23a), nascimento à termo, P= 3,119g, A= 47,5cm; choro imediato; suspeita de holoprosencefalia; crânio pequeno; perfil plano e anomalia auricular. Durante a avaliação genética clínica apresentou P= 4,140g, A= 58,3cm e PC= 33; fissura unilateral transforame direita; microcefalia; perfil plano; hipotelorismo ocular; microtia tipo 1 e implantação baixa das orelhas. A mãe apresentou aparente hipotelorismo. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XY. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou *[arr 2p21 (45168083-45169270)x3]*. Figura 16. *ArrayCGH* foi realizado na mãe, não revelando alterações.

a



b

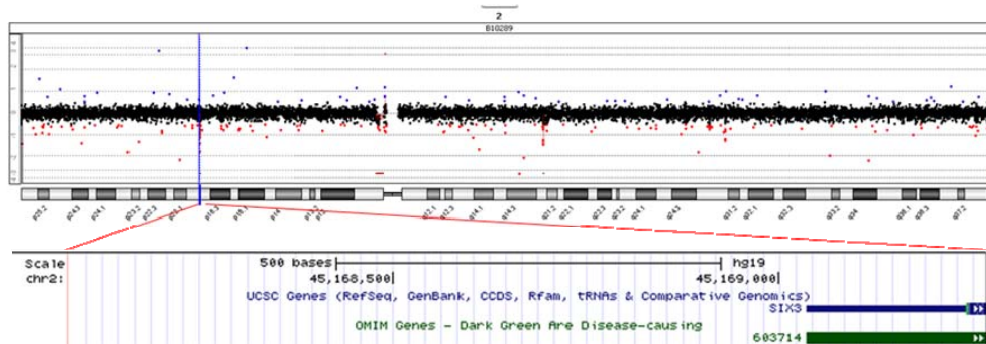


Figura 16: a) aspecto facial do caso 10; b) duplicação detectada por *arrayCGH* de 0,01Mb em 2p21.

Caso 11 – A paciente foi avaliada aos quatro meses de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno, sem intervenções gestacionais, sangramento durante toda a gravidez. O histórico pediátrico revelou ser filho de casal não consanguíneo (idade materna 27a e paterna 20a), nascimento à termo, P= 2,250g, E= 46cm e PC= 30cm; choro imediato; suspeita de holoprosencefalia e anemia. Durante a avaliação genético clínica apresentou fissura pré forame unilateral esquerda completa; microcefalia; hipotelorismo ocular; cílios longos e ânus imperfurado. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XX. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou *[arr 8p23.3 (229644-360626)x1]*.

Figura 17.

a



b

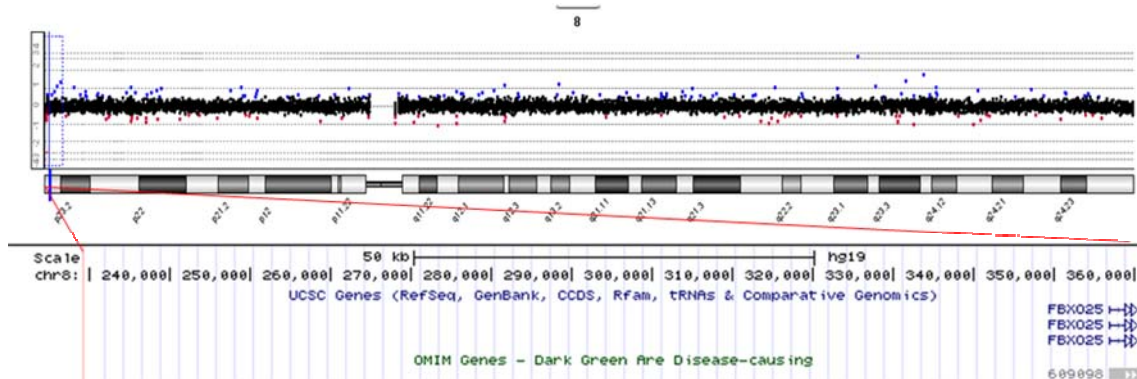


Figura 17: a) aspecto facial do caso 11; b) deleção detectada por *arrayCGH* de 0,13Mb em 8p23.3.

Caso 12 – O paciente foi avaliado aos três meses de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram pré-natal materno apresentando oligodrâmnio no final da gestação, sem intervenções gestacionais. Mãe negou uso de álcool, cigarro e medicamentos durante a gravidez. O histórico pediátrico revelou ser filho de casal não consanguíneo (idade materna 29a e paterna 34a), nascimento com 34 semanas, PN=1,339g, EN= 39cm, PC=27cm; choro imediato; dificuldade para alimentação e internação logo após o nascimento. Durante a avaliação genética clínica apresentou P= 4,250g, A= 58,5cm e PC= 38,5; fissura transforame bilateral; fendas palpebrais obliquas para cima; epicanto inverso e olhos pequenos. A análise citogenética revelou cariótipo 46,XY. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou [*arr 10p15.3-p14 (2844518-8445789)x1*]. Figura 18.

a



b

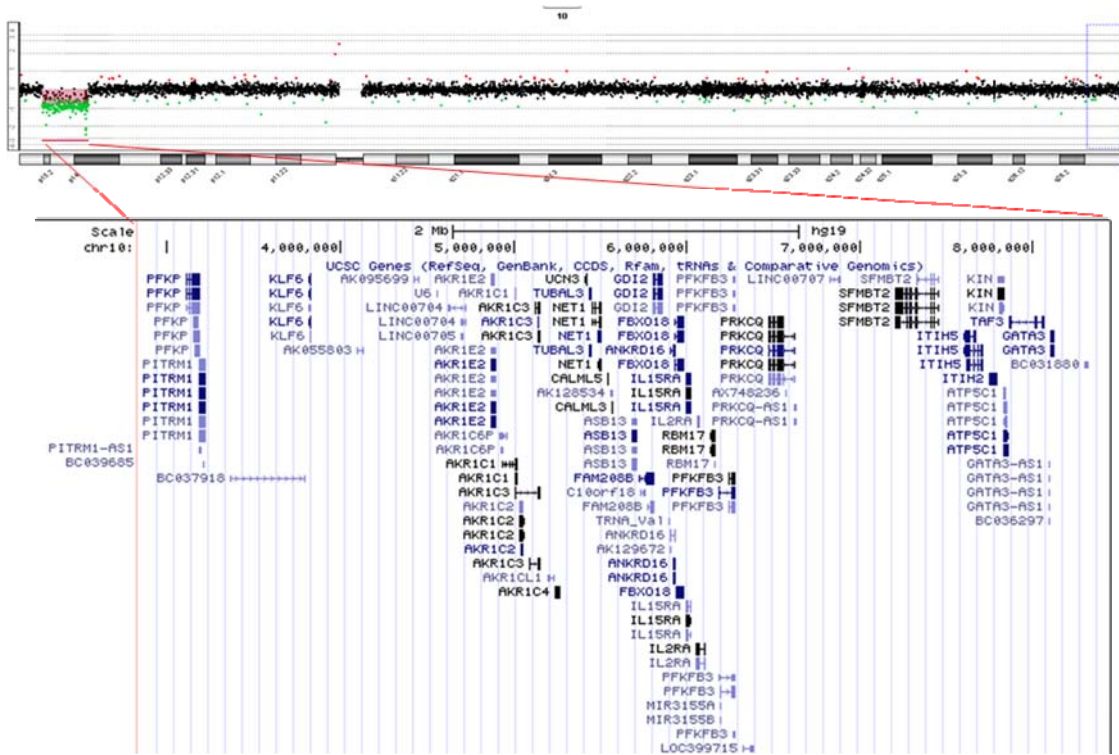


Figura 18: a) aspecto facial do caso 12; b) deleção detectada por *arrayCGH* de 5,6Mb em 10p15.3.

Caso 13 – A paciente foi avaliada aos cinco meses de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno e hipertensão. A avaliação genético clínica foi realizada durante a internação na UTI e revelou fissura de lábio mediana; microcefalia; hipotelorismo ocular; olhos proeminentes; base e ponte nasal baixa; hipoplasia acentuada de pré maxila, ADNPM e crises convulsivas. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou [*arr 13q14.2 (49050517-49065273)x3*]. Figura 19.

a



b

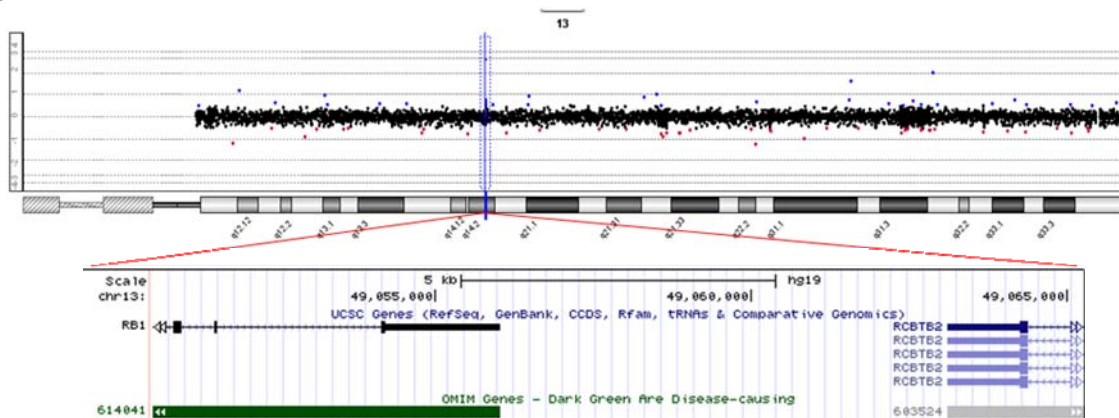


Figura 19: a) aspecto facial do caso 13; b) deleção detectada por *arrayCGH* de 0,014Mb em 13q14.2.

Caso 14 – O paciente foi avaliado com um ano de idade pelo geneticista clínico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Os dados gestacionais informaram acompanhamento pré-natal materno, nascimento a termo, PN=3,430g, EN= 51cm e sem intercorrências gestacionais. O histórico pediátrico revelou ser filho de casal não consanguíneo (idade materna 17a e paterna 20a), mãe relata que houve ausência de choro ao nascimento, hipoxia neonatal e crises convulsivas no primeiro mês de vida. Durante a avaliação genético clínica seus dados antropométricos foram, P= 8,500g, A= 75cm; dolicocefalia; microcefalia; anomalias no SNC como: hipoplasia do VII nervo craniano, III par craniano não visualizado, fusão dos tálamos na linha média e malformação dos hemisférios cerebrais; mímica facial reduzida; estrabismo divergente; narinas antivertidas; “abertura” do palato mole devido teratomas faríngeos; baixa implantação das orelhas; hélices simplificadas e malformadas; anti hélice anômalas; disfagia; punhos cerrados; hitonia e ADNMP. A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou cariótipo 46,XY. A avaliação molecular por *arrayCGH* revelou [*arr Xq13.3 (74463936-74647795)x2*]. Figura 20.

a



b

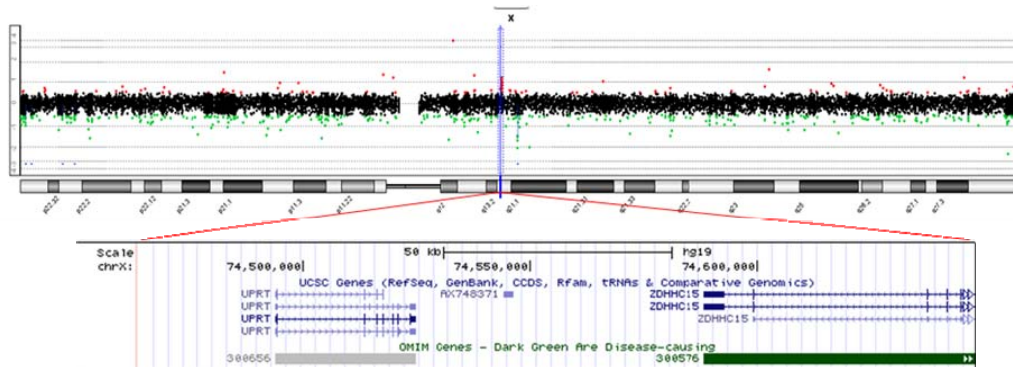


Figura 20: a) aspecto facial do caso 14; b) deleção detectada por *arrayCGH* de 0,18Mb em Xq13.3.

APEÊNDICES B, C e D

Artigos enviados para publicação

APÊNDICE B - Cleft lip/palate, short stature, and developmental delay in a boy with 5,6 Mb interstitial deletion involving 10p15.3-p14.

**Molecular
Syndromology**

Case Report

Mol Syndromol
DOI: 10.1159/000371404

Accepted: August 12, 2014
by M. Schmid
Published online: ■■■

**Cleft Lip/Palate, Short Stature, and
Developmental Delay in a Boy with a 5.6-Mb
Interstitial Deletion Involving 10p15.3p14**

Bruno F. Gamba^a Carla Rosenberg^b Silvia Costa^b Antonio Richieri-Costa^c
Lucilene A. Ribeiro-Bicudo^{a,d}

Departments of ^aGenetics and ^bGenetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences and ^cSyndromology
Division, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies (HRAC), University of São Paulo, São Paulo, and
^dDepartment of Genetics, Institute of Biosciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

© S. Karger AG, Basel
**PROOF Copy
for personal
use only**
ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

ABSTRACT

The chromosome interval 10p15.3-p14 harbors around a dozen genes. To date, this region has been implicated in a few well known human phenotypes, namely HDR syndrome (hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysplasia) and DGS2 (DiGeorge syndrome 2), but a number of variable phenotypes have been also reported. Cleft lip/palate seems to be a very unusual finding within the clinical spectrum of patients with this deletion. Here we report a male child born with short stature, cleft lip/palate, and feeding problems who was found to have a 5.6 Mb deletion on 10p15.3-p14. Clinical and molecular aspects are presented.

Key words: cleft lip/palate, 10p15 deletion, array-CGH, DiGeorge-like phenotype

1. Introduction

Patients with 10p15.3-p14 deletions can present with clinical findings including hypoparathyroidism, heart defects, immunodeficiency, deafness, renal malformations, neurocognitive alterations, motor delay, hypotonia, seizures, and craniofacial dysmorphism, among other less frequent findings [Verri et al., 2004; Lindstrand et al., 2010; DeScipio et al., 2012]. Usually more distal deletions are associated with HDR syndrome (hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysplasia), while more proximal deletions are associated with the DiGeorge-like phenotype [Lichtner et al., 2000; Van Esch et al., 2000; Melis et al., 2012] however, none of these phenotypes is associated with having cleft lip/palate in the clinical spectrum. Among facial findings, cleft lip/palate has seldom been reported. Here we describe a male patient presenting with bilateral cleft lip/palate, delayed psychomotor development, and feeding problems, who was found to have a deletion involving 10p15.3-p14 without the classical findings of either the DGS2 or HDR syndromes.

2. Materials and Methods

2.1. Case Report

A boy (Fig. 1A-B) was referred to the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, USP at the age of 3 months for assessment and management of cleft lip/palate. He was the first child of a normal and unrelated couple. Pregnancy was unremarkable with no exposure to known teratogens. There was no relevant family history. Delivery was at 34 weeks of gestation, by cesarean section; birth weight was 1400 g (<3rd centile) length was 39 cm (<3rd centile), and OFC was 27 cm (<3rd centile). He cried immediately at birth, Apgar scores at the 1st and 5th minutes were 8 and 9, respectively, and bilateral cleft lip/palate was noticed. Neonatal heel prick sample test results were unremarkable. He remained at the hospital due to feeding problems during the first month of life. Since the age of 3 months he has been fed through a nasogastric feeding tube, but with no satisfactory weight gain. Examination at age 8 months showed that his weight was 4250 g (<3rd centile), his length was 58.5 cm (<3rd centile), and his OFC was 38.5 cm (<3rd centile). Neuropsychological development was delayed; he had normal cervical control and was able to roll over, but he could not sit without support. Further examination showed mild prominence of the metopic suture, telecanthus,

upper slanted palpebral fissures, epicanthus inversus, a broad and low nasal root, and bilateral cleft lip/palate (Figure 1). Upper and lower limbs, the spine, and cardiovascular system were normal. Results of blood laboratory tests were normal. BERA test was recently performed and turned out as normal. Kidney ultrasound was performed at age 12 months and did not show any anomalies.



Figure 1. Facial aspect of the patient.

2.2. Cytogenetics

Chromosomal analyses were performed on peripheral blood using conventional GTG-banding techniques at the 550 band level.

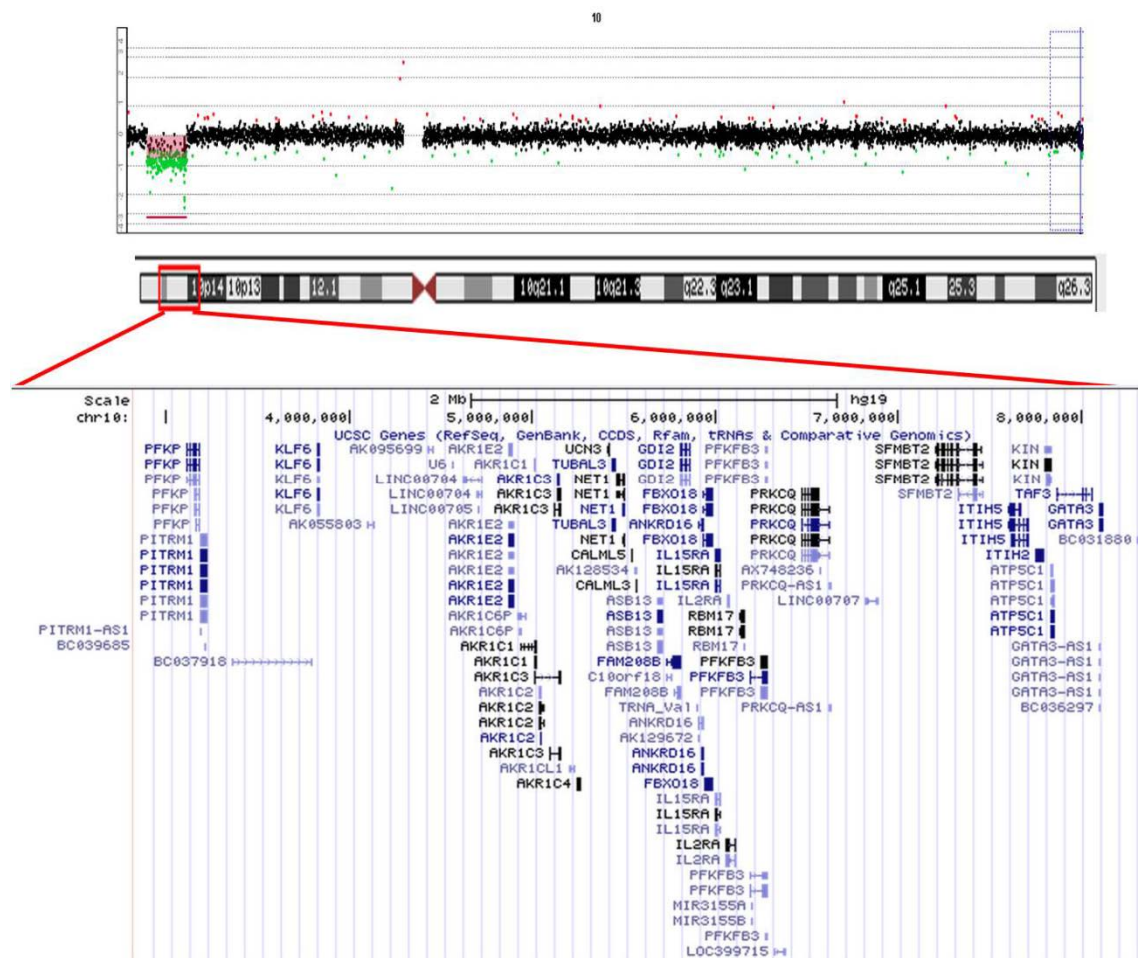
2.3. Array-comparative genomic hybridization

Array-comparative genomic hybridization (array-CGH) using the whole genome Cytosure™, ISCA V2 array 4X180K (Oxford Gene Technology, OGT, UK) was performed according to the manufacturer's instructions. Scanned images of the arrays were processed and analyzed using Feature Extraction software and Genomic Workbench software (both from Agilent Technologies), with the statistical algorithm ADM-2, and a sensitivity threshold of 6.0. We applied a 'loop design' in our hybridizations as previously described [Allemeersch

et al., 2009], resulting in two reverse labeling hybridizations per sample. To be recognized by the software, alterations had to encompass at least three consecutive probes with aberrant log₂ values, and those not detected in both dye-swap experiments of the same sample were excluded from the analysis.

3. Results

Conventional cytogenetic analysis revealed a 46, XY normal karyotype for both the patient and father. The mother presented a 46, XX normal karyotype. Array-CGH results of the patient revealed a 5.6Mb interstitial deletion at 10p15.3-p14, spanning from position 2,834,518pb to 8,485,795pb (HG19) and encompassing several genes (Fig. 2). Array-CGH from parents was normal indicating that it is a *de novo* deletion.



Figure

2. Array-CGH profile of the 5,6Mb interstitial deletion on the short arm of chromosome 10.

4. Discussion

Chromosome 10p deletions have been described in approximately 60 patients with two main phenotypes: the HDR and DG2 syndromes [Lindstrand et al., 2010]. The first condition is associated with haploinsufficiency of the *GATA3* gene [Van Esch et al., 2000], and the latter with partial monosomy 10p within the DGS2 region [Monaco et al., 1991; Melis et al., 2012] phenotypic heterogeneity has also been noted in several instances, however [Tremblay et al., 2011; DeScipio et al., 2012].

In the present report, array CGH analysis revealed a 5.6Mb deletion at 10p15.3-p14 encompassing several genes, including *GATA3*. (Table 1).

Table 1: Genes contained in 10p15.3-p14 deletion.

| Genes¹ | Gene function |
|--------------------------|--|
| PFKP | Phosphofructokinase, key regulatory enzyme in glycolysis |
| KLF6 | Kruppel-like factor 6, transcription factor, tumor suppressor |
| AKR1 | This gene encodes a member of the aldo/keto reductase superfamily, which consists of more than 40 known enzymes and proteins. These enzymes catalyze the conversion of aldehydes and ketones to their corresponding alcohols by utilizing NADH and/or NADPH as cofactors. |
| CALML5 and CALML3 | Calcium binding proteins (calmodulin family) |
| UNC3 | Urocortin 3, endogenous ligand for corticotropin-releasing factor type 3 receptor |
| ASB13 | Ankyrin repeat and SOCS box-containing 13 |
| GDI2 | GDP dissociation inhibitor 2 |
| FBXO18 | F-box protein family. The F-box proteins constitute one of the four subunits of ubiquitin protein ligase complex called SCFs which function in phosphorylation-dependent ubiquitination. |
| IL15RA | Interleukin 15 receptor alpha, cytokine receptor. Enhances cell proliferation and expression of apoptosis inhibitor BCL2L1/BCL2-XL |
| IL2R | Interleukin receptor 2, T-cell growth factor receptor; confers lower immune responsiveness and predisposes to type 1 diabetes |
| RBM17 | The encoded protein is part of the spliceosome complex and functions in the second catalytic step of mRNA splicing. |
| PFKFB3 | Synthesis and degradation of fructose 2,6-bisphosphate |
| PRKCQ | Protein kinase C (PKC) is a family of serine- and threonine-specific protein kinases. Each member of the PKC family has a specific expression profile and is believed to play a distinct role. |
| SFMBT2 | Transcriptional repressor of HOXB13 gene. HOXB13 is a transcription factor that belongs to the homeobox gene family. Genes of this family are highly conserved among vertebrates and essential for vertebrate embryonic development. |
| ITIH5; ITIH2 | The inter-alpha-trypsin inhibitors (ITI) are a family of structurally related plasma serine protease inhibitors involved in extracellular matrix stabilization and in prevention of tumor metastasis |
| ATP5C1 | Participates in the cellular response to DNA damage |
| TAF3 | TAFs contribute to promoter recognition and selectivity and act as antiapoptotic factors and TAF3 can interact with several other transcription factors to control gene expression |
| GATA3 | This gene encodes a protein which belongs to the GATA family of transcription factors and is an important regulator of T-cell development and plays an important role in endothelial cell biology. Defects in this gene are the cause of hypoparathyroidism with sensorineural deafness and renal dysplasia. |

Patients with *GATA3* haploinsufficiency usually present with hypoparathyroidism, heart defects, deafness, and renal malformations, while patients with partial monosomy 10p within the DGS2 region present with hypocalcemia, cardiovascular malformations, immunodeficiency, and facial dysmorphism, symptoms which are similar to those found in patients presenting with 22q11.2 microdeletions. Our patient did not present with the usual findings of these conditions, although he did show growth retardation and developmental delay, which have both been reported in patients with 10p15 deletions [Grunnarsson et al., 2009; Christopoulou et al., 2012].

Haploinsufficiency in three other genes (*UNC3*, *IL15RA*, *ATP5C1*) due to the deletion may contribute to these clinical manifestations. The urocortin 3 gene, the endogenous ligand for corticotropin-releasing factor type 3 receptor (*UNC3*), is expressed in many tissues of the brain, including the hypothalamus, and is associated with mental retardation [Lindstrand et al., 2010]. The interleukin gene family (*IL15RA*) exhibits neurological functions and is associated with synaptic transmission in the CNS, suggesting involvement during embryogenesis [Kurowska et al., 2002]. The aldo-keto reductase family 1, member C2 gene (*AKRIC2*) is related to 46XY sex reversal and obesity, hyperphagia, and developmental delay; however, its effective function during development is poorly known.

Poor weight gain and feeding difficulties have been reported in patients with 10p deletions and, similarly to the patient reported here, one patient was reported showing no signs of hearing loss, renal dysplasia, or hypoparathyroidism [Lindstrand et al., 2010]. Cleft lip/palate was reported in two patients who had an involvement of chromosome 10p [Gottlieb et al., 1998; Lindstrand et al., 2010] however, the phenotype observed in the patient reported here is different from those previously reported in patients with 10p deletions.

Comparing the phenotype of our patient with the literature, he does not seem to present any typical signs of the HDR and/or DG2 syndromes, besides the developmental delay. The HDR syndrome is an autosomal-dominant disorder and all affected patients have hearing loss, while the other two traits are more variable.

In summary, our patient presented with growth retardation, developmental delay, and cleft lip and palate which have been seldom reported in patients with 10p15 deletions. Despite this uncommon phenotype-to-genotype correlation, further investigation should be performed in order to clarify the role of the genes involved in relation to the phenotype presented by this patient.

Acknowledgments

We thank patient and mother for their collaboration. Genetics analysis was supported by grants from Fapesp (2010/18740-2 and 2011/07012-9).

References

- Allemeersch J, Vooren SV, Hannes F, De Moor B, Vermeesch JR, Moreau Y: An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. *BMC Bioinformatics* 10: 380. (2009).
- Christopoulou G, Tzetis M, Konstantinidou AE, Tsezou A, Kanavakis E, et al: Clinical and molecular description of a fetus in prenatal diagnosis with a rare de novo ring 10 and deletions of 12.59 Mb in 10p15.3p14 and 4.22 Mb in 10q26.3. *Europ J Med Genet* 55: 75-79 (2012).

- DeScipio C, Conlin L, Rosenfeld J, Tepperberg J, Pasion R, et al: Subtelomeric deletion of chromosome 10p15.3: Clinical findings and molecular cytogenetic characterization. *Am J Med Genet* 158A: 2152–2161 (2012).
- Gottlieb S, Driscoll DA, Punnett HH, Sellinger B, Emanuel BS, Budarf ML: Characterization of 10p deletions suggests two nonoverlapping regions contribute to the DiGeorge syndrome phenotype. *Am J Hum* 62: 495-498 (1998).
- Gunnarsson C, Graffmann B, Jonasson J: Chromosome r(10)(p15.3q26.12) in a newborn child: case report. *Mol Cytogenet*: 2: 25 (2009).
- Kurowska M, Rudnicka W, Maslinska D, Maśliński W: Expression of IL-15 and IL-15 receptor isoforms in select structures of human fetal brain. *Ann N Y Acad Sci*: 21 221-229 (2002).
- Lichtner P, König R, Hasegawa T, Van Esch H, Meitinger T, et al: An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet* 37: 33-37 (2000).
- Lindstrand A, Malmgren H, Verri A, Benetti E, Eriksson M, et al: Molecular and clinical characterization of patients with overlapping 10p deletions. *Am J Med Genet* 152A: 1233–1243 (2010).
- Melis D, Genesisio R, Boemio, Del Giudice E, Cappuccio G, et al: Clinical description of a patient carrying the smallest reported deletion involving 10p14 region. *Am J Med Genet* 158A: 832–835 (2012).
- Monaco G, Pignata C, Rossi E, Mascellaro O, Coccozza S, et al: DiGeorge anomaly associated with 10p deletion. *Am J Med Genet* 39: 215-216 (1991).

- Tremblay N, Yang SW, Hitz MP, Asselin G, Ginns J, et al: Familial ventricular aneurysms and septal defects map to chromosome 10p15. *Eur Heart J* 32: 568-573 (2011).
- Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, et al: GATA3 haploinsufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 406: 419–422 (2000).
- Verri A, Maraschio P, Devriendt K, Uggetti C, Spadoni E, et al: Chromosome 10p deletion in a patient with hypoparathyroidism, severe mental retardation, autism and basal ganglia calcifications. *Ann Genet* 47: 281–287 (2004).

APÊNDICE C - Microrearrangements in individuals within the holoprosencephaly spectrum

Artigo enviado para publicação em Janeiro de 2015 no periódico *American Journal of Medical Genetics*

American Journal of Medical Genetics: Part A



Microrearrangements in patients within the holoprosencephaly spectrum

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>American Journal of Medical Genetics: Part A</i> |
| Manuscript ID: | Draft |
| Wiley - Manuscript type: | Research Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Ribeiro-Bicudo, Lucilene; Federal University of Goias, Institute of Bioscience, Genetic Richieri-Costa, Antonio; Universidade de Sao Paulo - HRAC, Department of Clinical Genetics Gamba, Bruno; Sao Paulo State University, Institute of Bioscience, Genetic da Rocha, Ana Lais; Sao Paulo University, Genetic do Ó, Vivian; Sao Paulo University, Genetic Gaspar, Ana Luisa; Sao Paulo University, Genetic Queizi, Rodrigo; Universidade de Sao Paulo - HRAC, Clinical Genetics Rosenberg, Carla; Sao Paulo University, Genetics and Evolutionary Biology Costa, Silvia; Sao Paulo University, Genetics and Evolutionary Biology Krepischi, Ana; A.C Camarqo Hospital, David, Veronique; University of Rennes, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire |
| Keywords: | arrayCGH, Holoprosencephaly,, MLPA, Microrearrangement |
| Search Terms: | |

SCHOLARONE™
Manuscripts

Microrearrangements in patients within the holoprosencephaly spectrum

Bruno Faulin Gamba¹, Antonio Richieri-Costa², Vivian Tragante do Ó², Ana Luisa Camolesi Gaspar², Carla Rosenberg³, Silva Costa³, Rodrigo Gonçalves Queizi², Ana C V Krepischi Santos³, Ana Lais Bignotto da Rocha², Veronique David⁴, Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo^{1,5}

¹Institute of Biosciences, Department of Genetics, University of São Paulo State (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

²Syndromology Division, Hospital of Rehabilitation of Craniofacial Anomalies (HRAC), University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

³Human Genome Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

⁴Institut Génétique et Développement, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Université de Rennes, Rennes, France

⁵Institute of Biosciences, Department of Genetics, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

Correspondence to: Lucilene A. Ribeiro-Bicudo, Federal University of Goiás, Goiânia, GO. Caixa postal 131, CEP: 740001-970 - Brazil. Fax number: + 55 62 35217818, e-mail: arilho@yahoo.com

ABSTRACT

Holoprosencephaly (HPE) is a malformation sequence in which the cerebral hemispheres fail to separate into distinct left and right halves, resulting in midline structural anomalies of the central nervous system and face. Here, we report the clinical and DNA copy number variation (CNV) data of eight HPE spectrum patients with a negative screen for mutations in the HPE determinant genes *SHH*, *ZIC2*, *GLI2*, *SIX3*, *TGIF*, and *PTCH*. CNVs were determined using two different techniques—multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and array comparative genomic hybridization (CGH). MLPA analysis showed deletions in four patients and duplication in one patient involving *SHH*, *TGIF*, and *ZIC2*. Array CGH analysis showed alterations in three additional patients, duplications at 13q14 and 2p21, and a deletion at 8p23. As HPE patients are surviving longer and mildly affected patients are reproducing, an effort to search for CNVs is a valuable approach for genetic counseling when analyses for mutations in the known HPE genes are negative.

Keywords: arrayCGH, Holoprosencephaly, MLPA and Microrearrangement

INTRODUCTION

Holoprosencephaly (HPE), a common developmental defect that affects the forebrain and the face, has a high mortality rate, with only a minority of patients surviving beyond one year [Ribeiro et al., 2006; Kauvar and Muenke, 2010]. HPE is clinically and etiologically heterogeneous, with both genetic and environmental factors responsible for causation [Cohen,

1989]. Classic HPE has a live birth incidence of 1:10,000 but a fetal incidence of 1:250, as most conceptuses do not survive to term [Matsunaga and Shiota, 1977; Orioli and Castilla, 2010]. Due to recent advances in neuroimaging and the growing number of candidate genes described [Bendavid et al., 2007], mildly affected children who were previously undiagnosed are now being identified, leading to an increased prevalence rate of the disease [Hahn and Plawner, 2004]. Chromosomal abnormalities, which make up the largest portion of HPE cases (45%), can be diagnosed with peripheral blood karyotype [Kauvar and Muenke, 2010; Solomon et al., 2010]. Another 15% of HPE cases have been found to be environmentally related (maternal diabetes during early pregnancy) or seen in multiple malformation syndromes, including Smith–Lemli–Opitz, Rubinstein–Taybi, and pseudotrisonomy 13. The remaining 40% of HPE cases are nonsyndromic or isolated, with mutations in *SHH*, *SIX3*, *ZIC2*, and *TGIF* identified in 25% of nonsyndromic HPE. Numerous different heterozygous mutations have been identified in HPE patients, including missense, nonsense, deletion, and frameshift mutations located throughout the gene [Cohen, 2006]. In addition, in a recent study of over 200 patients with isolated HPE, 22% were found to have copy number variations (CNVs) [Mercier et al., 2011]. However, the etiology of the majority of isolated HPE cases have yet to be determined [Bendavid et al., 2007].

Here, we describe and discuss the clinical and molecular findings of three patients presenting with duplications and deletions identified through array comparative genomic hybridization (CGH) analysis: one duplication in a critical region harboring the *SIX3* gene (2p21), another in a new region not previously associated with HPE (13q14), and a microdeletion at 8p23. These microrearrangements proved to be a valuable tool in the diagnosis and management of patients with HPE, and indicate new loci implicated in the disorder.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

The subjects included in this study were recruited from a sample of 82 patients within the HPE spectrum at the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRAC-USP-Bauru/SP), Brazil, who were previously screened for mutations in the common HPE genes (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*, *GLI2*, and *PTCH1*). Of the 82 patients, 40 presented with frank HPE phenotype and 42 presented with microforms of HPE. Normal con-

control DNA for MLPA experiments included ten DNA samples from healthy volunteers. This study was approved by the institutional review board of HRAC-USP-Bauru/SP, and written informed consent was obtained from the participants or their parents.

Genetic Analysis

Multiplex Ligation Probe Dependent Amplification (MLPA)

The MLPA technique was performed according to the original protocol described by Schouten et al., [2002]. We analyzed 82 samples of DNA using a SALSA MLPA KIT P187 Holoprosencephaly Version 03 and a P036 Human-telomere-3 (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands). We used MLPA DNA detection, and quantification was performed according to the MRC-Holland protocol (www.mlpa.com).

Array Comparative Human Genome (array CGH)

We selected 24 patients with the frank HPE phenotype and investigated for CNVs using the array CGH platform CytoSureTM, ISCA V2 array 4X180K (Oxford Gene Technology, Oxford, UK) containing ~180,000 oligonucleotides. Briefly, samples were labeled with Cy3- and Cy5-dCTPs with a CytoSure Genomic DNA Labelling Kit and hybridized with an Agilent Oligo a-CGH Hybridization Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Scanned images of the arrays were processed and analyzed with Feature Extraction and Genomic Workbench software (both from Agilent Technologies), using the statistical algorithm ADM-2 and a sensitivity threshold of 6.0. We used two reverse-labeled hybridizations for each sample. Gains or losses in copy number were accepted when the log₂ ratio of the Cy3/Cy5 intensities of a given genomic segment was >0.6 or <-0.8, respectively, and when putative alterations encompassed at least three consecutive probes; any alterations not detected in both dye-swap experiments were disregarded. All detected imbalances were compared to CNVs reported in the Database of Genomic Variants (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/> - freeze of March 2011) and to data from our own group.

Multiplex PCR Liquid Chromatography (MPLC)

MPLC was used in this study to validate deletions/duplications identified by array CGH <1Mb. MPLC is a semi-quantitative PCR of 23 cycles, based on the co-amplification of smaller 300 bp fragments of the gene of interest and another reference gene. The gene used in

this study as a reference was *PBGD*, located on chromosome 11. Two genes were evaluated: *SIX3* at the 2p21 region and *RBI* at the 13q14.2 region. Table I shows the primer sequences of both genes. In conducting high-performance liquid chromatography analysis, a fluorochrome (SYBR Green) was used as an intercalation dye to quantify the amplified DNA at the column output. The resulting peaks of the amplicons were compared and used to determine deletions and duplications.

Table I. Sequence primers of gene evaluation

| Primer | sequence | Amplicon size (bp) |
|--------|-------------------------------|--------------------|
| RB1F | 5' cctccttaatttggaaggtt 3' | 151 |
| RB1R | 5' tggactagaaataatgtgctttg 3' | |
| SIX3F | 5' caagccacaacgacag 3' | 114 |
| SIX3R | 5' aatcgccctaatgacaacagc 3' | |

(bp)= base pairs

RESULTS

The patients analyzed were 82 probands with the HPE phenotype - 40 patients presented the classical HPE phenotype and 42 presented a microform of HPE. The sex ratio was 1:1.4 females.

MLPA

The MLPA technique was performed in all 82 patients within the HPE spectrum, and anomalies were found in five cases. These aberrations included four deletions and one duplication in genes already known to be related to HPE, as shown in Table II. Three other patients were found by MLPA to have CNVs, but those results were not confirmed with quantitative PCR and were considered false positives.

Table II. Alterations identified by MLPA analysis in patients exhibiting HPE phenotype

| Patient | Rearrangement | Gene | HPE Phenotype |
|---------|---------------|-------------|---------------|
| 1 | del 7q | <i>SHH</i> | Semilobar |
| 2 | del 7q | <i>SHH</i> | Lobar |
| 3 | del 7q | <i>SHH</i> | Semilobar |
| 4 | del 18p | <i>TGIF</i> | Alobar |
| 5 | dup 13q | <i>ZIC2</i> | Lobar |

Array CGH

Twenty-four cases were selected for presenting a more severe phenotype. Three of 24 (12.5%) cases analyzed presented small deletions/duplications (Table III). The facial features of the patients can be observed in Fig. 1.

Table III. Summary of array CGH analysis by 4 x180K (OGT) showing localization and size of the rearrangements

| Patients | Rearrangements | Size (bp) | Location (Hg19) (bp) | HPE Phenotype |
|----------|----------------|-----------|-------------------------|---------------|
| 06 | dup 2p21 | 1187 | chr2:45168083-45169270 | Lobar |
| 07 | Del 8p23.3 | 130982 | chr8:229644-360626 | Lobar |
| 08 | Dup13q14.2 | 14756 | chr13:49050517-49065273 | Alobar |

(pb)= base pairs

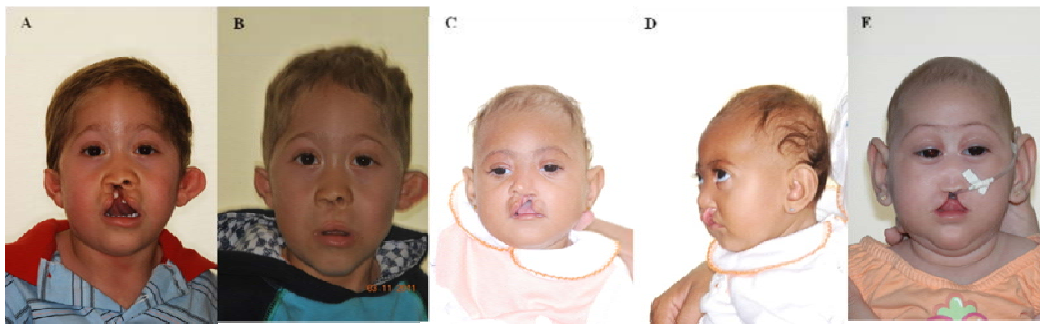


FIG. 1. Facial aspects of patients with CNV by array CGH. a and b): patient 6 before and after surgical correction, respectively; c and d): patient 7; e) patient 8

Patient 6 is a boy who had a 1kb duplication at the 2p21 region, which affects the promotor region of the *SIX3* gene (Fig. 2). The patient presented with microcephaly, hypotelorism, prominent eyes, flat nasal bridge and malar region, cleft lip/palate on the right partially involving the premaxilla, and bilateral low-set and small ears. On the right ear, the helix, tragus, and lobule were hypoplastic, the antihelix was prominent, and the ear concha was small. The left the ear was markedly prominent, showing a hypoplastic helix, prominent antihelix, and small lobule and concha. Development was considered adequate for his age. Re-evaluation at three years of age revealed that the patient had acquired head control at eight months, sat without support at 15 months, and walked with support at 18 months. He understands simple orders but displays no language acquisition to date. Cardiac ultrasonography showed atrial and ventricular septal defects that were surgically corrected at seven months. A magnetic resonance imaging (MRI) evaluation of the central nervous system indicated lobar

HPE. The cleft lip/palate was surgically corrected at three and one-half years (Figs. 1A and B).

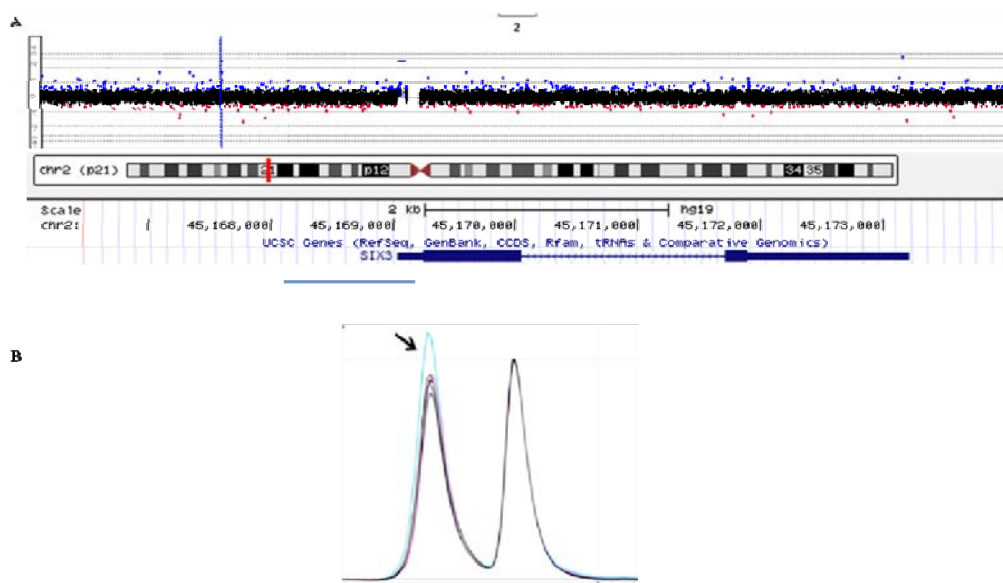


FIG. 2. A: array CGH result showing 2q21 duplication ~1Kb with partial duplication in the *SIX3* gene (based on UCSC Genome Bioinformatics, Hg19, <http://genome.ucsc.edu>), the blue line shows partial duplication of the *SIX3* gene. B: MPLC analysis. The first peak is the *SIX3* gene and the second peak is the reference gene (*PBGDI*). The blue line shows partial duplication of the *SIX3* gene in patient 6.

We found a 130Kb deletion at 8p23 (Fig. 3) in patient 7, who presented with lobar HPE phenotype. A cleft lip/palate and imperforate anus were noticed in this patient at birth. She presented with microcephaly, sloping forehead, long eyelashes, flat nasal bridge, cleft lip/palate on the left side partially involving the premaxilla, and large ears (Figs. 1C and D).

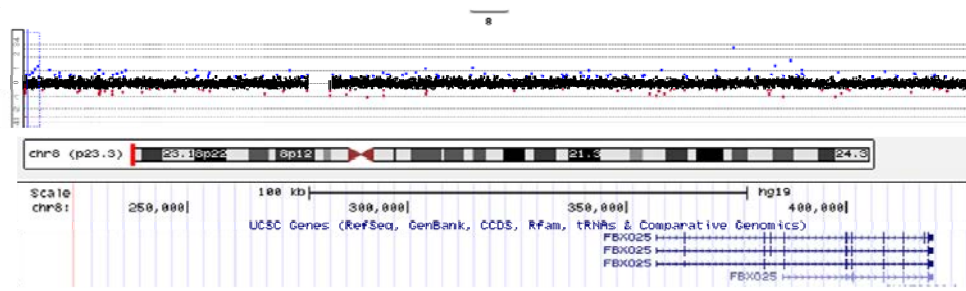


FIG. 3. Array CGH result showing 8p23.3 deletion ~130Kb (red line) with partial deletion in the *FBX025* gene (based on UCSC Genome Bioinformatics, Hg19, <http://genome.ucsc.edu>) in patient 7.

A 14Kb duplication at 13q14 (Fig. 4) was found in patient 8, a female who presented with severe microcephaly, large ears, shallow supraorbital ridges, hypotelorism, upslanted palpebral fissures, proptosis, hypoplastic nasal septum, midline clefting, absent premaxilla, and delayed neuropsychomotor development (Fig. 1E). In the seventh month of gestation, HPE was detected by ultrasound. After birth, MRI showed alobar HPE.

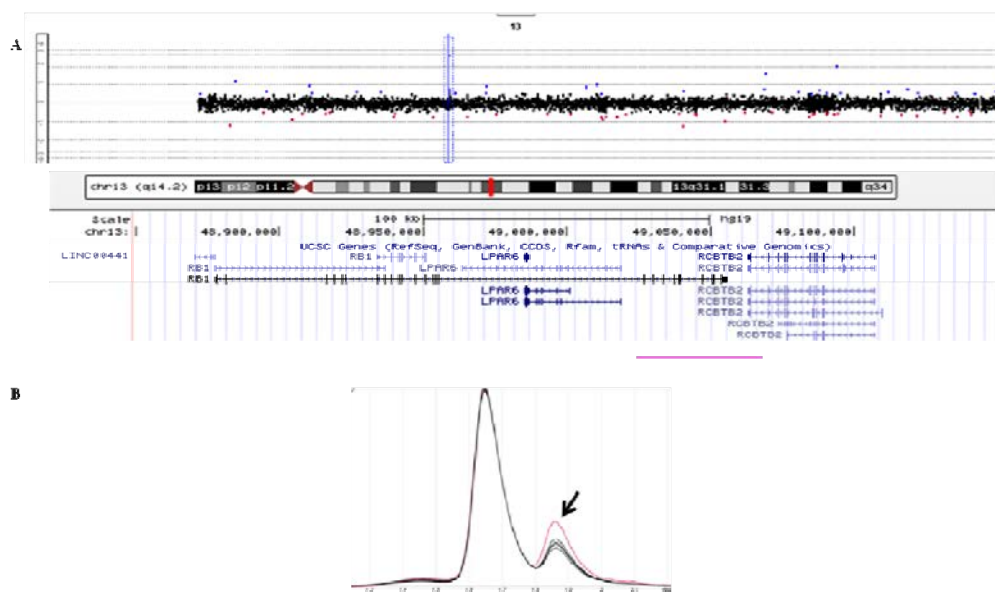


FIG. 4. A: array CGH result showing 13q14.2 duplication ~14Kb with partial duplication in the *RBI* gene (based on UCSC Genome Bioinformatics, Hg19, <http://genome.ucsc.edu>), the pink line shows partial duplication of the *RBI* gene. B: MPLC analysis. The first peak is the reference gene (*PBGDI*) and the second peak is the *RBI* gene. The pink line shows duplication of the *RBI* gene in patient 8.

DISCUSSION

Bendavid et al., [2007] demonstrated that testing for microdeletions is a useful approach for the evaluation of HPE patients. In the present study, MLPA screening based on the P187 and P036 kits evaluated exon copy numbers in the *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF1*, *TRAPPC10*, *GLI2*, *PTCH1*, and *FBXW11* genes. Eight-two HPE DNA samples were screened for CNVs using MLPA; five (3.4%) presented deletions/duplications in three major HPE genes. Given the relatively low cost, simplicity, and availability of commercial kits, our findings support the use of MLPA as a diagnostic tool in HPE.

Unlike MLPA, array CGH can be used for genome-wide analysis for copy number changes, and is a more appropriate tool to identify new gene implicated in the disorders. In

this study, along with MLPA, we used array CGH in the analysis of DNA from patients with a negative result from mutational screening of the major HPE genes. Array CGH is currently considered the main genetic test in cases of idiopathic, non-syndromic developmental delay and intellectual disability [Hochstenbach et al., 2009; D'Amours et al., 2012], in prenatal evaluation of ultrasound abnormalities and balanced translocation diagnosis [Lichtenbelt et al., 2011; Levenson, 2012; Evangelidou et al., 2013], and as preimplantation genetic screening technology [Liang et al., 2013].

A few studies have evaluated chromosomal imbalances using high-resolution oligonucleotide microarrays in patients with HPE [Bendavid et al., 2006; Bendavid et al., 2009; Rosenfeld et al., 2010], and they found a high frequency of CNVs, suggesting the existence of a large number of potential new candidate genes [Mercier et al., 2011]. The majority of cases are microdeletions of different sizes on a multitude of different loci while duplications are less frequent, confirming that despite the prediction that duplications and deletions should occur with equal frequency, deletions appear to be more prevalent than duplications in the human genome [Derwinska et al., 2009; Coppinger et al., 2009]. A few studies documented duplications in HPE-causing genes. Duplications in the *PTCH1* region suggest that gain of function in this gene may result in microcephaly, with or without HPE [Derwinska et al., 2009], whereas duplication at *ZIC2* does not commonly result in brain malformation and overdosage is less detrimental, suggesting that an extra copy of *ZIC2* may be benign [Jobanputra et al., 2012].

Patient 6 is a boy who presented with ~1kb duplication in the 2p21 region that partially overlaps the promotor region of the *SIX3* gene. He had lobar HPE with some additional facial features, including hypotelorism, clefting, and dysmorphic ears, which are unusual findings in patients with *SIX3* mutations and deletions. Results from his parents did not show the duplication. To our knowledge, this is the first report on duplication in 2p21 involving the *SIX3* locus, and there is no other known gene in this 1kb region.

Patient 7 was found to have a 130Kb deletion at 8p23 after presenting with lobar HPE and a large left cleft lip/palate. Results from the parents did not show this deletion. Earlier reports on deletions involving 8p23 found that the patients had mental retardation, cardiac defects, and subtle facial anomalies, suggesting an 8p minus syndrome [Hutchinson et al., 1992; Devriendt et al., 1999]. One report related how the case of a child with a deletion in 8p23 mimicked velocardiofacial syndrome with an atrial septal defect [Devriendt et al.,

1995]. Chromosomal 8p23 deletion syndrome has been described as a malformation syndrome consisting of facial anomalies, microcephaly, mental retardation, and congenital heart defects, with GATA4 gene on 8p23.1 being the gene most likely responsible for cardiac malformations [Pehlivan et al., 1999; Páez et al., 2008; Mei et al., 2014]. Microarray analysis performed on two fetuses with congenital diaphragmatic hernias (CDHs) and heart defects showed a 315Kb deletion that included the GATA4, NEIL2, FDFT1, CTSSB, DEFB136, DEFB135, and DEFB134 genes, suggesting that haploinsufficiency of the two genes in common within 8p23.1, GATA4 and NEIL2, can cause CDH and cardiac defects in humans [Keitges et al., 2013]. In addition to intellectual disability, 8p23.2 deletions have been implicated as part of a critical region for autism and epilepsy [Chien et al., 2010; Nucaro et al., 2011]. A few cases of the Cornelia de Lange phenotype have been associated with 8p23.1 deletions, implicating the CdLS-Tankyrase 1 gene as a novel candidate gene for this condition [Baynam et al., 2008]. To the best of our knowledge, our study is the first report on a large deletion spanning 8p23 associated with lobar HPE.

Patient 8 had a 14kb duplication at 13q14, and she presented with alobar HPE and large ears. The parents could not be genotyped. Reports on partial 13q duplication are unusual, and the phenotypes are heterogeneous. Partial duplication at 13q has been reported in a child with trigonocephaly and synophrys [Hornstein and Soukup, 1981]. Central nervous system anomalies were reported with partial agenesis of the cerebellar vermis and partial agenesis of the corpus callosum in a patient with duplication at 13q (q14-->qter) [Machado et al., 2010] and in a case in which cerebellar hypoplasia was noticed in an ultrasound examination in the 14th week of gestation [Haddad et al., 2012]. Besides brain and craniofacial anomalies, anomalies of other systems were reported in duplication of the 13q distal chromosomal region in a fetus with postaxial polydactyly of the right hand and left foot, short fingers, malrotation of the gut, and micropenis with hypospadias [Haddad et al., 2012].

A mild clinical phenotype consisting of psychomotor retardation, thin lips, and normal facial features was reported in a boy with duplication of 13q32-->qter and a small deletion of 18p11.32-->pter. The absence of the main signs of trisomy 13 was interpreted as restriction of the critical region responsible for this condition, variable expression, gene interactions, or interchromosomal effects [Helali et al., 1996].

It is known that alterations of the most common HPE genes may result in HPE, but there is little information regarding microdeletion/duplication of other, less common HPE

genes. In conclusion, we reported, two new CNVs that point to candidate loci for the syndrome.

Acknowledgments

We thank patient and mother for their collaboration. Genetics analysis was supported by grants from Fapesp (2010/18740-2 and 2011/07012-9).

REFERENCES

Baynam G, Goldblatt J, Walpole I. 2008. Deletion of 8p23.1 with features of Cornelia de Lange syndrome and congenital diaphragmatic hernia and a review of deletions of 8p23.1 to 8pter. A further locus for Cornelia de Lange syndrome? *Am J Med Genet A* 146A:1565-1570.

Bendavid C, Dubourg C, Gicquel I, Pasquier L, Saugier-veber P, Durou MR, Jaillard S, Frebourg T, Haddad BR, Henry C, Odent S, David V. 2006. Molecular evaluation of fetuses with holoprosencephaly shows high incidence of microdeletions in the HPE genes. *Hum Genet* 119:1–8.

Bendavid C, Dubourg C, Pasquier L, Gicquel I, Le Gallou S, Mottier S, Durou MR, Henry C, Odent S, David V. 2007. MLPA screening reveals novel subtelomeric rearrangements in holoprosencephaly. *Hum Mut* 28:1189–1197.

Bendavid C, Rochard L, Dubourg C, Seguin J, Gicquel I, Pasquier L, Vigneron J, Laquerrière A, Marcorelles P, Jeanne-Pasquier C, Rouleau C, Jaillard S, Mosser J, Odent S, David V. 2009. Array-CGH analysis indicates a high prevalence of genomic rearrangements in Holoprosencephaly: An updated map of candidate loci. *Hum Mut* (30)8:1175–1182.

Chien WH, Gau SS, Wu YY, Huang YS, Fang JS, Chen YJ, Soong WT, Chiu YN, Chen CH. 2010. Identification and molecular characterization of two novel chromosomal deletions associated with autism. *Clin Genet* 78:449-456.

Cohen MM Jr. 1989. Perspectives on holoprosencephaly: Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. *Terat* 40:211–235.

Cohen MM, Jr. 2006. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76:658-673.

Coppinger J, McDonald-McGinn D, Zackai E, Shane K, Atkin JF, Asamoah A, Leland R, Weaver DD, Lansky-Shafer S, Schmidt K, Feldman H, Cohen W, Phalin J, Powell B, Ballif BC, Theisen A, Geiger E, Haldeman-Englert C, Shaikh TH, Saitta S, Bejjani BA, Shaffer LG. 2009. Identification of familial and de novo microduplications of 22q11.21-q11.23 distal to the 22q11.21 microdeletion syndrome region. *Hum Mol Genet* 18:1377-1383.

D'Amours G, Kibar Z, Mathonnet G, Fetni R, Tihy F, Désilets V, Nizard S, Michaud JL, Lemyre E. 2012. Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. *Clin Genet* 81:128-141.

Derwińska K, Smyk M, Cooper ML, Bader P, Cheung SW, Stankiewicz P. 2009. PTCH1 duplication in a family with microcephaly and mild developmental delay. *Eur J Hum Genet* 17:267-171.

Devriendt K, De Mars K, De Cock P, Gewillig M, Fryns JP. 1995. Terminal deletion in chromosome region 8p23.1-8pter in a child with features of velo-cardio-facial syndrome. *Ann Genet* 38:228-230.

Devriendt K, Matthijs G, Van Dael R, Gewillig M, Eyskens B, Hjalgrim H, Dolmer B, McGaughran J, Bröndum-Nielsen K, Marynen P, Fryns JP, Vermeesch JR. 1999. Delineation of the critical deletion region for congenital heart defects, on chromosome 8p23.1. *Am J Hum Genet* 64(4):1119-26.

Evangelidou P, Alexandrou A, Moutafi M, Ioannides M, Antoniou P, Koumbaris G, Kallikas I, Velissariou V, Sismani C, Patsalis PC. 2013. Implementation of High Resolution Whole Genome Array CGH in the Prenatal Clinical Setting: Advantages, Challenges, and Review of the Literature. *Biomed Res Int* Article ID 346762.

Haddad V, Aboura A, Tosca L, Guediche N, Mas AE, L'Herminé AC, Druart L, Picone O, Brisset S, Tachdjian G. 2012. Tetrasomy 13q31.1qter due to an inverted duplicated neocentric

marker chromosome in a fetus with multiple malformations. *Am J Med Genet A* 158A:894-900.

Hahn JS, Plawner LL. 2004. Evaluation and management of children with holoprosencephaly. *Pediatr Neurol* 31:79-88

Helali N, Iafolla AK, Kahler SG, Qumsiyeh MB. 1996. A case of duplication of 13q32qter and deletion of 18p1.32pter with mild phenotype: Patau syndrome and duplications of 13q revisited. *J Med Genet* 33:600-602

Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D, Poot M. 2009. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet* 52:161-169.

Hornstein L, Soukup S. 1981. A recognizable phenotype in a child with partial duplication 13q in a family with t(10q;13q). *Clin Genet* 19:81-86.

Hutchinson R, Wilson M, Voullaire L. 1992. Distal 8p deletion (8p23.1--8pter): a common deletion? *J Med Genet* 29:407-411.

Jobanputra V, Burke A, Kwame AY, Shanmugham A, Shirazi M, Brown S, Warburton PE, Levy B, Warburton D. 2012. Duplication of the ZIC2 gene is not associated with holoprosencephaly. *Am J Med Genet A* 158A:103-108.

Kauvar EF, Muenke M. 2010. Holoprosencephaly: recommendations for diagnosis and management. *Curr Opin Pediatr* 22:687-695.

Keitges EA, Pasion R, Burnside RD, Mason C, Gonzalez-Ruiz A, Dunn T, Masiello M, Gebbia JA, Fernandez CO, Risheg H. 2013. Prenatal diagnosis of two fetuses with deletions of 8p23.1, critical region for congenital diaphragmatic hernia and heart defects. *Am J Med Genet A* 161A(7):1755-8.

Levenson D. 2012. Array CGH increasingly used in prenatal and postnatal testing. *Am J Med Genet A* 158A(3):8-9.

Liang L, Wang CT, Sun X, Liu L, Li M, Witz C, Williams D, Griffith J, Skorupski J, Haddad G, Gill J, Wang WH. 2013. Identification of chromosomal errors in human preimplantation embryos with oligonucleotide DNA microarray. *PLoS One* 8(4):e61838.

Lichtenbelt KD, Knoers NV, Schuring-Blom GH. 2011. From karyotyping to array-CGH in prenatal diagnosis. *Cytogenet Genome Res* 135:241-250.

Machado IN, Heinrich JK, Campanhol C, Rodrigues-Peres RM, Oliveira FM, Barini R. 2010. Prenatal diagnosis of a partial trisomy 13q (q14-->qter): phenotype, cytogenetics and molecular characterization by spectral karyotyping and array comparative genomic hybridization. *Genet Mol Res* 9:441-448.

Matsunaga E, Shiota K. 1977. Holoprosencephaly in human embryos: Epidemiologic studies of 150 cases. *Terat* 16:261-272.

Mei M, Yang L, Zhan G, Wang H, Ma D, Zhou W, Huang G. 2014. Analysis of genomic copy number variations in two unrelated neonates with 8p deletion and duplication associated with congenital heart disease. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 52(6):460-3.

Mercier S, Dubourg C, Garcelon N, Campillo-Gimenez B, Gicquel I, Belleguic M, Ratié L, Pasquier L, Loget P, Bendavid C, Jaillard S, Rochard L, Quélin C, Dupé V, David V, Odent S. 2011. New findings for phenotype-genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. *J Med Genet* 48:752-760.

Nucaro A, Pisano T, Chillotti I, Montaldo C, Pruna D. 2011. Chromosome 8p23.2-pter: a critical region for mental retardation, autism and epilepsy? *Clin Genet* 79:394-395.

Orioli IM, Castilla EE. 2010. Epidemiology of holoprosencephaly: Prevalence and risk factors. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 154C:13-21.

Páez MT, Yamamoto T, Hayashi K, Yasuda T, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K, Furutani Y, Asakawa S, Shimizu N, Matsuoka R. 2008. Two patients with atypical interstitial deletions of 8p23.1: mapping of phenotypical traits. *Am J Med Genet A* 146A:1158-1165.

Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slaugh R, Van Rheeden R, Wilson DB, Watson MS, Hing AV. 1999. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet* 19;83(3):201-6.

Ribeiro LA, El-Jaick KB, Muenke M, Richieri-Costa A. 2006. SIX3 mutations with holoprosencephaly. *Am J Med Genet Part A* 140A:2577–2583.

Rosenfeld JA, Ballif BC, Martin DM, Aylsworth AS, Bejjani BA, Torchia BS, Shaffer LG. 2010. Clinical characterization of patients with deletions of genes in holoprosencephaly pathways by aCGH refines the phenotypic spectrum of HPE. *Hum Genet* 127:421-440.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:(12)e57.

Solomon BD, Rosenbaum KN, Meck JM, Muenke M. 2010. Holoprosencephaly due to Numeric Chromosome Abnormalities. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C:146–148.

APÊNDICE D - Chromotripsis with at least 12 breaks at 1p36.33-p35.3 in a Brazilian boy with multiple congenital anomalies

Artigo Submetido para publicação no periódico *Molecular Genetics and Genomics* em Janeiro de 2015.

On Friday, January 16, 2015 6:10 PM, Molecular Genetics and Genomics (MGAG)

<em@editorialmanager.com> wrote:

Dear Mrs Ribeiro-Bicudo,

Your submission entitled "Chromotripsis with at least 12 breaks at 1p36.33-p35.3 in a boy with multiple congenital anomalies" has been received by Molecular Genetics and Genomics

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://mgag.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office
Molecular Genetics and Genomics

Bruno Faulin Gamba^a, Antônio Richieir-Costa^b, Silvia Costa^c, Carla Rosenberg^c, Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo^{a,d}

^aInstitute of Biosciences, Department of Genetics, University of São Paulo State, Botucatu, SP, Brazil.

^bSyndromology Division, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies (HRAC), University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

^cDepartment of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^dInstitute of Biosciences, Department of Genetics, Federal University of Goiás, GO, Brazil.

Corresponding author: Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo. Institute of Biosciences, Department of Genetics, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil Fax number: + 55 62 35217818. e-mail: arilho@yahoo.com

Abstract

Complex chromosome rearrangements are common in cancer and relatively rare constitutively. While their mechanism of origin is still unclear, chromotripsis, a single catastrophic event leading to shattering chromosomes or chromosome regions and rejoining of the segments was described to occur in a fraction of cancers. Recently, constitutive cases have been reported suggesting that chromotripsis would underlie at least part of constitutive complex chromosome rearrangements. We describe a 5-months boy with some clinical features of 1p36 deletion syndrome who presented complex chromosome rearrangements involving 1p36.33 - p35.3 region. The presence of at least 12 clustered breaks at 1p and apparent lack of mosaicism suggests that a single event like chromotripsis should have occurred.

Key Word: Complex chromosomal rearrangement, multiple congenital anomalies, arrayCGH, chromotripsis

Introduction

The 1p36 deletion syndrome is the most common subtelomeric microdeletion syndrome (OMIM 607872) with an incidence of 1 in 5,000 newborn infants (Heilstedt et al, 2003). The monosomy 1p36 is associated with apparently pure/simple terminal deletion (67%), derivative chromosomes (16%), interstitial deletions (10%), and complex rearrangements (7%) (Gajecka et al. 2007). The clinical presentation is variable and includes facial features, gastrointestinal anomalies, seizures, vision and hearing problems, cardiovascular complications as well as cognitive issues (Gajecka et al. 2007; Battaglia et al. 2008). Patients with complex rearrangements involving deletions, duplications, and/or triplications of 1p36 have overlapping variable clinical findings (Gajecka et al. 2005).

Complex chromosome rearrangements (CCRs) were originally defined as constitutional structural chromosomal rearrangements with at least three cytogenetically visible breakpoints and exchange of genetic material between two or more chromosomes (Pai et al. 1980), but

more recently any constitutional structural rearrangements involving three or more chromosomes or more than three breakpoints are referred to as CCRs (Zhang et al. 2009)

A recent discovery was the identification of a chromosomal catastrophic phenomenon in which tens of rearrangements located in a limited region of the genome occurs during a single event called *chromothripsis* (*Chromo* for chromosome and *thripsis* to break into pieces) this phenomenon was found to be relatively common in tumors, accounting for 2 - 3% of all cancer samples and up to 25% of primary bone cancers (Stephan et al. 2011). Although the causes and underlying mechanism of these events still remain unclear, many studies have implicated the DNA repair machinery in these rearrangements and in particular, the nonhomologous end joined (NHEJ) mechanism (Chen et al. 2012; Stephens et al. 2011). However, this model does not fully explain duplications or triplications occurring within the rearranged chromosome. The term *chromoanasythesis* was proposed to illustrate this second mechanism, literally (*chromo* for chromosome and *anasythesis* for reconstitution) (Liu et al. 2011).

As cytogenetic resolution increases by the use of high density arrays and massive parallel sequencing, it becomes more evident that structural rearrangements in patients with abnormal phenotypes are often more complex than first appeared, and recent work show that constitutionally acquired CCRs share similarities with cancer chromothripsis (Kloosterman et al. 2011; Liu et al. 2011; Macera et al. 2014) .

In this study we report on a patient with multiple congenital anomalies who carries a CCR with six genomic imbalances in the 1p36.33 - p35.3 region, exhibiting a minimum of 12 clustered breakpoints.

Methods

Case report

The patient was born to a normal G1P1 18 year old woman and her 29 -year-old unrelated normal husband. Pregnancy was unremarkable and delivery was at 39 weeks of gestation. Birth weight was 2,220 g (3rd centile), height and head circumference were not recorded. He was immediately removed to the neonatal intensive care unit due to severe respiratory distress and surgical correction of lumbar meningocele. He was referred to present multiple congenital anomalies. Infantile spasms were present since the 1st week of life and were partially responsive to oxcarbazepine and topiramate. Examination at age 5 months showed height of 59,4 (<

3rd centile), weight of 4,700 g (< 3rd centile) and OFC of 38,1 cm (< 3rd centile). He presented with severe developmental delay, microcephaly, square face, straight/sparse eyebrows, short palpebral fissures, blepharophimosis, posteriorly angulated, low-set, and abnormally modeled ears, mid-face hypoplasia, bilateral cleft lip and palate, lumbo-sacral surgical scar due to meningocele repair, micropenis, broad proximal phalanges, tapered distal digits, fifth finger clinodactyly, and overlapping toes (**fig 1**). Choanal atresia, cerebral ventricular dilatation were detected by CT scan.



Fig. 1 Facial aspect of the patient
Cytogenetics

Chromosomal analyses were performed on peripheral blood using conventional GTG-banding techniques at the 550 band level.

Array-comparative genomic hybridization

Array-comparative genomic hybridization (array-CGH) using the whole genome CytosureTM, ISCA V2 array 4X180K (Oxford Gene Technology, OGT, UK) was performed according to the manufacturer's instructions. Scanned images of the arrays were processed and analyzed using Feature Extraction software and Genomic Workbench software (both from Agilent Technologies), with the statistical algorithm ADM-2, and a sensitivity threshold of 6.0. We applied a 'loop design' in our hybridizations as previously described (Allemeersch et al. 2009), resulting in two reverse labeling hybridizations per sample. To be recognized by the software, alterations had to encompass at least three consecutive probes with aberrant log₂ values, and those not detected in both dye-swap experiments of the same sample were excluded from the analysis.

Results

Conventional cytogenetic analysis revealed a 46, XY normal karyotype. Array-CGH results of the patient showed five deletions adjacent to one duplication spread over p35.3-1p36.33- chromosome regions (**fig. 2** and **table 1**). Array-CGH results from the parents were normal, indicating that it is a *de novo* rearrangement.

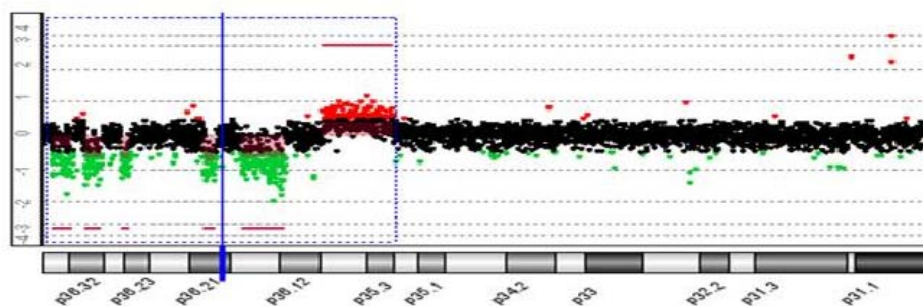


Fig. 2 Array CGH profile of terminal region of the short arm of chromosome 1 showing five deletions and one duplication clustered at 1p36.33 – 1p35.3

Table 1 Summary of array CGH analysis by 4X180K (OGT) showing localization and size of the rearrangements

| Chromosome band | Rearrangement | Size (Mb) | Position (USCS Hg 19) |
|-----------------|---------------|-----------|------------------------|
| 1p36.33-p36.32 | del | 1,7 | chr1:1023846-2761528 |
| 1p36.32 | del | 1,4 | chr1:3696933-5200401 |
| 1p36.31-p36.23 | del | 0,83 | chr1:6882352-7718050 |
| 1p36.21 | del | 0,94 | chr1:14012378-14992103 |
| 1p36.13-p36.12 | del | 3,7 | chr1:17213968-20934341 |
| 1p36.11-p35.3 | dup | 5,9 | chr1:24146844-30208750 |

Discussion

Microdeletion syndrome 1p36 (OMIM # 607872) has an estimated incidence of 1:5,000 - 1:10,000. Patients with this syndrome have common clinical aspect characterized by intellectual disability , straight eyebrows , deep eyes , epicanthal folds , pointed chin , hypotonia , hearing loss, behavior disorder , cardiac abnormalities and eye (Battaglia et al. 2008). Chromosomal rearrangements are variable in size and include terminal or interstitial deletions, derived chromosomes or complex rearrangements (Heilstedt et al. 2003; Gajecka et al. 2007;

Giannikou et al. 2012) and, consequently, are associated with a broad phenotypic spectrum which only partially overlap the clinical description above.

Our case presented a CCR at 1p region comprising a 1p36.11-p35p3 duplication in addition to multiple deletions at 1p36, and exhibited a phenotype atypical of 1p36 deletion syndrome. Due to its unique combination of genomic imbalances, it is difficult to correlate his genotype with clinical findings from other patients, or clinically characterized syndromes (Chen et al. 2008; Battaglia et al. 2008; Battaglia 2011; Vieira et al. 2011). Further, array-CGH only reviews breakpoints which result in unbalances, and additional breakpoints, and altered order or orientation of chromosome segments are likely to be present in our patient genome.

CCRs are relatively rare in the population, and about 270 cases have been documented so far (review in Pellestor et al. 2011; Liu et al. 2011). The last few years, chromotripsis, the phenomenon of a massive genomic rearrangement occurring in a supposedly single catastrophic event, was described to occur in 2% of the genome (Stephens et al. 2011). This shattering and reassembly of a chromosome was also reported in the germline (Kloosterman et al. 2011; Plaisancié et al. 2014). In particular, the work of Liu et al. (2011) characterized 17 of such CCRs and revealed what they called a *chromotripsis-like* pattern of rearrangement. The highest frequency and resulting complexity of chromotripsis in cancer cells compared to germline events can possibly be ascribed to a more stringent selection against resulting phenotypes.

In conclusion, our patient has a complex rearrangement involving the 1p36.33-p35.3 region which partially overlaps a broad phenotype of the 1p36 deletion syndrome. Although the CCR causative mechanism remains unknown, the lack of evident mosaicism in this and other CCR cases point to a single catastrophic chromosome shattering and joining event, as postulated for chromotripsis, rather than successive or sequential rearrangements.

Acknowledgments

We thank patient and mother for their collaboration. Genetics analysis was supported by grants from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (2010/18740-2 and 2011/07012-9) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (306741/2012-1).

Conflict of Interest: The authors declare that have no conflict of interest.

References

Allemeersch, J, Vooren VS, Hannes F, De Moor B, Vermeesch JR, Moreau Y (2009) An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. *BMC bioinformatics* 10(1), 380.

Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey LL, Zuberi SM, Carey JC (2008) Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: A recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatr* 121:404–410.

Battaglia A (2011) Commentary: Recognizing syndromes with overlapping features: How difficult is it? Considerations generated by the article on differential diagnosis of Smith–Magenis syndrome by Vieira and colleagues. *Am J Med Genet Part A* 155(5), 986-987.

Chen E, Obolensky E, Rauen KA, Shaffer LG, Li X (2008) Cytogenetic and array CGH characterization of de novo 1p36 duplications and deletion in a patient with congenital cataracts, hearing loss, choanal atresia, and mental retardation. *Am J Med Genet A* 146A(21):2785–2790

Chen JM, Férec C, Cooper DN (2012) Transient hypermutability, chromothripsis and replication-based mechanisms in the generation of concurrent clustered mutations. *Mutat Res* 750:52e9

Gajecka M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, Heilstedt HA, Ansel DA, Theisen A, Rice R, Rice DP, Shaffer LG (2005) Delineation of mechanisms and regions of dosage imbalance in complex rearrangements of 1p36 leads to a putative gene for regulation of cranial suture closure. *Eur J Hum Genet* 13(2):139-149.

Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG (2007) Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145C(4):346–356

Giannikou K, Fryssira H, Oikonomakis V, Syrmou A, Kosma K, Tzetis M, Kitsio-Tzeli S, Kanavakis E (2012) Further delineation of novel 1p36 rearrangements by array-CGH analysis: narrowing the breakpoints and clarifying the “extended” phenotype. *Gene* 506(2), 360-368

Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG (2003) Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet* 72(5):1200–1212

Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, Duran KJ, de Bruijn E, Bakker SC, Letteboer T, van Nesselrooij B, Hochstenbach R, Poot M, Cuppen E (2011) Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Hum Mol Genet* ddr073.

Liu P, Erez A, Nagamani SC, Dhar SU, Kołodziejaska KE, Dharmadhikari AV, Cooper ML, Wiszniewska J, Zhang F, Withers MA, Bacino CA, Campos-Acevedo LD, Delgado MR, Freedenberg D, Garnica A, Grebe TA, Hernandez-Almaguer D, Immken L, Lalani SR, McLean SD, Northrup H, Scaglia F, Strathearn L, Trapani P, Kang SH, Patel A, Cheung SW, Hastings PJ, Stankiewicz P, Lupski JR, Bi W (2011) Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell* 146(6):889–903

Macera MJ, Sobrino A, Levy B, Jobanputra V, Aggarwal V, Mills A, Esteves C, Hanscom C, Pereira S, Pillalamarri V, Ordulu Z, Morton C, Talkowski M, Warburton D (2014) Prenatal diagnosis of chromothripsis, with nine breaks characterized by karyotyping, FISH, microarray and whole-genome sequencing. *Prenat Diagn* doi: 10.1002/pd.4456

Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR (1980) Complex chromosome rearrangements: report of a new case and literature review. *Clin Genet* 18(6), 436-444.

Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, Sarda P (2011) Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod update* 17(4), 476-494.

Plaisancié J, Kleinfinger P, Cances C, Bazin A, Julia S, Trost D, Lohmann L, Vigouroux A (2014) Constitutional chromoanasythesis: description of a rare chromosomal event in a patient. *Eur J Med Genet* 57.10 (2014): 567-570

Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144(1):27–40

Vieira GH, Rodriguez JD, Boy R, de Paiva IS, DuPont BR, Moretti-Ferreira D, Srivastava AK (2011) Differential diagnosis of Smith–Magenis syndrome: 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A* 155:988–992.

Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR (2009) Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* 25(7):298–307

APEÊNDICE E - PSDE, Processo BEX: 12276/12-0

RESUMO

Holoprosencefalia (HPE) é a malformação mais comum do cérebro e rosto em seres humanos (1 em 250 fetos, e 1/16, 000 nascimentos). O surgimento de HPE é associado à disfunção de múltiplos genes envolvidos na formação do prosencéfalo. Isso envolve todos os fatores das vias de sinalização *SHH*, *NODAL*, *FGF* e *BMP*. Além disso, a equipe de Rennes-França mostrou recentemente que a via de sinalização Notch também está envolvido na etiologia da doença. Realizamos a hibridização *in situ* de cinco genes (*ASCL1*, *TAGLN3*, *BSX*, *CHGA*, *NHLH1* e *HES5*) relacionados no desenvolvimento do hipotálamo para dissecar o papel da cada um na sinalização envolvido no desenvolvimento de HPE.

INTRODUÇÃO

Holoprosencefalia (HPE) é a malformação mais comum do cérebro e rosto em seres humanos (1 em 250 fetos, e 1/16, 000 nascimentos). Caracteriza-se pela separação incompleta dos hemisférios cerebrais em distintas metades direita e esquerda. Outros derivados do cérebro anterior, incluindo o tálamo e pituitária, também podem desenvolver de forma anormal. Três graus de gravidade crescente são descritas: lobar, semi-lobar e alobar HPE. Outro subtipo mais suave de HPE chamada variante média inter-hemisférica (MIHF) também é relatado (Barkovich e Quint, 1993). Clinicamente, exibe penetrância incompleta, e sua expressividade é extremamente variável. Na maioria dos casos, anomalias faciais são observadas em HPE, como ciclopia, probóscide, fenda labial/palatina mediana em formas graves, hipotelorismo ocular ou incisivo central superior único em formas menores (Lazaro et al, 2004 Kauvar e Muenke, 2010.; Dubourg et al, 2010).

HPE é geneticamente heterogêneo com mais de 80% dos genes atualmente desconhecidos. Geralmente, sua etiologia é atribuída a mutação *de novo* ou herança autossômica dominante de mutações deletérios dos 12 genes de HPE (Roessler et al, 1996; Brown et al, 1998;. Wallis et al, 1999;.. Gripp et ai, 2000, Roessler e Muenke, 2010).

Desde 1997, um grupo internacional foi organizado em Rennes-França e levantou mais de 1500 amostras ou sangue fetal para estudos com HPE. Até a presente data, o diagnóstico molecular permanece desconhecido em 70% dos pacientes.

As análises pelo grupo de Rennes por hibridização genômica comparativa (*arrayCGH*) e pelo sequenciamento do exoma, permitiu isolar genes potencialmente

envolvidos nesta patologia. O objetivo da equipe de Rennes é elucidar a base molecular da HPE de desenvolver abordagens funcionais para validar novos genes candidatos. Isso envolve todos os fatores da sinalização da via do *SHH*, *NODAL*, *FGF* e *BMP*.

Além disso, a equipe de Rennes recentemente mostrou que a via Notch está também envolvida na etiologia da doença. Até o momento, uma visão geral das interações entre estas proteínas durante o desenvolvimento do cérebro anterior não está disponível. Portanto, validar genes candidatos previamente identificados pela equipe, é imprescindível para melhorar o entendimento da genética de HPE.

O Objetivo deste projeto foi validar a hipótese de que há o envolvimento de várias vias de sinalização (*SHH*, *NODAL*, *BMP*, *FGF* e Notch) para o surgimento de HPE e enriquecer os conhecimentos sobre a base genética desta afecção. Realizou-se análise da expressão de cinco neurogenes como *ASCL1*, *TANGL3*, *BSX*, *NHLH1* e *HES5* pertencentes a via *Notch*.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas duas técnicas:

- Experimentação Animal (cultura de embriões de galinha) associado ao uso de ciclopamina (inibidos da via *SHH*)
- Hibridização in situ em embriões inteiros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

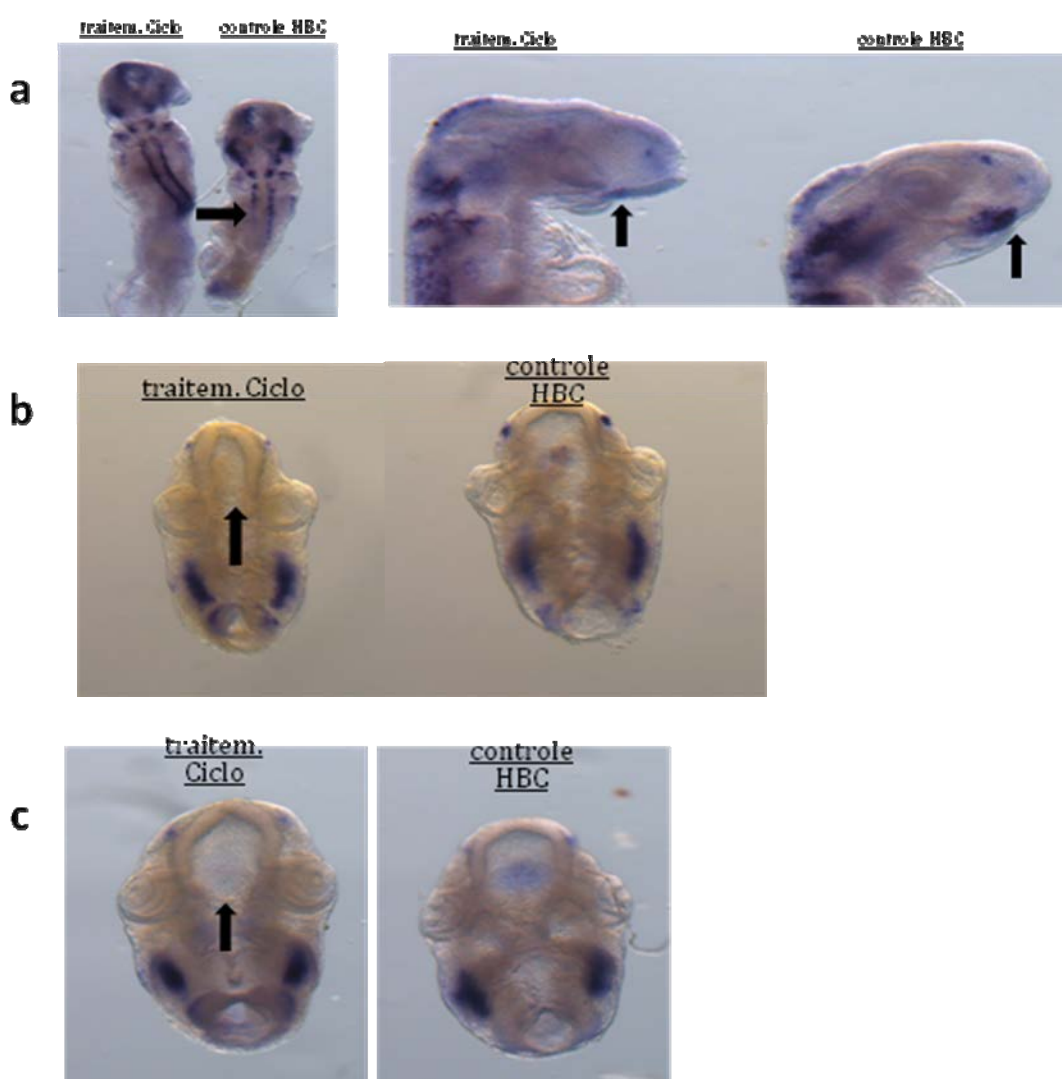
Realizou-se análise da expressão de cinco neurogenes relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso, como *ASCL1*, *CHGA*, *TANGL3*, *BSX*, *NHLH1* e *HES5* após hibridização in situ.

Houve alteração na expressão dos cinco genes (Figura 01).

O gene *ASCL1* mostrou perda da expressão nos embriões tratados com ciclopamina na região do hipotálamo e um aumento da expressão na formação do tubo neural (figura 01a). Os genes *CHGA*, *TANGL3*, *BSX*, *NHLH1* mostraram apenas diminuição da expressão nos embriões tratados com ciclopamina (figura 01 b, c, d, e e respectivamente). A ausência da expressão de *BSX* deve ser devido ao estágio de desenvolvimento, imaginamos que o embrião no estado HH9 é jovem e que a expressão deste gene tenha início tardio.

O gene *Hes5* mostrou um aumento da expressão em embriões tratados com ciclopamina (figura 01f).

A ciclopamina é um inibidor da via *SHH*, promovendo assim um desequilíbrio na expressão dos genes neurogênicos permitindo destacar deste estudo que há uma provável ligação íntima nas vias *Notch* e *SHH* no desenvolvimento neurológico, porém este trabalho faz parte de um projeto da Universidade de Rennes, em andamento. Assim outros trabalhos precisam ser concluídos para alcançar as respostas que sustentam a hipótese se que há o envolvimento de várias vias de sinalização (*SHH*, *NODAL*, *BMP*, *FGF* e *Notch*) para o surgimento de HPE.



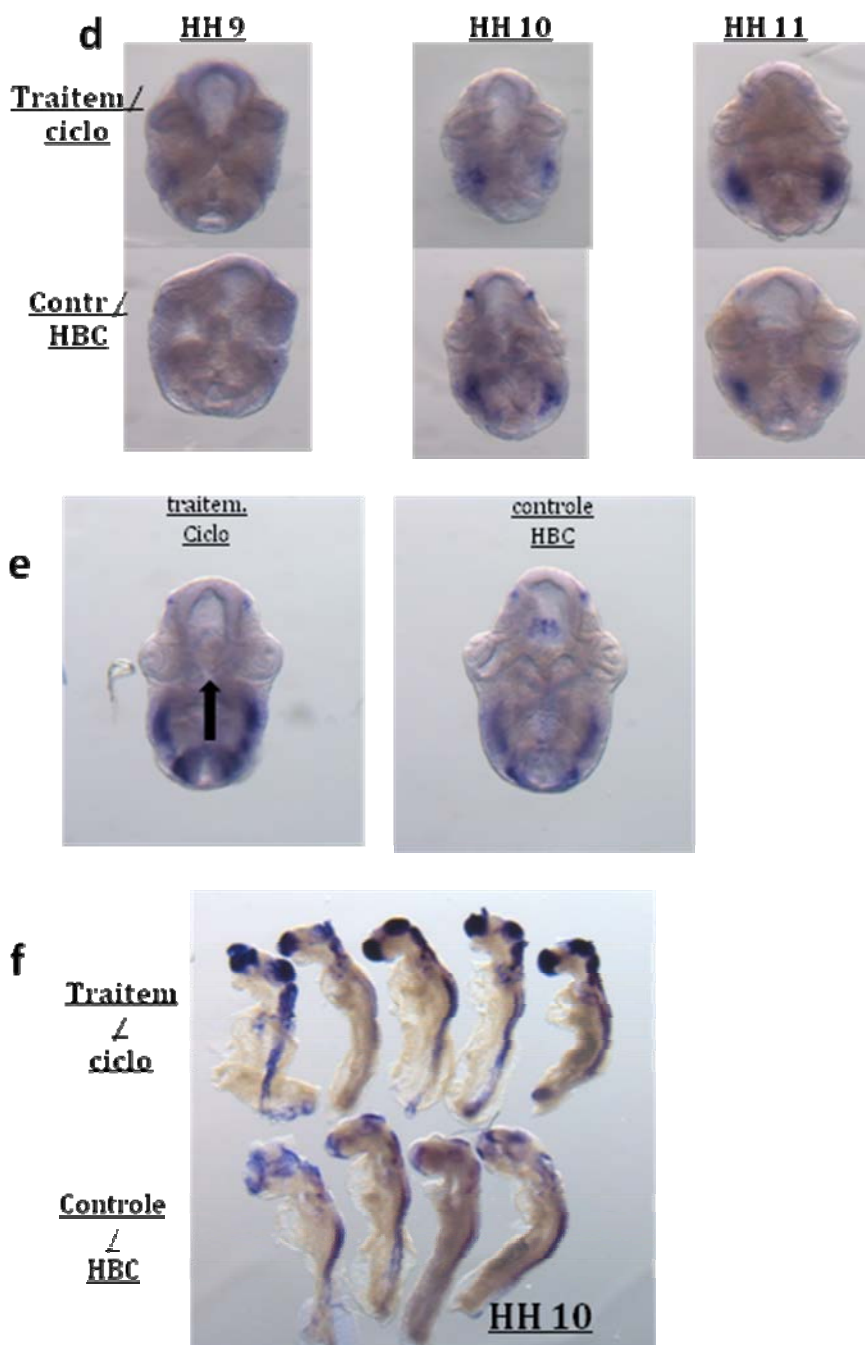


Figura 01: expressão dos genes neurogênicos durante o desenvolvimento embrionário de galinha. Há comparação entre os grupos tratados com ciclopamina e controle. a) *ASCLI*, b) *CHGA*, c) *TANGL3*, d) *BSX*, e) *NHLH1* e f) *HES5*

REFERÊNCIAS

Barkovich AJ, Quint DJ: Middle interhemispheric fusion: an unusual variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol* 1993, 14(2):431-440.

Barr M Jr., Cohen MM Jr.: Holoprosencephaly survival and performance. *Am J Med Genet* 1999, 89(2):116-120.

Brown SA, Warburton D, Brown LY, Yu C-y, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S, Hennekam RCM, Muenke M. 1998. Holoprosencephaly due to mutations in *ZIC2*, a homologue of *Drosophila odd-paired*. *Nat Genet* 20:180-183.

Croen LA, Shaw GM, Lammer EJ: Holoprosencephaly: epidemiologic and clinical characteristics of a California population. *Am J Med Genet* 1996, 64(3):465-472.

Dubourg C, David V, Gropman A, Mercier S, Muenke M, Odent S, Pineda-Alvarez DE, Roessler E. 2010. Clinical utility Gene Card: holoprosencephaly. *Euro J Med Genet* 19:18-20.

Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, Richieri-Costa A, Zackai EH, Massague J, Muenke M, Elledge S. 2000. Mutations in *TGIF* cause holoprosencephaly and link Nodal signaling to human neural axis determination. *Nat Genet* 25: 205-208.

Kauvar EF, Muenke M. 2010. Holoprosencephaly: recommendations for diagnosis and management. *Curr Opin Pediatr* 22:687-695.

Lazaro L, Dubourg C, Pasquier L, Le Duff F, Blayau M, Durou MR, de la Pintiere AT, Aguilera C, David V, Odent S: Phenotypic and molecular variability of the holoprosencephalic spectrum. *Am J Med Genet A* 2004, 129(1):21-24

Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui L-C, Muenke M. 1996. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14: 357-360

Roessler E, Muenke M. 2010. The molecular genetics of holoprosencephaly. *Amer J Med Genet, Part C* 154C: 52-61.

Roessler E, Muenke M: Holoprosencephaly: a paradigm for the complex genetics of brain development. *J Inherit Metab Dis* 1998, 21(5):481-497.

Comite de Ética em Pesquisa (Nº 111/2011)

Ofício nº 111/2011-SVAPEPE-CEP

Bauru, 27 de abril de 2011

Prezado(a) Senhor(a)

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

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

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

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

Atenciosamente,


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

Ilmo(a). Sr(a).

DRA. LUCILENE ARILHO RIBEIRO BICUDO
Genética – HRAC/USP