

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE SONIC HEDGEHOG (*SHH*) EM  
PACIENTES COM ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

**Claudia Danielli Pereira Bertolacini**

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista  
“Julio de Mesquita Filho”, Campus  
Botucatu, para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências Biológicas,  
Área de concentração: Genética

Botucatu  
2008

## RESUMO

Anomalias craniofaciais são alterações do desenvolvimento do crânio e da face que podem ou não estar acompanhadas de malformações estruturais ou funcionais do sistema nervoso central (SNC). Representam a quarta causa mais freqüente de anomalias congênitas em recém-nascidos determinando a seus portadores prognóstico reservado na maioria das vezes. O gene Sonic Hedgehog (*SHH*) codifica uma molécula sinalizadora que desempenha um papel central no desenvolvimento do sistema nervoso e esquelético. A inibição da sinalização do *SHH* no crescimento do processo frontonasal de galinha inibe o crescimento facial e causa fissura de lábio (Hu and Helmes, 1999). Camundongos homocigotos para *Shh* mutado apresentam defeitos no desenvolvimento da linha média, ausência de células ventrais no cérebro e anomalias craniofaciais, incluindo ciclopia e probóscide, fenótipo consistente com os defeitos vistos na holoprosencefalia humana. O objetivo desse trabalho foi realizar a análise mutacional do gene Sonic Hedgehog em pacientes com Anomalias Craniofaciais. A amostra foi composta por 136 indivíduos, sendo 90 com fissuras orais não síndromicas, 9 com displasia frontonasal (DFN) e 37 apresentavam o espectro da Holoprosencefalia (HPE). Os resultados obtidos mostraram que no grupo dos 90 pacientes portadores de fissuras orais não síndromica nenhuma variante foi encontrada. Dentre os 9 pacientes com DFN, apenas um polimorfismo conhecido foi indentificado (c.630 C>T). Dos 37 indivíduos que apresentavam o espectro HPE, quatro variações no gene *SHH* foram localizadas: 2 mutações missense e 2 polimorfismos. Uma das mutações detectada (p.H100Q) foi descrita por Odent et al. (1999) e a outra mutação missense (p.C198Y) é nova. Os 2 polimorfismos encontrados (p.L299L e p.E136K) são novos. O grupo controle não apresentou nenhuma variante. Os resultados sugerem que mutações no gene *SHH* em indivíduos portadores de fissuras orais não síndromicas e de DFN não são comuns e, possivelmente, este gene não tenha participação na causalidade destes defeitos. Já as mutações encontradas nos indivíduos com HPE mostram o papel do gene *SHH* como contribuinte na causalidade das HPE.

## ABSTRACT

Craniofacial anomalies are alterations of the cranium and face development that can be associated or not with the central nervous system malformations. They represent the forth frequent cause of congenital anomalies in newborns giving to their carriers an elusive prognostic. Sonic Hedghog (*SHH*) gene encodes a signaling molecule that plays a central role in the developmental patterning of the nervous and skeletal systems. Inhibition of SHH signaling in the outgrowth chick frontonasal process with a function blocking antibody inhibited facial outgrowth and caused cleft lip (Hu and Helmes, 1999). Mice homozygous for a disrupted *SHH* gene shows defects in the development of midline neural structures, lack ventral cells in the brain and display craniofacial anomalies, including cyclopia and a proboscis-like nasal structure. This phenotype is consistent with the defects seen in human HPE. The goal of this study was to perform mutational analysis of the SHH gene in patients with craniofacial anomalies. The sample was composed by 90 individuals with non syndromic cleft lip and/or palate, 9 individuals with frontonasal dysplasia (FND), and 37 individuals with the HPE spectrum. The results showed that in the group with non syndromic cleft lip and/or palate none variant was found. Among the 9 patients with FND, only a known polymorphism was found (c.630 C>T). Among the 37 individuals with HPE, four variants were found: two missense mutations, and two polymorphisms. One of the detected mutation (p. H100Q) have been described by Odent et al. (1999), and the other mutation (p.C198Y) is a new one. The two polymorphism (p.L299L and p.E136K) are new ones. The results suggested that mutations in the *SHH* gene in non syndromic oral clefts and FND are not common, and probability this gene does not play a role in these anomalies. The mutations found in individuals with HPE showed the role of the *SHH* gene as the cause of this anomaly.

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1. Anomalias Craniofaciais

Anomalias craniofaciais são alterações do desenvolvimento do crânio e da face que podem ou não estar acompanhadas de malformações estruturais ou funcionais do sistema nervoso central (SNC). Representam a quarta anomalia congênita mais freqüente em recém-nascidos determinando a seus portadores prognóstico reservado na maioria das vezes (Cohen, 2003).

Durante muito tempo, considerou-se que grande parte dessas anomalias craniofaciais resultava da formação insuficiente ou migração inadequada do mesênquima da base do crânio e da face (Mazzola, 1976). Atualmente, com a evolução do conhecimento, principalmente no domínio da genética molecular, sabe-se que o desenvolvimento normal resulta de mecanismos diversos, dependentes de uma legião de genes, os quais estão em permanente interação (Whiting, 1997; Lowe et al, 2000; Marti e Bovolenta, 2002; Marazita and Mooney, 2004; Merritt, 2005).

O desenvolvimento craniofacial é de alta complexidade. Depende de um processo dinâmico que envolve estágios múltiplos que começam com a formação da crista neural, necessária ao desenvolvimento do sistema nervoso central, e a conseqüente migração para formar juntamente com as células mesenquimais, o primórdio facial. Atividades indutivas e sinalizadoras coordenam o crescimento do primórdio facial a partir de brotos mesenquimais indiferenciados até um intrincado mosaico de estruturas ósseas e cartilaginosas, que em conjunto com músculos e outros tecidos constituirão o

arcabouço definitivo da face. O meio pelo qual estas moléculas controlam as interações ecto-mesenquimais que mediam a morfogênese e crescimento craniofacial ainda não está elucidado e seguramente existem centenas de possíveis moléculas sinalizadoras com seus devidos genes candidatos envolvidas nesta tarefa (Francis-West et al., 1998).

Dentro do desenvolvimento craniofacial destacam-se o tipo e a localização das moléculas reguladoras que influenciam os diferentes estágios do desenvolvimento do sistema nervoso central, incluindo indução neuronal, especialização regional, migração, crescimento e orientação axonal e formação das sinapses (Lacbawan and Muenke, 2002). Algumas famílias de genes exercem papel preponderante no desenvolvimento das vesículas cerebrais e estruturas relacionadas. É neste universo que centralizamos nossa linha de pesquisa, utilizando como modelo principal alterações da vesícula prosencefálica, que determinam um importante defeito da linha média craniofacial, chamadas Holoprosencefalias (HPE) e as síndromes craniofaciais correlatas que, de alguma forma manifestam sinais de envolvimento de genes relacionados ao desenvolvimento do prosencéfalo, da linha média do sistema nervoso central ou de outras estruturas embriologicamente relacionadas.

Fatores genéticos ou ambientais agindo em certas etapas durante o desenvolvimento do sistema nervoso central resultam em anormalidades cerebrais significantes que podem comprometer quaisquer das vesículas cerebrais (prosencefalo, mesencefalo e romboencéfalo), as comissuras cerebrais (corpo caloso, comissura anterior e posterior) e estruturas associadas (Cohen, 2006).

A multiplicidade e complexidade dos mecanismos genéticos envolvidos nos diversos processos de desenvolvimento craniofacial resultam, sempre que comprometidos, em uma variedade de síndromes, seqüências, associações ou mesmo anomalias isoladas. A classificação clínica de pacientes por síndromes específicas é difícil e, muitas vezes, confusa, resultando em quadros que se sobrepõem e são dispostos dentro de um espectro contínuo, no qual diferentes mecanismos etiológicos e patogénéticos se interpõem (Cohen, 2006).

Após o advento dos exames de neuroimagem, diversas anomalias que até então não eram descritas ou relacionadas ao espectro das HPE, foram recentemente incorporadas ao diagnóstico das HPE, aumentando, dessa forma, o arsenal clínico. Dentre estas anomalias destacam-se as anomalias nasais como a arrinencefalia, as anomalias estruturais do corpo caloso, principalmente a agenesia do mesmo, as anomalias da glândula pituitária, as anomalias dentárias como incisivo central único, as anomalias oculares (anoftalmia e microftalmia), entre outras. Esses fenótipos, de certa forma, são classificados como importantes defeitos da linha média craniofacial. Atualmente, sabe-se que a ampliação deste universo dependia apenas de um meio mais simples e eficaz de diagnóstico, pois parte dessas anomalias foram observadas em modelos experimentais com outros vertebrados e em achados clínicos descritos posteriormente acompanhados por determinadas mutações (Roessler e Muenke, 2001; Cohen, 2003, Dakubo et al., 2003; Roessler et al., 2003; Schimmenti et al., 2003).

O principal modelo relacionado aos defeitos de linha média craniofacial 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).

### **1.1.1. Holoprosencefalia**

O termo Holoprosencefalia (HPE) foi proposto por DeMeyer 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 devido à falha do crescimento ou segmentação da região final do tubo neural anterior (Ming e Muenke, 1998). Neste complexo malformativo, não há separação do cérebro em dois hemisférios distintos e, frequentemente, malformações faciais ao longo da linha média também são observadas (Golden, 1998).

A HPE é considerada a malformação cerebral mais comum em humanos. Esse respectivo fenótipo apresenta uma alta incidência de 1:250 durante a embriogênese (Matsunaga e Shiota, 1977), mas devido a letalidade intra-uterina a frequência é de 1:16.000 nascidos vivos (Roach et al., 1975).

De acordo com a gravidade das malformações cerebrais são definidos quatro tipos de HPE: 1) HPE alobar, considerada a forma mais grave, o cérebro é pequeno e monoventricular, sem divisão interhemisférica; 2) HPE semilobar, os lobos cerebrais são rudimentares e a fissura interhemisférica nunca é completa, estando presente apenas posteriormente de modo que há fusão dos lobos frontais e parietais; 3) HPE lobar, forma menos grave, o cérebro tem lobos bem formados que podem ser de tamanho normal (Demyer e Zeman,

1963) e 4) fusão inter-hemisférica média, uma malformação rara na qual os hemisférios cerebrais são bem formados frontal e occipitalmente mas falham em se dividir nas regiões parietal e frontal posterior (Barkovich e Quint, 1993; Simon et al., 2002). Recentemente, foi descrito um fenótipo mais leve e distinto dentro do espectro holoprosencefálico denominado HPE-“*like*”. Os portadores apresentam fáceis característica da HPE (hipotelorismo, incisivo central superior único, fissura labiopalatina, hipoplasia da face média, microcefalia) acompanhada de sistema nervoso central íntegro ou com pequenos desvios da normalidade (Richieri-Costa e Ribeiro,2006b) .

Várias anomalias craniofaciais estão comumente associadas à HPE, e o termo seqüência da HPE tem sido usado em clínica genética para designá-los. O fenótipo da holoprosencefalia é bastante variável abrangendo um espectro contínuo desde manifestações severas envolvendo graves anomalias do cérebro e face até indivíduos clinicamente normais (Cohen, 1989). Os principais macro/microsinais dentro deste espectro heterogêneo incluem: diminuição do perímetro craniano, agenesia ou hipoplasia da espinha nasal anterior, ausência ou diminuição do ângulo frontonasal, hipotelorismo, anomalias oculares diversas, maxila hipoplástica, nariz hipoplástico, asas nasais hipoplásticas, ausência de ponta nasal, estenose da abertura nasal, filtro hipodesenvolvido, incisivo central único, fissura lábio palatina mediana ou falsa mediana, e má oclusão dentária (Richieri-Costa e Ribeiro, 2006 a,b).

A etiologia da HPE é extremamente heterogênea envolvendo fatores genéticos e ambientais. Há evidências sugerindo a participação de diversos fatores ambientais como teratógenos em HPE, entre eles podemos citar o etanol, ácido retinóico, diabetes materna, sulfasalazina e hipocolesterolemia



materna (Sezgin et al., 2002). Porém, até o momento, o único fator etiológico comprovadamente envolvido é a diabetes materna (Barr et al., 1983).

Alguns genes têm se mostrado positivamente envolvidos com a etiologia de defeitos dentro do espectro holoprosencefálico, dentre eles o gene que apresenta maior frequência de mutação em pacientes com HPE é o *SHH* (5-10%), seguido pelo *ZIC2*(3-5%), *SIX3* (1,5-4%) e *TGIF* (1-1,5). Relatos de mutações nos genes *PTCH*, *DHCR7*, *GLI2* e *TDGF1* em pacientes com HPE são baseados em relatos isolados (Roessler et al., 1996; Roessler et al., 1997a; Roessler et al., 1997b, Brown et al., 1998; Nanni et al. 1999; Oriolli et al., 2001; Roessler et al., 2003; Duborg et al. 2004; Shim et al., 2004).

Em 1996 foram descritas as primeiras mutações no gene *SHH* (Roessler et al., 1996). Até o momento, mutações neste gene constituem o maior numero de casos de HPE diagnosticada geneticamente. A haploinsuficiência de *SHH* parece causar HPE em humanos (Belloni et al., 1996; Roessler et al., 1997b) e a herança autossômica dominante revelou ser causa significativa de HPE familiar (Nanni et al., 1999).

Um total de 48 mutações no gene *SHH* foi encontrado até o ano de 2007 em pacientes portadores de HPE. As variações de sequencia no gene *SHH* e as respectivas referências estão descritas na Tabela 1, assim como a troca de aminoácido na proteína no caso de mutações missenses e nonsense.

**Tabela 1: Mutações no gene *SHH* descritas na literatura até o ano de 2007 em pacientes portadores de HPE.**

VARIAÇÕES DE SEQUÊNCIA	CONSEQUÊNCIA NA PROTEÍNA	REFERÊNCIA
c.91G>A	p.G31R	
c.298C>T	p.Q100X	
c.313A>T	p.K105X	(Roessler et al., 1996)
c.349T>C	p.W117R	
c.349T>G	p.W117G	
c.671T>A	p.V224E	
c.676G>A	p.A226T	(Roessler et al., 1997a)
c.1147G>A	p.A384T	
c.9_12 ins GCTG	–	
c.38_45 delTCTCCTCG	–	
c.331A>T	p.L111F	
c.345C>A	p.N115K	
c.625C>T	p.Q209X	
c.708C>A	p.S236R	(Nanni et al., 1999)
c.766C>T	p.E256X	
c.787_807 delCGCCTGCTGCTC ACCGCCGCG	p.263_269delRLLLTA	
c.869G>A	p.G290D	
c.1121_1140delGCGCCCTTC	p.378_380delAPF	
c.1270C>Gc.	p.P424A	
c.1308C>T	p.S436L	
c.300G>C	p.Q100H	
c.562G>C	p.E188Q	
c.664C>T	p.D222N	(Odent et al., 1999)
c.474C>G	p.Y158X	
c.38_45 delTCTCCTCG	–	(Kato et al., 2000)
c.419A>G	p.H140P	(Oriolli et al., 2001)
c.548G>T	p.C183F	
c.263A>T	p.D88V	(Heussler et al., 2002; Nanni et al., 1999)
c.383G>A	p.W128X	(Marini et al., 2003)
c.17G>C	p.R6T	

c.72C>A	p.C24X	
c.211deG	–	
c.316_321delTTGAAC	p.106_107delLN	
c.388G>T	p.E130X	(Dubourg et al, 2004)
c.449C>G	p.T150	
c.1040C>A	p.P347Q	
c.1061T>C	p.I354T	
c.1142G>C	p.R381P	
c.80G>C	p.G27A	
c.800C>T	p.T267I	(Hehr et al., 2004)
c.1117G>A	p.R381P	
c.850G>T	p.E284X	(Hehr et al., 2004; Roessler et al., 1997a)
c.332T>A	p.I111N	(El-Jaick et al., 2005)
c.420C>G	p.H140Q	
c.839C>A	S280X	
c.1088C>A	C363Y	(Richieri-Costa, Ribeiro, 2006a)
c.653T>A	L218P	
c.593G>A	C198Y	

A descoberta do gene *SHH* humano como o primeiro gene causador da HPE levou ao conhecimento de outros genes potenciais para HPE, alguns dos quais pertencentes à via de sinalização do próprio SHH (Weed e cols., 1997). Por exemplo, os co-receptores humanos para *SHH*, Patched (*PTCH*) e Smoothened (*SMO*) foram clonados (Alcedo et al., 1996) e são genes candidatos para HPE.

### 1.1.2. Displasia Frontonasal

A Displasia frontonasal (DFN), também referida como fissura facial mediana ou disostose ou malformação frontonasal, é uma anomalia congênita incomum de etiologia desconhecida, tipicamente com ocorrência esporádica podendo também mostrar um padrão familiar (Sedano et al, 1970).

A DFN consiste em uma malformação decorrente de alterações do processo frontonasal (Sedano e Gorlin, 1988). Clinicamente, uma série de anomalias pode atingir os olhos, a testa e o nariz. Dentre essas incluem hipertolerismo, presença de crânio bifido oculto (deficiência do osso frontal na linha média) e uma ampla raiz nasal (Guion-Almeida et al., 1996; Gorlin et al., 2001). A DFN pode correr por si só (DFN clássica) ou, como parte do quadro clínico de várias síndromes como por exemplo síndrome oculoauriculaofrontonasal (OAV) (OMIN 601452), síndrome craniofrontonasal (CFNS) (OMIN 304110) e outras condições raras (Guion-Almeida et al., 1996). Há relatos de alguns casos de variantes raras de DFN as quais anomalias craniofaciais similares estão associadas com malformação do sistema nervoso central e defeitos nos membros incluindo hipoplasia/aplasia da tibia, planta do pé flexionada, calcanhar virado para o interior, e polidactilia preaxial dos pés (Suelo e Fernandes, 1993). Essa combinação de anomalias tem sido chamada de “Displasia Frontonasal Acromegálica” (ADFN) (OMIN 603671) (Verloes et al., 1992).

As anomalias observadas nas DFNs isoladas são embriologicamente relacionadas. Elas ocorrem no mesmo período crítico de tempo, mais provavelmente durante a indução precoce do prosencéfalo, resultando em anomalias que envolvem o processo frontonasal, estruturas da linha média facial e o primórdio dos olhos. Alguns genes são conhecidos por exercer efeitos

durante esse período de tempo (Wilkie and Morriss-Kay, 2001). Estudos moleculares identificaram cerca de 49 mutações no gene *EFNB1* em indivíduos com Displasia Craniofrontonasal (DCFN), condições essas que fazem parte do espectro da DFN (Twigg et al., 2004; Twigg et al., 2006).

Em 1999 Hu e Helms mostraram em seu trabalho que o gene *SHH* era essencial para a morfogênese dos processos frontonasal e maxilar. O excesso da proteína Shh levou a um aumento mediolateral do processo frontonasal e um alargamento entre os olhos, resultando em hipertelorismo. O gene SHH desempenha um papel importante no desenvolvimento de ambas as linhas medias do SNC e regiões craniofaciais. Este gene é expresso no desenvolvimento da notocorda e assoalho da placa neural (Roelink et al., 1994), auxiliando no desenvolvimento do tubo neural ventral, bem como na zona de atividade polarizadora das margens, atuando também no padrão de desenvolvimento dos membros ao longo do eixo anterior/posterior (Johnson and Tabin, 1997). Slaney et al. (1999) sugeriu que a base molecular das ADFN possa ser causada por perturbações na via sinalizadora de SHH. Contudo, ainda não há relatos da análise desse respectivo gene em pacientes com DFN isolada, ADFN e DFN associada ao espectro OAV.

### **1.1.3. Fissuras orais não sindrômicas**

As fissuras de lábio com ou sem fissura de palato (FL/P) são os principais defeitos congênitos humano encontrado em mais de 300 síndromes conhecidas, porém é mais frequentemente observada como uma malformação

isolada, sendo assim chamada de fissura de lábio com/sem palato não sindrômica e fissuras de palato não sindrômicas. Essas malformações congênitas levam a um fundamental impacto clínico (Murray, 2002). Pessoas portadoras requerem intervenções cirúrgicas, suporte odontológico, nutricional, fonoaudiólogo, psicológico e médico proporcionando um tratamento de alto custo. Nos países em desenvolvimento, os custos de reabilitação e problemas de acesso colocam o tratamento além do alcance de um vasto número de indivíduos afetados.

A incidência desses defeitos varia de acordo com a localização geográfica, etnia e status sócio-econômico, porém na população Caucasiana esta incidência é razoavelmente uniforme variando entre 1/700 para 1/1000 (para fissura de lábio com/sem fissura de palato) e aproximadamente 1/1000 (para fissuras de palato apenas) nascidos vivos (Fraser, 1970; Bonaiti-Pellie et al., 1982)

A classificação das fissuras é baseada de acordo com o desenvolvimento embriológico (Bender, 2000) e aspectos morfológicos (Talarova & Cervenka, 1998).

Quando as FL/P são descritas pela extensão do tecido envolvido, elas são unilaterais (envolve somente um lado da face) ou bilaterais (envolve os dois lados da face), e incompletas ou completas (Bender, 2000).

A classificação utilizada pelo Hospital de Reabilitações de Anomalias Craniofaciais (HRAC) – USP/Bauru – Centrinho tem como ponto de referência o forame incisivo.

Através desse sistema as fissuras orais podem ser separadas nos seguintes grupos de acordo com modificações sugeridas Silva Filho et al., 1992 para a classificação de Spina et al., 1972 (Quadro 1):

<p><b>Grupo I – Fissuras pré-forame incisivo</b></p>	<p style="text-align: right;">completa</p> <p style="text-align: right;">Direita &lt;</p> <p style="text-align: right;">incompleta</p> <p>a. Unilateral</p> <p style="text-align: right;">completa</p> <p style="text-align: right;">Esquerda &lt;</p> <p style="text-align: right;">Incompleta</p> <p>b. Bilateral: completa incompleta</p> <p>c. Madiana: completa incompleta</p>
<p><b>Grupo II – Fissuras transforame incisivo</b></p>	<p>a. Unilateral: <span style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <span style="font-size: 2em;">{</span> <span style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 5px;">Direita</span>  <span style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 5px;">Esquerda</span> </span></p> <p>b. Bilateral</p> <p>c. Mediana</p>
<p><b>Grupo III – Fissuras pós-forame incisivo</b></p>	<p>a. Completa</p> <p>b. Incompleta</p>
<p><b>Grupo IV – Fissuras raras da face</b></p>	

**Quadro 1: Classificação das fissuras lábio-palatais adotada no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais-USP/Bauru. Segundo Spina et al. e modificação sugerida por Silva Filho et al. (1992) as fissuras medianas estariam vinculadas também ao grupo II.**

As fissuras pré-forame são aquelas que atingem o lábio, uni ou bilateralmente (incompleta) podendo chegar até o forame incisivo (incluindo fissura do palato primário), quando são classificadas como completa. As fissuras pós forame são aquelas que afetam o palato secundário, podendo

afetar apenas a parte mole (recebendo a classificação incompleta) como também as partes mole e dura do palato secundário (completa). As fissuras transforame são aquelas que se iniciam no lábio, passam pelo forame incisivo e atingem o palato secundário.

A compreensão da etiologia e patogênese dessas condições, particularmente das variantes não-sindrômicas, ainda permanece relativamente escassa. Isso é um reflexo da complexidade e diversidade de mecanismos moleculares envolvidos durante a embriogênese. A etiologia das fissuras lábio-palatinas é considerada extremamente heterogênea, pois ambos fatores genéticos e ambientais desenvolvem papéis importantes e influentes (Schutte and Murray, 1999; Murray, 2002).

Estudos preliminares sugerem a participação de uma variedade de genes e/ou loci, bem como fatores ambientais que parecem desempenhar um papel importante na gênese de tais casos. Avanços na análise molecular e quantitativa propiciam novas oportunidades para identificar genes e interações gene-ambiente relevantes na etiologia desse defeito congênito comum e representativo.

Tem sido postulado que as fissuras não sindrômicas são fenotipicamente variáveis e geneticamente heterogêneas, tornando difícil à identificação de genes causadores. Investigação genômica de famílias com fissuras não sindrômicas tem identificado regiões sobrepostas que podem conter loci suscetível às fissuras; diversas dessas regiões têm sido confirmadas em estudos subseqüentes (Marazita et al., 2002; Field et al., 2004; Marazita et al., 2004). Além disso, TGFA, BCL3, MSX1, TGFB3, RARA, IRF6, FGFR1, e CRISPLD2 têm sido implicados em um ou mais estudos de associação e/ou



análise de ligação (Ardinger et al., [1989](#); Chenevix-Trench et al., [1991](#); Stein et al., [1995](#); Lidral et al., [1998](#); Maestri et al., [1997](#); Wyszynski et al., [1997](#); Martinelli et al., [1998](#); Scapoli et al., [1998](#); Wong et al., [2000](#); Blanco et al., [2001](#); Jezewski et al., [2003](#); Mitchell et al., [2001](#); Beaty et al., [2002](#); Murray, [2002](#); Zuccherro et al., 2004; Blanton et al., 2005; Riley et al., 2007; Chiquet et al., 2007).

Durante o crescimento facial, o gene SHH se expressa no ectoderma primordial da face (Jeong et al., 2004). Entretanto, uma mutação nula no *SHH* causa diversas deficiências craniofaciais demonstrando o papel do *SHH* na morfogênese da face. A inibição da sinalização do *SHH* no processo frontonasal de galinhas inibiu o crescimento facial e causou fissura de lábio (Hu and Helms, 1999). Orioli et al. (2002) encontraram cinco diferentes mudanças de base no SHH em recém-nascidos com fissuras orais, todas representaram polimorfismos silenciosos. Nenhuma mutação patogênica foi detectada até agora, neste respectivo gene, em pacientes com fissuras orais não sindrômicas.

## **1.2. Gene Sonic Hedghog (SHH) e sua Via Sinalizadora**

Um aspecto crítico e essencial do desenvolvimento embrionário é a interação instrucional entre as células, por meio da qual uma proteína secretada por um grupo de células altera o padrão de expressão gênica das células adjacentes, em um processo que é claramente sem autonomia celular. Alguns sinais extracelulares de longo alcance, chamados morfógenos, podem elicitar respostas múltiplas, dependendo do seu nível ao longo de um gradiente de concentração. Deste modo, uma célula ou um grupo de células que secrete

um morfógeno pode iniciar vários tipos de programas de desenvolvimento em células vizinhas, dependendo de sua localização ao longo do gradiente do morfógeno. (Thompson & Thompson, 2002).

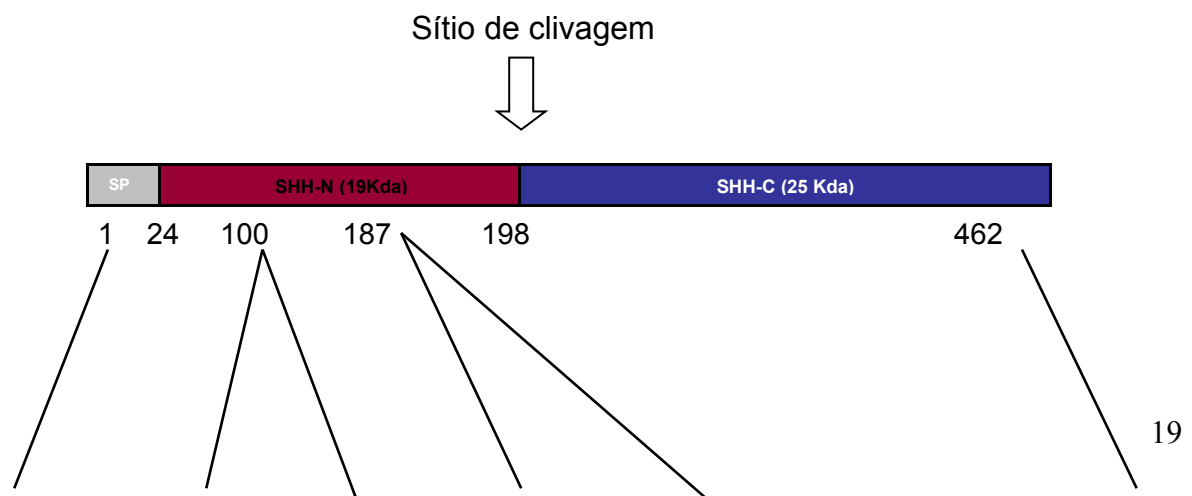
Um dos melhores exemplos de genes que secretam um morfógeno desenvolvimental é o gene *hedgehog*, originalmente descoberto em *Drosophila* e assim denominado por sua capacidade de alterar a orientação das cerdas epidérmicas. A difusão da proteína *hedgehog* cria um gradiente no qual concentrações diferentes da proteína fazem com que não apenas as células vizinhas, mas também células distantes da origem de transcrição assumam destinos diferentes (Seppala, 2007). Diferentemente de um gene *Hedgehog* encontrado em *Drosóphilas* (*Hh*), três genes *Hedgehog* identificados em camundongos são encontrados em vertebrados . Desses incluem o gene *Desert hedgehog* (*Dhh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*), e o *Sonic Hedgehog* (*Shh*) (Cohen, 2003).

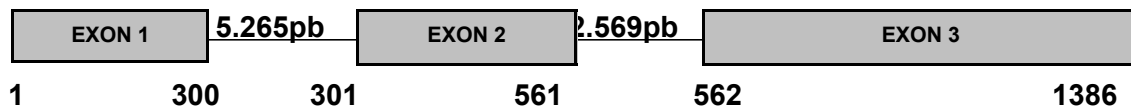
Nos humanos vários genes intimamente relacionados a *hedgehog* de *Drosophila* também codificam morfógenos desenvolvimentais. Um exemplo é o gene homólogo *Sonic Hedgehog* (*SHH*). Embora os programas específicos controlados por *hedgehog* em *Drosophila* sejam bem diferentes dos controlados por seus homólogos nos mamíferos, os temas subjacentes são muito similares (Thompson & Thompson, 2002).

*Shh* é uma proteína secretora que tem um importante papel em muitos aspectos no desenvolvimento embrionário precoce. A sinalização do gene *SHH* é conhecida por ser importante para o desenvolvimento normal da linha média facial (Belloni, 1996) e por estar envolvida em numerosos eventos chaves de desenvolvimento durante a embriogênese, incluindo a estabilização do eixo

direito-esquerdo, o padrão dorsoventral do tubo neural, o desenvolvimento craniofacial, o desenvolvimento do cérebro, da pituitária, dos membros e da ectoderme, entre outros. Esse respectivo gene se expressa como uma proteína sinalizadora na notocorda e células da placa neural tendo como função primordial a regulação dos centros organizadores do prosencéfalo e rombencéfalo (Roessler a Muenke, 2003). Segundo Seppala, et al. (2007) a transcrição de *Shh* demonstra um domínio muito específico de expressão temporoespacial no primórdio craniofacial. Em camundongos foi observado que o gene *Shh* é expresso dentro do sistema nervoso central, no mesenquima do assoalho da placa neural, neuroectoderme do mesencéfalo, do diencéfalo e ectoderme facial do processo frontonasal (Helms et al. 1997).

O gene *SHH* foi mapeado na região 7q36 do cromossomo humano. Ele possui uma estrutura genômica simples, sendo constituído por 3 exons que codificam um polipeptídeo com 462 aminoácidos. (Munke e cols., 1995). O terceiro exon é o mais extenso e possui uma região muito rica de bases guanina e citosina (Belloni et al., 1996). Uma representação do gene e da proteína do gene *SHH* esta ilustrada na Figura 1.



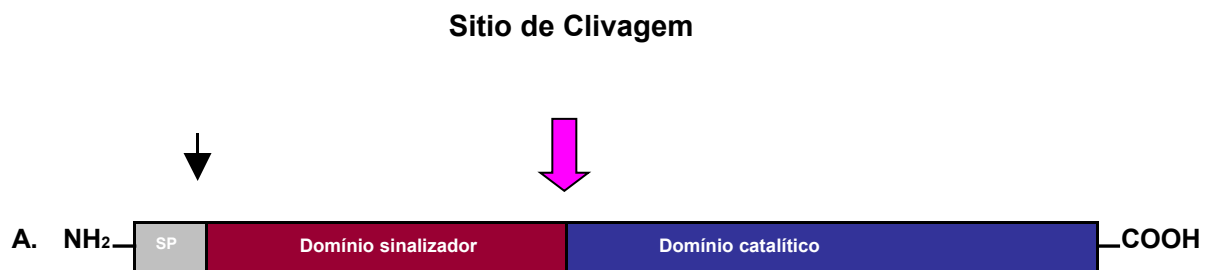


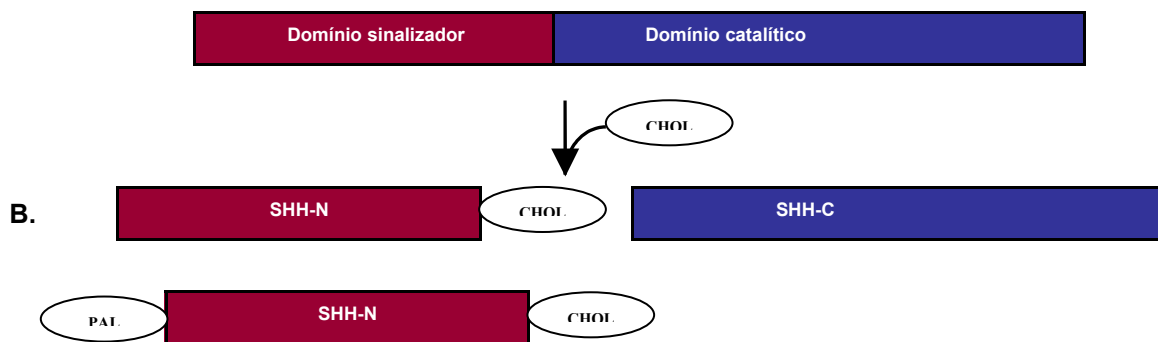
**Figura 1: Estrutura do gene e da proteína Shh (GenBank: NT\_007741). A proteína contém um domínio de sinalização aminoterminal (SHH-N) e um domínio de autoprocessamento carboxi-terminal (SHH-C). Sítio de clivagem autocatalítica está localizado entre os aminoácidos Glicina 197 e Cisteína 198 da proteína SHH humana.**

A proteína é sintetizada como uma molécula precursora composta por dois domínios: N-terminal (SHH-N) e por um domínio C-terminal (SHH-C). Os primeiros 23 aminoácidos da proteína, os quais representam o peptídeo de sinal, são perdidos. Entre os aminoácidos 197 e 198 ocorre uma clivagem autocatalítica (Figura 1), separando a porção amino-terminal da proteína (SHH-N), a qual é altamente conservada da porção carboxi-terminal (SHH-C), mais divergente entre as espécies (Nanni et al., 1999).

O domínio SHH-N corresponde ao domínio sinalizador da proteína. O domínio SHH-C é responsável pela autoclivagem da molécula, proporcionando assim a ligação de uma molécula de colesterol no último carbono de SHH-N. A ligação covalente do colesterol em SHH-N é essencial para a ativação desta porção sinalizadora, sendo posteriormente, a porção catalítica SHH-C, difundida pelo meio extracelular (Figura 2) (Porter et al., 1996).

Após a reação de autoprocessamento, ocorre a palmitoilação que consiste na ligação de um grupo palmitato na cisteína mais aminoterminal da porção sinalizadora SHH-N. Este processo requer a ação da enzima aciltransferase Skinny hedgehog (Ski) (Figura 2) (Chamoun et al., 2001). A ligação do colesterol e do palmitato possui a função de ancorar a porção sinalizadora de SHH nas membranas celulares. No entanto, a sinalização se estende em muitas células através de sua origem, e a ação de longo alcance do *SHH* depende do Dispatched (Disp) que libera a proteína Shh das membranas celulares (Ma et al., 2002).





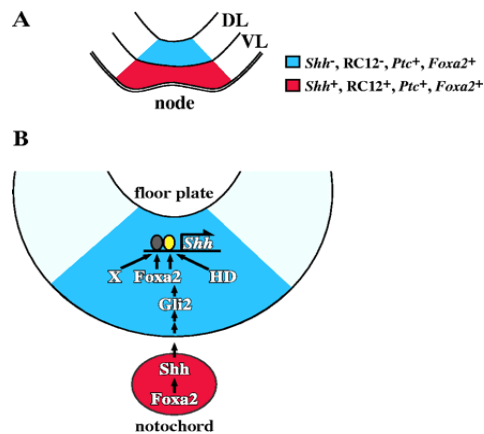
**Figura 2:** (A) Autoprocessamento da proteína Shh a partir de seu precursor. SP: Peptídeo de sinalização encontrado na molécula precursor; ↓ Sítio de clivagem autocatalítica da proteína; (B) SHH-N: Domínio de sinalização que irá se ligar ao colesterol modificado pelo domínio carboxi-terminal; SHH-C: Domínio de clivagem autocatalítica e de modificação do colesterol. A adição de um palmitato (PAL) ao domínio SHH-N é crítica para a atividade sinalizadora. Seguindo a adição do colesterol, a palmitoilação requer a ação da aciltransferase Skinny hedgehog (Ski) (Cohen 2006)

O gene *SHH* também apresenta uma região altamente conservada no intron 2. Esta região é composta por 88 pares de base, e representa importantes sítios de ligação, incluindo o sitio de ligação Foxa2 (Figura 3). Estudos funcionais em ratos indicaram que esta região pode ter função reguladora no desenvolvimento da placa neural. O estabelecimento do assoalho da placa na linha media ventral do sistema nervoso central (SNC) depende de um processo de sinalização mediado pela proteína Shh. Em um esquema proposto por Jeong e Epstein, a proteína Gli2, respondendo a sinalização de Shh, ativa a expressão de Foxa2 na placa neural. Foxa2, em

cooperação com uma proteína hemodomínio e com pelo menos um outro ativador transcricional, se liga a elementos regulatórios de Shh e estimula a transcrição deste no assoalho da placa neural (Figura 4) (Jeong e Epstein, 2003).



**Figura 3:** Região reguladora localizada no intron 2 do gene *SHH*, mostrando ser bastante conservada entre camundongo, humano e galinha. Presença de quatro sítios de ligação, TATA box, Foxh1, T-box e Foxa 2, indicam a importância desta região na regulação gênica (modificado de Jeong e Epstein, 2003).



**Figura 4:** Esquema proposto por Jeong e Epstein mostrando a proteína Gli2, respondendo a sinalização de Shh, ativa a expressão de Foxa2 na

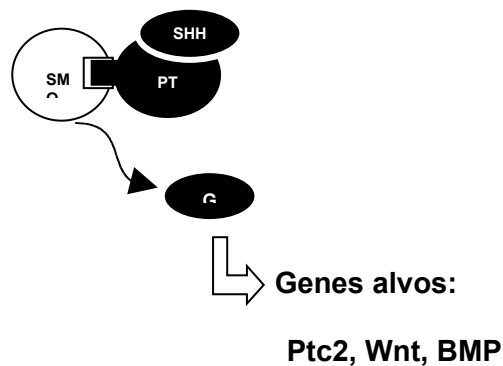
**placa neural. Em coordenação com outra proteína hemodomínio (HD) e com pelo menos um outro ativador transcricional (X), Foxa2 se liga a elementos regulatórios de Shh (representados em amarelo e cinza) e estimula a transcrição deste no assoalho da placa neural (modificado por Jeong e Epstein, 2003).**

A versatilidade do gene *SHH* é refletida em uma complexa via sinalizadora, com único mecanismo de geração, distribuição, recepção, e transdução intracelular de sinais (Ingham et al., 2001). A recepção de células alvo é mediada via interação direta com a proteína transmembrana Patched1 (Ptc1). Em estado de repouso, Ptc1 inibe a transdução, a qual é apenas liberada pela ligação da proteína ligante Shh (Stone et al., 1996). O início da sinalização de Shh ocorre quando este se liga ao receptor de membrana Ptc, que por sua vez interage com a proteína Smoothed (Smo). Normalmente Ptc inibe Smo. Após a ligação do Shh com Ptc, Smo é liberado da ação inibitória de Ptc, e a cascata de sinalização que ativa os genes alvos de Shh é iniciada (Figura 5). Destes genes alvos podemos citar os genes PTC, WNT e o gene BMP que em vertebrados tem se mostrado importante em muitos processos desenvolvimentais tais como na diferenciação, polarização, migração e proliferação celular, e na diferenciação de muitos tecidos adultos (Taipale and Beachy, 2001). Em vertebrados, a sinalização é mediada principalmente via fatores de transcrição Gli (Gli1-Gli3) através de um complexo de mediadores intercelulares. Gli2 e Gli3 funcionam ambos como ativadores e repressores e são os principais transdutores da atividade sinalizadora de Shh (Bai, et al. 2004 e Bai, et al. 2002). Gli1 é o único ativador e alvo específico da transdução de



Shh, mas desempenha um papel secundário na sinalização. Os eventos precisos que medeiam a recepção da proteína Shh na superfície das células ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, várias outras proteínas associadas a membrana celular tem sido destacadas por possuírem a capacidade de se ligarem a proteína secretada por *SHH* e regular sua cascata sinalizadora em vertebrados. Destas pode-se citar Megalin, uma lipoproteína receptora de baixa densidade, a Ig/Fibronectina tipo III que repete o domínio transmembrana das proteínas Cdo e Boc (Cohen, 2003; McCarthy, 2002), e a glicoproteína de membrana codificada pelo gene Gas1 (Seppala, 2007).

Recentemente foram identificados outros sítios de expressão do *SHH* durante o desenvolvimento do SNC, referentes à especificação dos oligodendrócitos, proliferação de precursores celulares e no controle do crescimento axonal (Marti e Bovolenta, 2002).



**Figura 5: Via sinalizadora de *SHH***

Mutações nulas no gene *SHH* em humanos causaram deficiências craniofaciais severas que levaram a avaliação do papel deste na morfogênese

facial (Chiang et al, 1996). Hu e Helms, 1999 demonstraram que a inibição da sinalização do Shh no crescimento do processo frontonasal de galinha com a função de bloquear anticorpos inibe o crescimento facial e causa fissura de lábio. Também demonstraram que Shh pode regular a proliferação do mesenquima facial uma vez que a aplicação ectópica da proteína Shh ao processo frontonasal causou expansão mediolateral daquele tecido. Ahlgren e Cronner-Fraser (1999) mostraram que a inibição do Shh no mesenquima cranial causou a morte celular do mesenquima da crista neural. Esses dados indicam que a sinalização do Shh é necessária para a sobrevivência do mesenquima facial. A inativação tecido específica Smo na crista neural confirma que a sinalização do Shh é necessária tanto para a sobrevivência quanto para a proliferação do mesenquima facial (Jeong et al., 2004).

A perda da sinalização de Shh durante estágios tardios da morfogênese craniofacial produz um colapso na linha media facial e condições conhecidas como hipotelorismo, onde o espaço entre os olhos é reduzido. Interrupção na sinalização de Shh no processo frontonasal ou processo maxilar leva a interrupção de seus crescimentos, resultando em fissuras entre o primórdio. Esses defeitos são análogos à fissura de lábio e/ou palato em humanos. O excesso de SHH-N leva a hipertelorismo. Em casos severos, excesso de SHH-N na linha media do desenvolvimento facial resulta na formação de estruturas ectópicas superiores semelhantes a um “bico”. Juntos, esses dados indicam que *SHH* é um gene crítico e sugere que perturbações no mesmo, ou em genes alvos, são prováveis fundamentos para a extensão das anomalias craniofaciais (Hu and Helms, 1999).

Desde 1996 está demonstrado que mutações no gene Sonic Hedgehog são responsáveis pela HPE3 (Belloni et al., 1996; Roessler et al., 1996), uma forma autossômica dominante de HPE ligada a marcadores 7q36. A descoberta do gene *SHH* humano como o primeiro gene causador da HPE levou ao conhecimento de outros genes potenciais para HPE, alguns dos quais pertencentes à via de sinalização do próprio *SHH*. Por exemplo, os co-receptores humanos para *SHH*, *Patched (PTC)* e *Smoothed (SMO)* foram clonados e são genes candidatos para HPE. O gene *PTC* humano é um gene supressor tumoral no qual a perda da função causa a síndrome Gorlin ou síndrome do nevus de células basais. Acredita-se que mutações gerando um ganho da função do *PTC* ou perda da função do *SMO* podem levar ao desenvolvimento de anomalias tais como as vistas em HPE (Roessler and Muenke, 1998).

## **2. OBJETIVOS**

O gene *SHH* codifica uma proteína importante para o desenvolvimento embrionário inicial. Mutações neste gene e em genes envolvidos em sua via sinalizadora resultam em vários fenótipos incluindo, principalmente, as anomalias craniofaciais. O objetivo central desse trabalho foi:

1. Determinar se o gene *SHH* desempenha um papel nas fissuras orais não-sindrômicas, e nas anomalias craniofaciais da linha média com ou sem

envolvimento do sistema nervoso central, incluindo as Holoprosencefalias e as Displasias Frontonasais.

2. Oferecer informação atualizada e orientação adequada ao paciente, seus familiares e profissionais que estejam envolvidos com a reabilitação, particularmente no grupo das malformações complexas da linha média do SNC dado o desconhecimento destas condições dentro da classe médica geral.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Amostra Biológica**

Analizamos um total de 136 amostras de DNA de pacientes provenientes de diversas regiões do Brasil os quais foram atendidos no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-USP/Bauru) e concordaram em participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre de Esclarecimento (Anexo 1) previamente aprovado pelo comitê de ética (Anexo 2).

Os indivíduos participantes deste trabalho foram avaliados por profissionais do setor de Genética Clínica do HRAC-USP/Bauru, e os dados clínicos da amostra obtidos através do sistema informatizado Gandhi, presente nesta mesma seção, e pela análise de prontuários.

Os pacientes com anomalias craniofaciais foram divididos em dois grupos: 1) 90 pacientes com fissura de lábio e/ou palato isolada e 2) 46

pacientes com anomalias faciais associadas ou não a defeitos de linha média do sistema nervoso central (Tabela 2). Foi coletada uma amostra de 2ml de sangue periférico de cada paciente e seus familiares (quando pertinente) a qual foi destinada à análise molecular.

O grupo controle foi composto por 100 amostras de DNA de indivíduos não portadores de quaisquer anomalias, os quais também assinaram o termo de consentimento.

**Tabela 2. Número de pacientes analisados e respectivos diagnósticos.**

<b>Diagnóstico</b>	<b>Numero de casos</b>
Holoprosencefalia	37
Displasia frontonasal	9
Fissuras orais não sindrômicas	90
<b>TOTAL</b>	<b>136</b>

### **3.2. Análise de mutações do gene *SHH***

#### **3.2.1. Extração do DNA**

O DNA genômico foi extraído de sangue total utilizando-se o kit Gentra® para extração de DNA de acordo com o protocolo.

#### **3.2.2. Amplificação do gene *SHH***

A região codificadora do gene *SHH*, composta por 3 exons, foi amplificada em 4 amplicons sendo o terceiro exon dividido em 2 amplicons : 3ab e 3c. Para todos os amplicons foi usado o mesmo protocolo de amplificação. O “*PCR Enhancer Kit*” (Invitrogen, CA) composta de Tampão 10X, MgSO<sub>4</sub> e solução *Enhancer* (o que potencializou a reação) também foi usado em todas as reações de amplificação deste gene.

A amplificação dos quatro amplicons foi realizada em um volume final de 35µl contendo: 1× PCR de tampão de amplificação (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5× PCR Solução Enhancer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 20ng DNA/ ul; 200 uM de cada trifosfato de desoxirribonucleotídeos (dNTP); 0.25-10 uM de cada primer e 0.02U Taq polimerase/ ul. Somente para o amplicon 3c foi utilizado DMSO 10%.

(volume final da reação= 35µl)

Tampão 10 X	3,5 µl	(parte do “PCR Enhancer Kit” da Invitrogen, CA)
Enhancer	1,75 µl	(parte do “PCR Enhancer Kit” da Invitrogen, CA)
MgSo4 ( 50mM)	1 µl	(parte do “PCR Enhancer Kit” da Invitrogen, CA)
dNTP (100nM)	0,3 µl	( Amersham Biosciences, NJ)
Iniciadores F (20pmol)	1 µl	(Invitrogen, CA)
Iniciadores R ( 20pmol)	1 µl	(Invitrogen, CA)
Taq (5U/ l )	0,5 µl	(AmpliTaq from Applied Biosystems, Roches)

As seqüências dos primers descritas anteriormente por Roessler et al., 1996 (amplicons 1 e 2), Roessler et al., 1997 (amplicon 3ab) e Nanni et al., 1999 (amplicon 3c) e o tamanho dos amplicons em pb estão descritos na tabela 3.

As condições de amplificação para os exon 1, 2 e 3ab foram as mesmas. Para o exon 3C essas condições tiveram que ser adaptadas:

Condições de amplificação para os exons 1, 2 e 3ab:

95 C ----- 4min	
95 C ----- 30 seg	} 35 ciclos
<b>60 C</b> ----- 30 seg	
72 C ----- --1 min	
72 C ----- 7 min	

Condições de amplificação para o exon 3c:

95 C ----- 4min	
95 C ----- 30 seg	} 35ciclos
<b>72 C</b> ----- 30 seg	
73 C ----- --1 min	
72 C ----- 7 min	

**Tabela 3. Seqüência dos primers usados para amplificar as regiões codificantes do gene *SHH*. Os iniciadores usados neste estudo foram os mesmo publicados previamente (Roessler et al., 1996, Roessler et al., 1997a e Nanni et al., 1999). A estratégia de amplificação do *SHH* foi**

modificada por El-Jaick (tese de doutorado, 2005) a fim de obter um numero menor de amplicons e otimizar o estudo deste gene. As temperaturas utilizadas no dHPLC também estão descritas abaixo.

Iniciador	Seqüência dos iniciadores	Amplicon	Temp ( C) dHPLC	Região amplificada
SHH-Ex1 (1F1 / 1R1)	5´CAGCCAGCGAGGGAGAGAGCGAGCGGGCGA 3´ 5´TAAGTCTGGAAGTGTTCCGGCTTCTC 3´	520	61 / 64	SHH exon 1
SHH-Ex2 (2F2 / 2R1)	5´GGCAGGCTGATGGAGGGGCCGGGA 3´ 5´AAAGCAGTCATGCCCAGCGACCCCTGC 3´	475	62.5 / 64.5	SHH exon 2
SHH-Ex3ab (3F1 / 3R1)	5´CCTCCCTCTCGGAACTCAATGCCCTGTC 3´ 5´CGAGCGTGACGGGGACCGCCGGCT 3´	476	68 / 69	SHH exon 3 (1ª. parte)
SHH-Ex3c (3F3 / 3R3)	5´GCCCAGGGCCAGCGCGTGTACGTGG 3´ 5´GAAGCCGGGGGGCCGGGGGAGGGG 3´	483		SHH exon 3 (2ª. parte)

### 3.2.3. Método dHPLC (“Denaturing high performance liquid chromatography”)

Parte da reação de PCR (10-15µl) foi usada para a busca por mutações através do método dHPLC e o restante foi utilizado para seqüenciamento direto nos casos onde foi identificado um gráfico diferente do tipo selvagem ou que não apresentavam resultados muito claros.

O método dHPLC tem como princípio a identificação de mutações em heterozigose baseada nos diferentes comportamentos de desnaturação de homoduplexes e heteroduplexes, onde os amplicons que possuem uma ou mais bases não pareadas corretamente apresenta-se desnaturados primeiro quando comparados com os homoduplexes. Assim, parte do produto da PCR (10-15 µl) foi utilizada no método dHPLC submetendo-se este produto a um resfriamento gradual : 95°C por 1 min, seguido de 1°C a menos por 1 min, até chegar ao limite de 60°C, o que correspondeu a 35 ciclos. Após esta desnaturação gradual, o produto foi mantido a +4.



A análise mutacional por método dHPLC foi realizada utilizando-se um sistema WAVE (Trangenomic, NE), como descrito por Kuklin et al. (1997). As temperaturas utilizadas para a análise foram teoricamente determinadas pelo programa de computador dHPLC Melt software. Duas temperaturas foram escolhidas para análise de cada amplicon e estão descritas na Tabela 2. Essa análise foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP, SP.

Todos os amplicons, que mostraram resultados diferentes do tipo selvagem ou aqueles que apresentaram resultados não muito claros na análise através do método dHPLC, foram purificados utilizando-se kits de purificação comercializados pela Quiagen, CA, ou por um protocolo de purificação de produto de PCR “*in house*”. Esse protocolo consiste na adição de etanol 95% a 4°C na proporção de 20 para 80 em um tubo de 1000µL. Em seguida, o material é mantido por duas horas a uma temperatura de -20°C. A centrifugação é feita a 13000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante é retirado cuidadosamente e adicionado 250µL de etanol 70% (diluído no momento do uso). Centrifugar novamente a 13000 rpm por 15 minutos. Logo após a centrifugação o sobrenadante é retirado e o “*pelet*” posteriormente é seco no Termo Bloco a 90°C por 2 minutos destampado. Logo após a secagem o DNA é ressuspendido em 10-30µL de água mili-Q (dependendo da intensidade da banda inicial). As amostras foram acondicionadas em freezer -20°C até o uso.

#### **3.2.4. Seqüenciamento do DNA**

Após a purificação foi realizado o sequenciamento direto do DNA. Esta etapa do trabalho foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP, SP. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o [protocolo](#) para o sequenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare) utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código [US81090](#). Os cromatogramas das seqüências resultantes foram analisados nos programas *Chromas*: [www.technelysium.com.au/chromas.html](http://www.technelysium.com.au/chromas.html) e *BioEdit*: [www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html).

### 3.2.5. Análise das variantes encontradas pelo seqüenciamento

Cada mutação identificada no sequenciamento foi confirmada repetindo-se a reação de sequenciamento de um novo produto de PCR. Elas também foram investigadas em 100 controles normais através da técnica de dHPLC.

Para identificar se as alterações encontradas representavam polimorfismos foi realizada uma pesquisa no site [www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html).

As variantes encontradas foram também analisadas pelo programa **PolyPhen** (=Polymorphism *Phenotyping*) o qual prediz o impacto da substituição de um aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana usando considerações físicas e comparativas claras. Este software foi encontrado no site: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>.

Para determinar se as variações patogênicas encontradas alteravam algum sitio específico de ligação da proteína codificada por SHH (**SF2/ASF**,

**SF2/ASF (IgM-BRCA1), SC35, SRp4, SRp55)** com outras proteínas foi utilizado o programa **ESEfinder** (site: <http://rulai.cdhl.edu>).

A análise comparando uma pequena sequência da proteína Shh com a de algumas espécies, selecionadas pelo programa de computador, visando observar a conservação dos aminoácidos envolvidos na mutação de sentido trocado foi realizada através do programa **UCSC Genome Bioinformatics** ([www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)).

## **4. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

### **4.1. Versão em Inglês**

#### **4.1.1. MUTATIONAL ANALYSIS OF THE SONIC HEDGEHOG (*SHH*) GENE IN INDIVIDUALS WITH NON-SYNDROMIC ORAL CLEFTS**

<sup>1,2</sup> Claudia Danielli Pereira Bertolacini, <sup>1</sup>Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

<sup>1</sup>Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Department of Genetics, USP/Bauru, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista, Department of Genetics, UNESP/Botucatu, Brazil

Running title: SHH analysis in oral cleft nonsyndromic

Correspondence to: Lucilene A Ribeiro-Bicudo. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, USP/Bauru. Rua Sílvio Marchione, 3-20, Bauru, SP, Brazil. Phone: 55 (14) 32358412. [lubicudo@centrinho.usp.br](mailto:lubicudo@centrinho.usp.br)

## ABSTRACT

Oral cleft such lip with or without cleft palate (CLP) are common birth defect more often observed as an isolated malformation, been called of cleft nosyndromic .It has been postulated that the oral cleft is phenotypically variable and genetically heterogeneous so as to complicate the identification of causative genes. The Sonic Hedghog (*SHH*) gene encodes a signaling molecule that plays a central role in the developmental patterning of the

nervous and skeletal systems. It is involved in numerous key developmental events during embryogenesis, including left-right axis establishment, dorsoventral patterning of the neural tube, endoderm development, limb and craniofacial development, brain and pituitary development, among others. In the current study, we performed mutational analysis in 90 individuals with oral cleft non-syndromic in order to determine if *SHH* gene has a role in human oral clefts. No variants were found in these samples.

Key words: *SHH*, mutation, non-syndromic oral clefts

## **INTRODUCTION**

Cleft of lip and/or cleft palate (CLP) is a common birth defect found in more than 300 recognizable syndromes, but more often is observed as an isolated birth defect, called non-syndromic cleft lip and/or cleft palate (NSCLP). Its birth prevalence ranges from 1/700 to 1/1000, depending on geographical origin, with populations of Asian and Native American ancestry having the highest rates and African population the lowest (Mossey and Little, 2002).

It has been postulated that NSCLP is phenotypically variable and genetically heterogeneous so as to complicate the identification of causative genes. Genomic screens of multiplex NSCLP families have identified a number of overlapping regions that may harbor clefting susceptibility loci; several of these have been confirmed in subsequent studies (Marazita et al., 2002; Marazita et al., 2004; Blanton et al., 2005). In addition, TGFA, BCL3, MSX1, TGFB3, RARA, IRF6, FGFR1, and CRISPLD2 have been implicated in one or more association and/or linkage analysis (Ardinger et al., 1989; Chenevix-Trench et al., 1991; Stein et al., 1995; Lidral et al., 1997, 1998; Maestri et al., 1997; Wyszynski et al., 1997; Martinelli et al., 1998; Scapoli et al., 1998; Wong et al., 2000; Blanco et al., 2001; Jezewski et al., 2003; Mitchell et al., 2001; Beaty et al., 2002; Murray, 2002; Zuccherro et al., 2004; Blanton et al., 2005; Riley et al., 2007; Chiquet et al., 2007).

Like isolated clefts, CLP syndromes have been noted for their variability in presentation of labiopalatine defects, alluding to the possibility that these syndromal CLP genes contribute to the incidence of isolated CLP. The Sonic Hedgehog (*SHH*) gene encodes a signaling molecule that plays a central role in the developmental patterning of the nervous and skeletal systems (Ingham and McMahon, 2001). It is involved in numerous key developmental events during embryogenesis, including left-right axis establishment, dorsoventral patterning of the neural tube, endoderm development, limb and craniofacial development, brain and pituitary development, among others (Roessler and Muenke, 2003). During facial outgrowth, *SHH* is expressed in the ectoderm of the facial primordium (Jeong et al., 2004). Whereas a targeted null mutation in *SHH* gene caused severe cranial deficiencies. Inhibition of SHH signaling in the outgrowth

chick frontonasal process with a function blocking antibody inhibited facial outgrowth and caused cleft lip (Hu and Helmes, 1999). Mutations in *SHH* can lead to holoprosencephaly (HPE), a condition characterized by severely reduced brain size, fusion of the two forebrain hemispheres and defects of craniofacial elements. CLP is associated with autosomal dominant HPE due to *SHH* mutation (Nanni et al., 1999). In the current study, we performed mutational analysis in 90 individuals with oral cleft in order to determine if *SHH* has a role in human oral clefts.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

We studied 90 patients clinically diagnosed with oral cleft no syndromic by a clinical geneticist. All the probands were ascertained at “Hospital of Rehabilitation of Craniofacial Anomalies”, Bauru/SP, Brazil. Blood sample were obtained from all individual after signature of the Consent Term.

### **Molecular Analysis**

Genomic DNA was extracted from the whole blood by routine methods. Mutational analysis was performed for coding region and exon-intron boundaries of *SHH* gene (*Ensembl*: **OTTHUMG00000023664**). The primers used to screen *SHH* have been described (El-Jaick et al., 2007). PCR amplifications were performed in a 35  $\mu$ L reaction mixture, using 20ng of DNA/ul template, 1 $\times$  PCR Amplification Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5 $\times$  PCR

Enhancer solution (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 μM of each dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 0.25-10 μM of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 0.02 U of Taq DNA polymerase/ ul (Applied Biosystems, Foster City, CA). In the reaction of the second part of exon 3 (exon 3c) was added DMSO 10%. The PCR cycling parameters used for amplification were 95°C for 4 min followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 7 min. The annealing temperature to the exon 3c was used 72°C for 30s and 73°C for 1 minute to addition of dNTPs. The PCR cycling parameters used for amplification were 95°C for 4 min followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 7 min. The annealing temperature for exon 3c was 72°C for 30s, and the extension temperature was 73°C for 1 minute. Denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) analysis was performed using the Transgenomic WAVE system ([www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)), as described by Kuklin et al. 1998. Heteroduplexes were formed by denaturing at 95°C and cooling by 1°C per minute. Samples showing abnormal dHPLC profiles were analyzed by direct sequencing using the DYEnamic ET Dye Terminator Kit and MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare).

## **RESULTS**

Among the 90 patients studied, there were 18 individuals with cleft palate only (CP), 23 with cleft lip only (CL), and 49 with cleft lip and palate (CLP). The dHPLC analysis did not show any abnormal profile but eleven samples were not clear and were sequenced.



No variants were found in these samples.

## **DISCUSSION**

It is clear that growth and morphogenesis of the facial primordial have to be exquisitely coordinated to develop the intact face. Because most of the craniofacial mesenchyme is derived from neural crest cells, genes and molecular pathways regulating neural crest formation, migration, patterning, proliferation, and apoptosis, are all important for craniofacial development.

Cleft lip and/or cleft palate (CLP) is a common craniofacial malformation with a variable birth incidence between different kinds of population. It primarily results from failure of fusion of the fronto-nasal and maxillary prominences during gestational week 7 with failure of palatal shelves fusion possibly occurring as a secondary defect during gestational week 8.

The search for the cause of CLP is extremely complex, involving multiple techniques that have been used to identify proximally 30 candidate genes in which disruption results in different types of clefting (Schutte & Murray, 1999).

The loss of Shh activity in the mouse has a profound effect on patterning of embryonic face development, causing cyclopia and severe disruption of facial structures (Chiang et al., 1996). The use of a combination of surgical and molecular experiments in a chick system showed that transient loss of a SHH signaling in the embryonic face led to defects analogous to oral clefts in humans (Hu and Helms, 1999). Because of that we decided to analyze the *SHH* gene in patients with oral cleft.

In the present work we did not find any variant in the *SHH* gene in all this patients non-syndromic with oral cleft. This is the second report of *SHH* analysis in patients with this malformations. The first one (Orioli et al. 2002) found 15 variants bands in 13 patients with oral cleft, representing five different bases changes, all of which were found as silent polymorphisms. Since we did not find any variant in 90 patients with non-syndromic oral cleft, and based on the results by Orioli et al. (2002) we suggest that mutations in *SHH* gene do not play a role in the non-syndromic oral clefts but further studies with others candidates genes, including the ones that belong to the SHH pathway, must be performed to elucidate of etiology of this craniofacial malformations.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and families who participated in the research. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (06/60973-9).

#### **4.1.2. ANALYSIS OF SONIC HEDGEHOG (*SHH*) GENE IN BRAZILIAN PATIENTS WITH FRONTAL NASAL DYSPLASIA**

<sup>1,2</sup> Claudia Danielli Pereira Bertolacini, <sup>1</sup>Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

<sup>1</sup>Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Department of Genetics, USP/Bauru, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista, Department of Genetics, UNESP/Botucatu, Brazil

Running title: SHH mutation analysis in Frontonasal Dysplasia

Correspondence to: Lucilene A Ribeiro-Bicudo. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, USP/Bauru. Rua Sílvio Marchione, 3-20, Bauru, SP, Brazil. Phone: 55 (14) 32358412. lubicudo@centrinho.usp.br

## **ABSTRACT**

Frontonasal dysplasia appears to be a nonuniform malformation complex consisting of craniofacial development alterations that result in mild to very severe defects. The cause is unclear but most cases are sporadic. The Sonic Hedgehog gene (*SHH*) is expressed in the developing notochord and neural tube floorplate and plays an important role in the development of both the midline CNS/craniofacial region and the limbs. With the objective

to check if the SHH plays a role in frontonasal dysplasia (FND) we performed mutational analysis in 5 individuals with frontonasal dysplasia isolated and in 4 individuals with frontonasal dysplasia associated with another

malformations such acromegaly (AFND) and spectrum oculo-auriculo-vertebral (FNDOAV). No pathogenic variant was found. In the patient with AFND was found a know single nucleotide polymorphism (SNP) in the position 630 (C>T) which do not lead to the change of amino acid (p.G192G). This is the first relate of *SHH* gene analysis in patients with isolated FND, and the data obtained do not show the involvement this gene in the etiology of isolated FND, FNDOAV and AFND malformations.

Key words: frontonasal dysplasia, SHH, mutation analysis

## **INTRODUCTION**

Frontonasal dysplasia (FND) is an unusual developmental anomaly of the craniofacial region of unknown etiology, typically with a sporadic occurrence; however, it can show a familial pattern (Sedano et al, 1970). Clinically, it is characterized by orbital cranium bifidum occultum, hypertelorism, as well as broad nasal root (Guion-Almeida and Richieri-Costa, 1996; Gorlin et al., 2001). The FND can be occur isolated or it may be seen as part of clinical spectrum of different syndromes, such as syndrome Oculo-auriculo-vertebral (OAV) (OMIN 601452), craniofrontonasal syndrome (CFNS) (OMIN 304110), acromelic frontonasal dysplasia (AFND) (OMIN 603671) and other most rare condiction.

Up to now there is no evidence of any particular gene involved in etiology of FND isolated, however, Hu e Helms (1999) showed that the excess of *Shh* in chickens lead to a mediolateral widening of the frontonasal process and a widening between the eyes, resulting in hypertelorism. The authors suggested that *SHH* gene is essential for morphogenesis of the frontonasal and maxillary processes. The *SHH* gene is expressed in the developing notochord and neural tube floorplate and plays an important role in the development of both the midline CNS/craniofacial region and the limbs (Roelink et al., 1994; Johnson and Tabin, 1997). In human, the haploinsufficiency of *SHH* may leave to holoprosencephaly, that is a congenital malformation characterized by incomplete cleavage of the cerebral hemispheres into distinct right and left halves. Study with mice knockout to *Shh* gene (*shh*<sup>-/-</sup>) showed that these have not only extreme holoprosencephaly (HPE), but also acro- and meso-melic limb defects, more severe in the hindlimbs (Chiang et al, 1996). In present study, was analyzed the *SHH* gene in individuals with FND isolated or associated to other anomalies

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

We study 9 individuals with FND, which were ascertained by the Hospital of Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, Bauru/SP, Brazil. Patients were evaluated by clinical geneticist and the criteria used for inclusion in the present study were the presence of hypertelorism, widow's peak, cranium bifidum

occultum, and broad nasal root. . Blood sample were obtained from all individual after signature of the Consent Term.

## **Molecular analysis**

Genomic DNA was extracted from the whole blood by standard methods. Mutational analysis was performed for coding region and exon-intron boundaries of *SHH* gene (*Ensembl*: **OTTHUMG00000023664**). The primers used to screen SHH have been described (El-Jaick et al., 2007). PCR amplifications were performed in a 35  $\mu$ L reaction mixture, using 20ng of DNA/  $\mu$ l template, 1 $\times$  PCR Amplification Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5 $\times$  PCR Enhancer solution (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 0.25-10  $\mu$ M of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 0.02 U of Taq DNA polymerase/  $\mu$ l (Applied Biosystems, Foster City, CA). In the reaction of second part of exon 3 (exon 3c) was added DMSO 10%. The PCR cycling parameters used for amplification were 95°C for 4 min followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 7 min. The annealing temperature for exon 3c was 72°C for 30s, and the extension temperature was 73°C for 1 minute. The PCR cycling parameters used for amplification were 95°C for 4 min followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 7 min. The PCR products were analysed by Denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) analysis using the Transgenomic WAVE system ([www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)), as described by Kuklin et al. [1998]. Heteroduplexes were formed by denaturing at 95°C and cooling by

1°C per minute. The variation was confirmed by direct sequencing using the DYEnamic ET Dye Terminator Kit and MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE).

## RESULTS

In this sample with 9 patients, 5 presented FND isolated, 3 cases FND associated with OAV spectrum (FNDOAV) and 1 FND associated with acromegalic (AFND) (Table 1). Analysis of *SHH* gene showed pattern of DHPLC altered in only 1 patient (patient 5, exon 3). Sequence analysis revealed that one base change in the position 630 (c.630 C>T) do not predicted to alter the aminoacid (p.G192G). This variation was a known single nucleotide polimorphism (rs9333634).

**Table 1:** Patients analyzed in this current work and their respective diagnostic.

Patients	Diagnostic
1	FND
2	FNDOAV
3	FND
4	FND
5	AFND
6	FNDOAV
7	FND
8	FND
9	FNDOAV

## DISCUSSION

In the present study, we analyzed *SHH* gene in a group of individuals with FND isolated and FND syndromic. Five among nine patients had a classical



FND, displayed isolated type of the malformation with cranium bifidum occultum (lack of the frontal bone in the midline), hypertelorism, and broad nasal root. In this group of patient, no variant was found, suggesting that the *SHH* gene is not related to FND phenotype in these patients. In relation, the syndromic cases present in sample none pathogenic mutation was found in patients with FNDOAV and AFND. The spectrum OAV has a wide phenotypic variation, characterized by ocular abnormalities, ear malformations, and vertebral anomalies. It is etiologically heterogeneous, with autosomal-dominant, autosomal-recessive, and multifactorial inheritance patterns (Manaligod et al., 1999; Josifova et al., 2004). Most cases appear to be sporadic and, up to now, there is not evidence of any particular gene involved in etiology the OAV spectrum. The analysis of the *SHH* in 3 individual with FND associated with OAV spectrum, present in our sample, didn't show this gene involvement within the etiology of this rare phenotype.

There have been several reports of a rare variant of FND in which similar craniofacial anomalies are associated with central nervous system (CNS) malformations and limb defects including tibial aplasia, talipes equinovarus, and preaxial polydactyly of the feet (Verloes et al, 1992; Suelo and Fernandes, 1993). This combination of anomalies has been called "acromelic frontonasal dysplasia" (AFND) (Verloes et al., 1992). Mutants mice, which had compromising of SHH signaling, showed phenotype similar with those found in AFND including preaxial polydactyly and hemimelia primarily affecting the hindlimbs (Knezevic et al., 1997, Chan et al., 1995, Qu et al., 1997). Slaney et al. (1999) suggested that the molecular basis of this condition may be a perturbation of the gene Sonic Hedgehog signaling pathway. However, in the

current study, the analysis of the gene *SHH* in a patient with AFND phenotype detected only a known single nucleotide polymorphism (SNP) in position c.630C>T (rs9333634) which the change base does not lead to the change of amino acid. Other genes related to Sonic Hedgehog signaling pathway could be involved. Among important genes to development craniofacial we can related *GLI3*, which is one of the main target of SHH signal transduction and may regulate *SHH* expression via negative feedback loop. It is also highly expressed in the developing CNS and limb (Marigo et al, 1996). At least two different human brain-limb syndromes are now known to be caused by mutation in *GLI3*: Greig cephalopolysyndactyly (GCPS) (Vortkamp et al., 1991), since it also involves hypertelorism and preaxial polydactyly of the feet; and Pallister-Hall syndrome (Kang et al. 1997), characterized by a combination of hypothalamic hamartoma, central/postaxial polydactyly, and imperforate anus. These are evidences that the *GLI3* gene can play an important role in typical AFND craniofacial anomalies, and its analysis is essential to investigate the etiology of these birth defects.

In conclusion, this is the first report of *SHH* gene analysis in patients with isolated FND, and the data obtained do not show the involvement of this gene in the etiology of isolated FND, FND/OAV and AFND malformations. However, considering the heterogeneous etiology of these malformations, the investigation of *SHH* gene in a superior sample of individuals with isolated and syndromic FND could be useful to elucidate the origin of this atypical condition. In addition, analysis of other genes that belong to its signaling way as, such as *GLI3* could be performed.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and families who participated in the research. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (06/60973-9).

#### **4.1.3. MUTATIONAL ANALYSIS ON SONIC HEDGEHOG (*SHH*) IN PATIENTS WITH SPECTRUM OF HOLOPROSENCEPHALY (HPE)**

<sup>1,2</sup> Claudia Danielli Pereira Bertolacini, <sup>1</sup>Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

<sup>1</sup>Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Department of Genetics, USP/Bauru, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista, Department of Genetics, UNESP/Botucatu, Brazil

Running title: *SHH* analysis in holoprosencephaly

Correspondence to: Lucilene A Ribeiro-Bicudo. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, USP/Bauru. Rua Sílvio Marchione, 3-20, Bauru, SP, Brazil. Phone: 55 (14) 32358412. lubicudo@centrinho.usp.br

## **ABSTRACT**

Holoprosencephaly (HPE) is a malformation sequence that can be associated with midline structures anomalies of the central nervous system and/or face where the cerebral hemispheres fail to separate into distinct left and right halves. SHH is the major gene implicated in HPE. SHH plays a critical role in early forebrain and central nervous system development. SHH is expressed in the human embryo in the notochord, the floorplate of the neural tube, and the posterior limb buds. In the present study we performed mutational analysis of the entire coding region of the SHH gene in 37 unrelated individuals with the HPE spectrum. Four different variants were found including 2 missense mutations and 2 polymorphisms not described. These variants occur throughout the extent of the gene. No genotype-phenotype correlation is evident based on the type or position of the mutations. This study confirms the great genetic heterogeneity of the disease and the difficulty to establish genotype-phenotype correlations.

Key words: *SHH*, mutation, holoprosencephaly

## INTRODUCTION

Holoprosencephaly (HPE) is a common developmental defect affecting both the forebrain and the face. It is characterized by the incomplete separation of the cerebral hemispheres into distinct right and left halves. Three levels of increasing severity are described: lobar HPE, where the right and left ventricles are separated, but with some continuity across the frontal cortex; semilobar HPE with a partial separation, and the most severe form, alobar HPE, with a single brain ventricle and no interhemispheric fissure (Demyer and Zeman, 1963). Another milder subtype of HPE called the middle interhemispheric variant (MIHF) or syntelencephaly, has now been recognized (Barkovich and Quint, 1993). There is a continuous spectrum of abnormal separation of the hemispheres rather than clearly distinct division into these three types of malformation. Richieri-Costa and Ribeiro (2006) reported 22 patients with a holoprosencephaly-like phenotype. Characteristics include an unusually wide and very severe unilateral cleft-lip palate, variability in the expression of other facial anomalies such as single maxillary central incisor, normal magnetic resonance imaging (MRI), and intelligence within the normal range. HPE has a live birth prevalence of 1/16,000, but an incidence as high as 1:250 in

conceptuses, and a worldwide distribution (Roach et al., 1975; Matsunaga and Shiota, 1977). But considering the advances in neuroimaging with magnetic resonance imaging (MRI), children with less severe forms, like the recently described MIHF or lobar forms, who were undiagnosed, should be now identified leading to an increasing prevalence of the disease (Hahn and Plawner, 2004).

The etiology of HPE is complex, with both environmental and genetic factors being implicated. Maternal diabetes, alcohol or drug ingestion, and defects in cholesterol metabolism have all been associated with HPE (Cohen, 1989), while a number of candidate genes have also been identified in humans, including Sonic Hedgehog (*SHH*) (Belloni et al, 1996; Roessler et al., 1997).

*SHH* was the first HPE gene described. It plays a critical role in early forebrain and central nervous system development. Shh is a member of the hedgehog family of vertebrate signaling molecules and is essential for normal development of many regions within the embryo (McMahon et al., 2003). In addition to the expression and functional data demonstrating that Shh plays a key role in forebrain development, *SHH* also mapped to a region on human chromosome 7q36 which is closer to the HPE3 locus (Belloni et al., 1996), making it an excellent candidate gene for HPE. Numerous different heterozygous mutations have been identified in HPE patients and include missense, nonsense, deletion, and frameshift mutations that are located throughout the gene (Cohen, 2006). Mutations in *SHH* are a rare cause for sporadic HPE (3.7%) and account for 17% of familial HPE. In contrast, 37% of HPE families with individuals with structural abnormalities that are part of the HPE spectrum carry *SHH* mutations (Nanni et al., 1999).

In the present study, we performed mutational analysis of the entire coding region and exon-intron boundaries of *SHH* gene in patients presenting a wide phenotypical spectrum of HPE. Among these 37 patients, 4 were identified as having sequence variations. This result provides evidence that mutations in the *SHH* gene can explain some of the sporadic HPE cases.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

We study 37 individuals with spectrum of HPE, which were ascertained by the Hospital of Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, Bauru/SP, Brazil. Patients were evaluated by clinical geneticist and the criteria used for the inclusion in the present study were the presence of microcephalia, hypotelorism, flat nose, hypoplasia premaxillary, median/bilateral cleft lip associated or not to defects within the CNS and other anomalies. Blood sample were obtained from all individual after signature of the Consent Term.

### **Molecular analysis**

Genomic DNA was extracted from the whole blood by standard methods. Mutational analysis was performed for coding region and exon-intron boundaries of *SHH* gene (*Ensembl*: **OTTHUMG00000023664**). The primers used to screen SHH have been described (El-Jaick et al., 2007). PCR amplifications were performed in a 35  $\mu$ L reaction mixture, using 20ng of DNA/ $\mu$ L template, 1 $\times$  PCR Amplification Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5 $\times$  PCR



Enhancer solution (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 μM of each dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 0.25-10 μM of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 0.02 U of Taq DNA polymerase/ ul (Applied Biosystems, Foster City, CA). In the reaction of the second part of exon 3 (exon 3c) was added DMSO 10%. The PCR cycling parameters used for amplification were 95°C for 4 min followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 7 min. The annealing temperature for exon 3c was 72°C for 30s, and the extension temperature was 73°C for 1 minute. The PCR products were analyzed by denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) analysis using the Transgenomic WAVE system ([www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)), as described by Kuklin et al. (1998). Heteroduplexes were formed by denaturing at 95°C and cooling by 1°C per minute. Direct sequencing was performed using the DYEnamic ET Dye Terminator Kit and MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE).

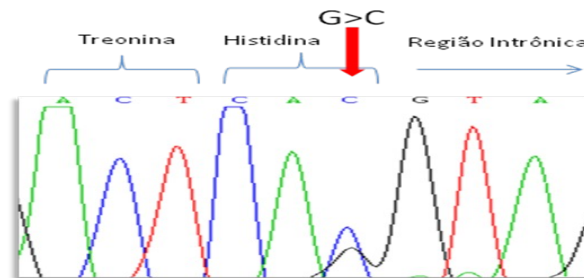
## RESULTS

We performed mutational analysis on the coding region of the *SHH* gene in 37 individuals with HPE. We identified four variants in this gene (Table 1) which were not found in the normal control. Among these four variants, three lead to the amino acid change (missense) and one did not lead to the amino acid substitution (p.L299L).

The variant c.300G>C has been described in a patient with HPE by Odent et al. (1999). This mutation is located in the third base of the last amino acid of exon 1 and resulted in the substitution of the glutamine by the histidine amino

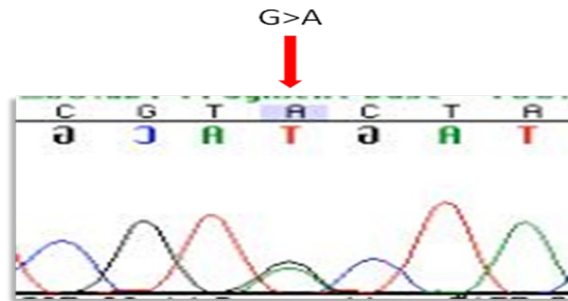
acid (p.Q100H) (Figure 1). It was identified in a male newborn diagnosed as HPE-*like* presenting microcephaly, ocular hypotelorism, flat nose and median cleft. Parents were not available for study.

The analysis of this mutation by the ESE finder program (<http://rulai.cdhl.edu>) showed that this variant did not change the ligation sites of the Shh protein (**SF2/ASF**, **SF2/ASF (IgM-BRCA1)**, **SC35**, **SRp4**, **SRp55**). Therefore, the Polyphen analysis (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) showed that this is a damaging variant.



**Figure 1:** Chromatogram of a individual with HPE-*like* with a mutation in the *SHH* gene in position c.300G>C. The base change resulted in the amino acid change (p.Q100H).

The missense mutation c.593G>A (Figure 2) was a *de novo* mutation and was found in exon 2. It leads to the change of cysteine by the tyrosine (p.C198Y). This mutation, considered possibly damaging by the Polyphen program was found in a female individual presenting HPE alobar, microcephaly, ocular hypotelorism and left cleft lip and palate. Parents did not show this mutation.



**Figure 2:** Chromatogram of a individual with HPE alobar with mutation in the *SHH* gene in the position c.593G>A. The base change resulted in the amino acid change (c.C198Y).

The missense mutation c.406G>A was found in exon 2, in the first base of the glutamic acid, leading to the change of this amino acid by the lysine (p.E136K). This variant was detected in a male individual diagnosed as HPE-like and presenting ocular hypotelorism, flat nose and median cleft. The analysis by the Polyphen program predicted as a benign variant, considered as a single nucleotide polymorphism (SNP).

One change base found in the position c.897C>G that would not be predicted to cause a change of amino acid of protein was detected: p.L299L.

**Table 1:** Variants found among 37 patients analysed with spectrum of HPE.

<b>Patients of HRAC</b>	<b>Exon</b>	<b>Position</b>	<b>Protein effect</b>	<b>Consequence</b>
<b>1</b>	Exon 1	c.300G>C	p.Q100H	Patogenic
<b>2</b>	Exon 2	c.593G>A	p.C198Y	Possibly Patogenic
<b>3</b>	Exon 3	c.897C>G	p.L299L	Benign
<b>4</b>	Exon 2	c.406G>A	p.E136K	No defined

## **DISCUSSION**

SHH mutations of the missense, nonsense, deletion, and frameshift types have been identified in exons 1, 2, and 3 (Nanni et al., 1999). Depending on the location of these variants, the signaling activity of the SHH-N domain and the autoprocessing reaction by the SHH-C domain can be affected altering the normal function of the protein. (Cohen, 2006).

In the present work we performed mutational analysis of the SHH gene in 37 unrelated individuals with HPE. Four variants were found including 2 missense mutations, and 2 new SNPs.

One of the missense mutation (c.300G>C) found in this work is located in a highly conserved region between the species including human, rhesus, mouse, dog, horse, armadillo, opossum, platypus, lizard, X-tropicales, stickleback (UCSC Genome Bioinformatics: [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)). This mutation was described (Odent et al., 1999) in a patient presenting clinical findings similar to our patient suggesting the functional characteristic of this variant. The base change led to the change of an uncharged amino acid (glutamine) by a charged one (histidine) which can alter the protein conformation. Roessler et al. (1997), identified a base change (298C>T) in the same codon (100) leading to a stop codon (p.Q100X) and premature end of the protein.

Among the other 3 variants found, the c.897C>G did not change the amino acid and would not be predicted to cause a change in the SHH protein. The c.406G>A was predicted as benign by the Polyphen program. It resulted in the substitution of a charged amino acid by other with the same physical characteristic. The c.593G>A mutation also resulted in the change between amino acid with the same physical characteristic, therefore it was considered as possibly damaging by the Polyphen, and is located in a high conserved region between species. Parents were analyzed and this is a *de novo* mutation. The functional effect of many of the missense mutations is unknown. It has been questioned if missense mutations alone are sufficient to cause holoprosencephaly (Cohen, 2006). There are some reports showing missense mutation in SHH and in other candidate genes as ZIC2 and TGIF (Nanni et al., 1999; Gripp et al., 2000).

The finding of SHH mutations in only a minority of the total HPE patients underscores the significant etiological heterogeneity of this condition. We should note that the effect of these mutations on SHH function are unknown. Although these alterations were not present in 100 normal control chromosomes, the changes could represent rare polymorphisms which do not affect SHH activity. Functional studies are necessary to determine whether the activity of the abnormal protein is decreased.

No specific genotype-phenotype correlation according to type or location of the mutations in SHH is observed. In addition, there were no clinical features unique to individuals with an SHH mutation compared with those without a detected mutation. The phenotype of carriers of an SHH mutation can vary from alobar HPE to clinically normal individuals (Ming and Muenke, 1998).

In conclusion, the results show the role of SHH gene in the etiology of HPE suggesting that others candidate genes as ZIC2, TGIF, SIX3, and PTCH should be investigated. As additional genes related to HPE are identified and the interaction between their products is investigated, a more complete understanding of the numerous genetic and environmental factors which contribute to normal brain development and HPE will be elucidated.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and families who participated in the research. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (06/60973-9).

#### **4.2. Versão em Português**

#### **4.2.1. ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE SONIC HEDGEHOG (*SHH*) EM PACIENTES COM FISSURAS ORAIS NÃO SINDRÔMICAS**

<sup>1,2</sup> Claudia Danielli Pereira Bertolacini, <sup>1</sup>Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

<sup>1</sup>Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Departamento de Genética, USP/Bauru, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista, Departamento de Genética, UNESP/Botucatu, Brasil.

Título Resumido: Análise do *SHH* em fissuras orais não sindrômicas

Correspondência para: Lucilene A Ribeiro-Bicudo. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, USP/Bauru. Rua Sílvio Marchione, 3-20, Bauru, SP, Brazil.  
Telefone: (14) 32358412. lubicudo@centrinho.usp.br

#### **RESUMO**

As fissuras orais como as fissuras de lábio e/ou palato (FLP) consiste em defeitos congênitos comuns, sendo mais frequentemente encontradas como malformações isoladas sendo assim chamadas de fissuras não sindrômicas. Atualmente, tem sido mostrado que as fissuras orais são fenotípicamente variáveis e geneticamente heterogêneas proporcionando uma dificuldade maior a identificação de um gene causador. O gene Sonic Hedgehog (*SHH*) codifica uma molécula sinalizadora que desempenha um papel central no padrão de desenvolvimento do sistema nervoso e esquelético. Ele está envolvido em numerosos eventos chaves durante a embriogênese, incluindo a estabilidade do eixo direito-esquerdo, o padrão dorso ventral do tubo neural, o desenvolvimento da endoderme e de membros, o desenvolvimento craniofacial, desenvolvimento do crânio, da pituitária, dentre outros. No presente estudo, foi realizada a análise mutacional do gene *SHH* em 90 indivíduos com fissuras orais não sindrômicas, para determinar se este apresenta algum papel nas fissuras orais humanas. Nenhuma variante foi encontrada dentre essas amostras.

Palavras-chave: *SHH*, mutação, fissuras orais não sindrômicas.

## **INTRODUÇÃO**



Fissuras de lábio e/ou fissuras de palato (FLP) consiste em um defeito congênito comum encontrado em mais de 300 síndromes conhecidas, contudo essas são mais frequentemente observadas como defeitos congênitos isolados, sendo assim chamadas de fissuras de lábio e/ou palato não síndrômicas (FLPNS). A prevalência de nascimento para esses defeitos varia entre 1/700 a 1/1000, dependendo da origem geográfica, observando uma alta frequência nas populações Asiáticas e Nativos Americanos e baixa frequência na população Africana (Mossey and Little, 2002).

Atualmente, tem sido postulado que as FLPNS são fenotipicamente variáveis e geneticamente heterogêneas, dificultando com isso a identificação de um gene causador. A análise genômica de casos familiares de FLPNS tem identificado vários loci suscetíveis fissuras orais; diversas dessas regiões tem sido confirmadas em estudos subsequentes (Marazita et al., 2002; Marazita et al., 2004; Blanton et al., 2005). Outros genes como o TGFA, BCL3, MSX1, TGFB3, RARA, IRF6, FGFR1, e CRISPLD2 tem sido implicados a uma ou mais análises de associação e/ou ligação (Ardinger et al., 1989; Chenevix-Trench et al., 1991; Stein et al., 1995; Lidral et al., 1997, 1998; Maestri et al., 1997; Wyszynski et al., 1997; Martinelli et al., 1998; Scapoli et al., 1998; Wong et al., 2000; Blanco et al., 2001; Jezewski et al., 2003; Mitchell et al., 2001; Beaty et al., 2002; Murray, 2002; Zuccherro et al., 2004; Blanton et al., 2005; Riley et al., 2007; Chiquet et al., 2007).

Como as fissuras isoladas, as FLP síndrômicas tem sido observadas pela sua variabilidade com relação a defeitos labiopalatinos, insinuando assim a possibilidade desses genes para as FLP síndrômicas contribuir para a incidência de FLP isoladas. O gene Sonic Hedgehog (*SHH*) codifica uma molécula sinalizadora que desempenha um papel central no padrão desenvolvimental do sistema nervoso e

esquelético (Ingham and McMahon, 2001). Ele está envolvido em numerosos eventos durante a embriogênese, incluindo a estabilidade do eixo direito-esquerdo, o padrão dorso ventral do tubo neural, o desenvolvimento da endoderme e de membros, o desenvolvimento craniofacial, desenvolvimento do crânio, da pituitária, dentre outros (Roessler and Muenke, 2003). Durante o crescimento facial, *SHH* é expresso na ectoderme do primórdio facial (Jeong et al., 2004). Mutações nulas no gene *SHH* causam severa deficiência craniofacial. A inibição da sinalização de *SHH* durante o crescimento do processo frontonasal de galinhas, com a função de bloqueamento de anticorpos, inibiu o crescimento facial e causou fissure de lábio (Hu and Helmes, 1999). Mutações em *SHH* podem levar a holoprosencefalia (HPE), uma condição caracterizada por redução severa do tamanho do cérebro, fusão dos dois hemisférios cerebrais e defeitos de elementos craniofaciais. *FLP* esta associada com HPE autossômica dominante devido a mutações no *SHH* (Nanni et al., 1999). No presente estudo, foi realizada a análise mutacional em 90 pacientes com fissuras orais não sindrômicas a fim de determinar se o gene *SHH* está envolvido na etiologia dessas malformações congênitas.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

## **Pacientes**

Nós estudamos um total de 90 pacientes clinicamente diagnosticados com fissuras orais não sindrômicas com base na avaliação de um geneticista clínico. Todos os propósitos fazem parte da causuística do “Hospital de Reabilitação de Anomais Craniofaciais”, Bauru/USP, Brasil. Amostra de sangue periférico foi obtida de todos os indivíduos incluídos neste estudo, após a assinatura do Termo de Consentimento.

## **Análise Molecular**

O DNA genômico foi extraído de sangue total por métodos rotineiros. Foi realizada a análise mutacional das regiões codificantes e dos limites exon-intron do gene *SHH* (*Ensembl*: **OTTHUMG00000023664**). Os primers utilizados para a amplificação de *SHH* foram descritos por El-Jaick et al. (2007). A amplificação por meio da PCR foi executada com uma reação final de 35  $\mu$ L, utilizando-se 20ng de DNA/ul modelo, tampão 1x de Amplificação para PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5x de Solução Enhancer PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 nM de  $MgSO_4$ , 200  $\mu$ M de cada dNTP, (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 0.25-10  $\mu$ M de cada primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), e 0.02 U de Taq DNA polimerase/ ul (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para a reação da segunda parte do exon 3 (exon 3c) foi adicionado DMSO 10%. As condições da PCR para a amplificação foram de 95°C por 4 minutos seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (s), 60°C por 30s, 72°C por 1 minutos, e uma extensão final de 72°C por 7 min. Para a temperatura de anelamento do exon 3c foi utilizado 72°C for 30s e 73°C for 1 minute

para a adição das dNTPs. O produto da PCR foi analisado pelo método dHPLC (“Denaturing high performance liquid chromatography”) utilizando o sistema Transgenomic WAVE system ([www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)), como descrita por Kuklin et al.(1998). Os heteroduplexes foram formados pela denaturação a 95°C e o resfriamento a 1°C por minuto. As amostras que mostraram anormalidades nos resultados obtidos pelo dHPLC foram analisadas por seqüenciamento direto utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Kit e MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare).

## **RESULTADOS**

Dentre os 90 pacientes estudados, 18 indivíduos apresentavam apenas fissura de palato (FP), 23 apresentavam fissura de lábio (FL) e 49 portavam fissura de lábio e palato (FLP). A análise pelo método dHPLC não mostrou qualquer anormalidade, contudo, 11 amostras que não apresentaram muita clareza nos resultados foram seqüenciadas.

Nenhuma variante foi encontrada dentre essas amostras.

## **DISCUSSÃO**

Está claro que o crescimento e a morfogênese do primórdio facial é perfeitamente coordenado para o desenvolvimento integro da face. O fato de grande parte do mesênquima que formam a região craniofacial ser derivado das células da crista neural, alguns genes e moléculas sinalizadoras regulam a formação da crista neural, migração, proliferação e apoptose de células importantes para o desenvolvimento craniofacial.

As fissuras de lábio e/ou fissuras de palato (FLP) consistem em malformações craniofacial comuns com uma variável incidência entre os diferentes tipos de população. Estas primariamente resultam de uma falha na fusão da proeminência frontonasal e proeminências maxilares durante a 7<sup>o</sup> semana de gestação. A falha na fusão dos processos palatinos possivelmente ocorre como um defeito secundário na 8<sup>o</sup> semana de gestação.

A procura por uma causa das FLP é extremamente complexa, envolvendo múltiplas técnicas que têm sido utilizadas para identificar aproximadamente 30 genes candidatos, nos quais a alteração funcional resulta em diferentes tipos de fissuras (Schutte & Murray, 1999).

A perda de atividade do *SHH* em camundongos tem um efeito profundo nos padrões de desenvolvimento embrionário da face, causando ciclopia e severa alteração em estruturas da face (Chiang et al., 1996). O uso de uma combinação experimental cirúrgica e molecular em galinhas mostrou que a perda transitória da sinalização do *SHH* em embriões proporcionou defeitos análogos às fissuras em humanos (Hu and Helms, 1999). Devido a isso foi decidido analisar o *SHH* em pacientes com FLP não sindrômica.

No presente trabalho não foi encontrado nenhuma variante no *SHH* dentre todos os pacientes com fissuras orais não sindrômica. Este é o segundo relato de

análise do gene *SHH* em pacientes com essa malformação. O primeiro relato (Orioli et al., 2002) encontrou 15 bandas variantes em 13 pacientes com fissuras orais, representando cinco diferentes mudanças de base, cada uma descoberta como polimorfismo silencioso. Contudo não encontramos nenhuma variante dentre os 90 indivíduos com fissuras orais não sindrômicas estudados e baseado nos resultados obtidos por Orioli et al. (2002) podemos sugerir que mutações no gene *SHH* não desempenham um papel importante nas fissuras orais não sindrômica. Estudos futuros envolvendo outros genes candidatos, incluindo aqueles envolvidos na via sinalizadora de *SHH*, poderiam ser realizados na tentativa de elucidar a etiologia dessas malformações craniofaciais.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pacientes e familiares que participaram desta pesquisa. Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (06/60973-9).

#### REFERÊNCIAS

- Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. 1989. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45: 348-353.
- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, McIntosh I. 2001. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol* 22: 1-11.

- Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreno H, Paredes M, Jara L, Palomino H, Schull WJ. 2001. Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Hum Biol* 73: 81-89.
- Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. 2005. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*. 137:259-62.
- Chenevix-Trench G, Jones K, Green A, Martin N. 1991. Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 48: 1012-1013.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden JL, Westphal H, Beachy PA. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic Hedgehog* gene function. *Nature* 383:407-13.
- Chiquet BT, Lidral AC, Stal S, Mulliken JB, Moreno LM, Arco-Burgos M, Valencia-Ramirez C, Blanton SH, Hecht JT. 2007. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. *Hum Mol Genet*. Sep 15:2241-8.
- El-Jaick KB, Fonseca RF, Moreira MA, Ribeiro MG, Bolognese AM, Dias SO, Pereira ET, Castilla EE, Orioli IM. 2007 Single median maxillary central incisor: New data and mutation review. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79:573-80.
- Hu D, Helms JA. 1999. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development* 126:4873-4884.
- Ingham PW, McMahon AP. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15: 3039-3087.

- Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottman AH, McMahon AP. 2004. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev* 18:937-951.
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC. 2003. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 40: 399-407.
- Kuklin A, Munson K, Gjerde D, Haefele R, Taylor P. 1998. Detection of single nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system. *Genet Test* 1:201–206.
- Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Scheerer H, Shiang R, Naval A, Layda E, Magee K, Magee W. 1997. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 34: 1-6.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC. 1998. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63: 557-568.
- Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, Liang KY, Duffy DL, VanderKolk C. 1997. Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: Including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet* 73: 337-344.



- Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu YE. 2002. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. *Am J Med Genet* 71:349-64.
- Marazita ML, Field LL, Tunçbilek G, Cooper ME, Goldstein T, Gürsu KG. 2004. Genome-scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate in consanguineous families from Turkey. *Am J Med Genet A* 126:111-22
- Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Baciliero U, Padula E, Tognon M. 1998. Suggestive linkage between markers on chromosome 19q13.2 and nonsyndromic orofacial cleft malformation. *Genomics* 51:177-181.
- Mitchell LE, Murray JC, O'Brien S, Christensen K. 2001. Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population. *Am J Epidemiol*, 153:1007-15.
- Mossey PA, Little J. 2002. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF, eds. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. Oxford, England: Oxford University Press. 127-58.
- Murray JC. 2002. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 61: 248-256.
- Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, Giannotti A, Imaizumi K, Jones KL, Campo MD, Martin RA, Meinecke P, Pierpont ME, Robin NH, Young ID, Roessler E, Muenke M. 1999. The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet.* 8(13):2479-88.

- Oriolli IM, Vieira AR, Castilha, EE, Ming, JE, Muenke, M. 2002. Mutational analysis of the *Sonic Hedgehog* gene in 220 Newborn with oral clefts in a South American (ECLAMC) population. *Am J Med Genet* 108:12-15.
- Riley BM, Murray JC. 2007. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases. *Am J Med Genet A* 143:3228-34.
- Riley BM, Schultz RE, Cooper ME, Goldstein-McHenry T, Daack-Hirsch S, Lee KT, Dragan E, Vieira AR, Lidral AC, Marazita ML, Murray JC. 2007. A genome-wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. *Am J Med Genet* 143:846-52.
- Roessler E, Muenke M. 2003. How a Hedgehog might see holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1:R15-21.
- Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Carinci P, Tognon M. 1998. Lack of linkage disequilibrium between transforming growth factor alpha Taq I polymorphism and cleft lip with or without cleft palate in families from Northeastern Italy. *Am J Med Genet* 75: 203-206.
- Schutte BC, & Murray JC. 1999. The many faces and factors of orofacial clefts. *Human Molecular Genetics* 8 (10R): 1853-1859.
- Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcolm S, Winter R, Blanton SH, Amos C, Seemanova E, Hecht JT. 1995. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. *Am J Hum Genet* 57: 257-272.
- Wong FK, Hagberg C, Karsten A, Larson O, Gustavsson M, Huggare J, Larsson C, Teh BT, Linder-Aronson S. 2000. Linkage analysis of candidate regions in

Swedish nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate families. Cleft Palate Craniofac J 37: 357-362.

Wyszynski DF, Maestri N, Lewanda AF, McIntosh I, Smith EA, Garcia-Delgado C, Vinageras-Guarneros E, Wulfsberg E, Beaty TH. 1997. No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations. Hum Hered 47: 101-109.

Zuccherro TM, [Cooper ME](#), [Maher BS](#), [Daack-Hirsch S](#), [Nepomuceno B](#), [Ribeiro L](#), [Caprau D](#), [Christensen K](#), [Suzuki Y](#), [Machida J](#), [Natsume N](#), [Yoshiura K](#), [Vieira AR](#), [Orioli IM](#), [Castilla EE](#), [Moreno L](#), [Arcos-Burgos M](#), [Lidral AC](#), [Field LL](#), [Liu YE](#), [Ray A](#), [Goldstein TH](#), [Schultz RE](#), [Shi M](#), [Johnson MK](#), [Kondo S](#), [Schutte BC](#), [Marazita ML](#), [Murray JC](#). 2004. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. N Engl J Med 351:769-80.

#### **4.2.2. ANÁLISE DO GENE SONIC HEDGEHOG (*SHH*) EM PACIENTES BRASILEIROS COM DISPLASIA FRONTAL NASAL**

<sup>1,2</sup> Claudia Danielli Pereira Bertolacini, <sup>1</sup>Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

<sup>1</sup>Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Departamento de Genética, USP/Bauru, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista, Departamento de Genética, UNESP/Botucatu, Brasil

Título resumido: Análise mutacional do *SHH* em Displasia Frontonasal

Correspondencia para: Lucilene A Ribeiro-Bicudo. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, USP/Bauru. Rua Sílvio Marchione, 3-20, Bauru, SP, Brazil. Telefone: (14) 32358412. lubicudo@centrinho.usp.br

## RESUMO

A Displasia frontonasal (DFN) mostra-se ser uma malformação complexa, não uniforme, cujas alterações durante o desenvolvimento craniofacial resultam de defeitos suaves a severos. As causas ainda não são claras, porém muitos casos são esporádicos. O gene Sonic Hedgehog (*SHH*) é expresso durante o desenvolvimento da notocorda e assoalho do tubo neural, desempenhando um importante papel no desenvolvimento de ambas as linhas média do sistema nervoso central (SNC), regiões craniofaciais e desenvolvimento de membros. Com o objetivo de checar se o *SHH* desempenha algum papel nas DFNs, foi realizada a análise mutacional deste gene em 5 indivíduos com DFN isolada e em 4 indivíduos com DFN associada a outras malformações como a DFN acromegálica (ADFN) e espectro óculo-auriculo-vertebral (DFNOAV). Nenhuma variante patogênica foi encontrada. No indivíduo com ADFN foi encontrado apenas um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) na posição 630 (C>T) a qual não acarretava a troca de aminoácidos (p.G192G). Este é o primeiro relato de análise do gene *SHH* em pacientes com DFN isolada, e os dados obtidos não mostram o envolvimento desse gene na etiologia das DFN isoladas, ADFN e DFNOAV.

Palavras Chave: displasia frontonasal, *SHH*, análise de mutações.

## INTRODUÇÃO

A Displasia Frontonasal (DFN) consiste em uma anomalia de desenvolvimento incomum que envolve a região craniofacial, de etiologia desconhecida, tipicamente com ocorrência esporádica; porém, pode mostrar um padrão familiar (Sedano et al, 1970). Clinicamente, ela é caracterizada por crânio bífido oculto, hipotelorismo ocular e uma ampla raiz nasal (Guion-Almeida and Richieri-Costa, 1996; Gorlin et al., 2001). A DFN pode ocorrer de forma isolada ou pode ser vista como parte do espectro clínico de diferentes síndromes, como a síndrome Oculo-aurículo-vertebral (OAV) (OMIN 304110), síndrome craniofacial (CDFN) (OMIN 304110), displasia frontonasal acromegálica (ADFN) (OMIN 603671) e outras condições mais raras. Até o momento não há evidências de um gene particular envolvido na etiologia das DFNs isoladas, contudo, Hu e Helms (1999) mostraram que o excesso da proteína *Shh* em galinhas levou uma ampliação mediolateral do processo frontonasal e uma ampliação entre os olhos, resultando em hipertelorismo. Os autores sugerem que o gene *SHH* é essencial para a morfogênese do processo frontonasal e maxilar. O gene *SHH* é expresso durante o desenvolvimento da notocorda e assoalho do tubo neural, desempenhando um papel importante em ambas as linhas medias do SNC/regiões craniofaciais e em membros (Roelink et al., 1994; Johnson and Tabin, 1997). Em humanos, a haploinsuficiência de *SHH* pode levar a holoprosencefalia, que consiste em uma malformação caracterizada pela clivagem incompleta do cérebro em dois hemisférios distintos (direito e esquerdo). Estudos com ratos mutantes para o gene *Shh* (*shh<sup>-/-</sup>*) mostraram que estes não apresentavam apenas o fenótipo extremo da holoprosencefalia (HPE), mas também malformações nas regiões medianas e extremidades de membros (Chiang et al, 1996). No presente

estudo, foi analisado o gene *SHH* em indivíduos com DFN isolada ou associada a outras anomalias.

## **PACIENTES AND MÉTODOS**

### **Pacientes**

Nós estudamos 9 indivíduos com DFN os quais fazem parte da causuística do Hospital of Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Bauru/SP, Brasil. Os pacientes foram avaliados por um geneticista clínico e o critério de inclusão para o presente estudo foram a presença de hipertelorismo, cranio bifido oculto e raiz nasal ampla. Amostra de sangue periférico foi obtida de todos os indivíduos incluídos neste estudo, após a assinatura do Termo de Consentimento.

### **Análise Molecular**

O DNA genômico foi extraído de sangue total por métodos rotineiros. Foi realizada a análise mutacional das regiões codificantes e dos limites exon-intron do gene *SHH* (*Ensembl*: **OTTHUMG00000023664**). Os primers utilizados para a amplificação de *SHH* foram descritos por El-Jaick et al. (2007). A amplificação por meio da PCR foi executada com uma reação final de 35  $\mu$ L, utilizando-se 20ng de DNA/ul modelo, tampão 1x de Amplificação para PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5x de Solução Enhancer PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 nM de  $MgSO_4$ , 200  $\mu$ M de cada dNTP, (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 0.25-10  $\mu$ M de cada primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), e 0.02 U de Taq DNA polimerase/ul (Applied Biosystems,

Foster City, CA). Para a reação da segunda parte do exon 3 (exon 3c) foi adicionado DMSO 10%. As condições da PCR para a amplificação foram de 95°C por 4 minutos seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (s), 60°C por 30s, 72°C por 1 minutos, e uma extensão final de 72°C por 7 min. Para a temperatura de anelamento do exon 3c foi utilizado 72°C for 30s e 73°C for 1 minute para a adição das dNTPs. O produto da PCR foi analisado pelo método dHPLC (“Denaturing high performance liquid chromatography”) utilizando o sistema Transgenomic WAVE system ([www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)), como descrita por Kuklin et al.(1998). Os heteroduplexes foram formados pela denaturação a 95°C e o resfriamento a 1°C por minuto. As amostras que mostraram anormalidades nos resultados obtidos pelo dHPLC foram analisadas por seqüenciamento direto utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Kit e MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare).

## **RESULTADOS**

Nessas amostras composta por 9 pacientes, 5 indivíduos apresentavam DFN isolada, 3 casos de DFN estavam associados ao espectro OAV (DFNOAV) e 1 caso de DFN estava associado a acromegalia (ADFN) (Tabela 1). A análise do gene *SHH* mostrou padrão de dHPLC alterado em apenas 1 paciente (pacient 5, exon 3). A análise por sequenciamento direto revelou uma mudança de base na posição c.630C>T que não resultava na troca do aminoácido (p.G192G). Essa variação consiste em um polimorfismo de um único nucleotídeo conhecido (rs9333634).



**Tabela 1:** Tabela de pacientes analisados neste trabalho e seus respectivos diagnósticos.

Pacientes	Diagnostico
1	DFN
2	DFNOAV
3	DFN
4	DFN
5	ADFN
6	DFNOAV
7	DFN
8	DFN
9	DFNOAV

## DISCUSSÃO

No presente estudo, nós analisamos o gene *SHH* em um grupo de indivíduos com DFN isolada e DFN sindrômica. Cinco dos 9 pacientes apresentavam DFN clássica, mostrando o tipo isolado da malformação com crânio bifido oculto (perda do osso frontal na linha média), hipertelorismo e raiz nasal ampla. Nesse grupo de pacientes, nenhuma variante foi encontrada, sugerindo que o gene *SHH* não está envolvido no fenótipo de DFN nesses pacientes. Em relação, os casos não sindrômicos presentes dentre as 9 amostras, nenhuma mutação patogênica foi encontrada em pacientes com DFNOAV e ADFN. O espectro OAV possui uma ampla variação fenotípica, caracterizada por anormalias oculares, malformações na orelha e anomalia vertebral. Ela é etiologicamente heterogênea, com herança autossômica dominante, autossômica recessiva e padrões de herança multifatorial (Manaligod et al., 1999; Josifova et al., 2004). Muitos casos parecem ser esporádicos e, recentemente, não há evidência de algum gene particular envolvido na etiologia do espectro OAV. A análise do *SHH* em 3 indivíduos com DFN

associada ao espectro OAV, presente em nossas amostras, não mostraram o envolvimento desse gene na etiologia desse fenótipo raro.

Tem sido relatado vários casos de variantes raras de DFN nas quais anomalias craniofaciais estão associadas a malformação do sistema nervoso central (SNC) e malformação de membros incluindo aplasia da tíbia, calcanhares voltados para o interior e polidactilia preaxial dos pés (Verloes et al, 1992; Suelo and Fernandes, 1993). Essas combinações de anomalias têm sido chamadas de “displasia frontonasal acromegálica (ADFN) (Verloes et al., 1992). Ratos mutantes, que apresentavam comprometimento na sinalização de *SHH*, mostraram fenótipo similar com aqueles encontrados em ADFN incluindo polidactilia preaxial e hemimelia primária afetando os membros traseiros (Knezevic et al., 1997, Chan et al., 1995, Qu et al., 1997). Slaney et al. (1999) sugeriu que a base molecular dessa condição pode ser causada devido a uma perturbação na via sinalizadora do gene Sonic Hedgehog. Contudo, no presente trabalho, a análise do gene *SHH* em pacientes com fenótipo ADFN detectou apenas um único polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) conhecido c.630C>T (rs9333634) o qual não levou a troca do aminoácido. Outros genes pertencentes a via sinalizadora de Sonic Hedgehog poderiam estar envolvidos. Dentre os genes importantes para o desenvolvimento craniofacial podemos relatar o *GLI3*, o qual é um dos principais genes alvos da sinalização transducional de *SHH* e pode regular a própria expressão de *SHH* por feedback negativo. Ele também é altamente expresso durante o desenvolvimento do SNC e membros (Marigo et al, 1996). Até o momento, duas síndromes humanas diferentes envolvendo o cérebro e membros são conhecidas por serem causadas por mutações no *GLI3*: Greig cephalopolisindactili (GCPS) (Vortkamp et al., 1991), que também inclui a presença de hipertelorismo e polidactilia preaxial dos pés; e a

síndrome Pallister-Hall (Kang et al. 1997), caracterizada pela combinação de hamartona hipotalâmica, polidactilia posaxial/central e imperfuração anal. Essas são evidências que o gene *GLI3* pode desempenhar um importante papel nas anomalias craniofaciais típicas de ADFN e a sua análise é essencial para a investigação da etiologia desses defeitos congênitos.

Esse é primeiro relato de análise do gene *SHH* em indivíduos com DFN, e os dados obtidos não mostraram o envolvimento desse gene na etiologia das DFNs isoladas, das DFNOAV e ADFN. Contudo, considerando a heterogeneidade etiológica dessas malformações, a investigação do gene *SHH* em um número amostral maior de indivíduos com DFN isolada e DFN sindrômica seria de grande importância para a elucidação da origem dessas condições atípicas. Em adição, a análise de outros genes, principalmente daqueles envolvidos na via sinalizadora de *SHH*, como o *GLI3*, poderia ser realizada.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pacientes e familiares que participaram desta pesquisa. Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (06/60973-9).

## REFERÊNCIAS

- Chan DC, Laufer E, Tabin C, Leder P. 1995. Polydactylous limbs in Strong's Luxoid mice result from ectopic polarizing activity. *Development* 121: 1971-8.
- Gorlin RJ, Cohen MM, Raoul CM. Syndrome of the head and neck. 4<sup>th</sup> ed. New York, NY: Oxford University press; 2001.p. 707-9, 977-81.
- Josifona DJ, Patton MA, Marks K. 2004. Oculoauriculovertebral spectrum phenotype caused by an unbalanced t(5;8)(p15.31;p23.1) rearrangement. *Clin Dysmorphol* 13:151-3.
- Kang S, Graham JM Jr, Olney AH, Biesecker LG. 1997. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* 15:266-8.
- Knezevic V, De Santo R, Schughart K, Huffstadt U, Chiang C, Mahon KA, Mackem S. 1997. Hoxd-12 differentially affects preaxial and postaxial chondrogenic branches in the limb and regulates Sonic hedgehog in a positive feedback loop. *Development* 124:4523-36.
- Manaligod JM, Bauman NM, Menezes AH, Smith RJ. 1999. Cervical vertebral anomalies in patients with anomalies of the head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 10:925-33.
- Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ. 2006. Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* 80:273-83.

- Qu S, Niswender KD, Ji Q, van der Meer R, Keeney D, Magnuson MA, Wisdom R. 1997. Polydactyly and ectopic ZPA formation in *Alx-4* mutant mice. *Development* 124:3999-4008.
- Sedano HO, Cohen MM Jr, Jirasek J, Gorlin RJ. 1970. Frontonasal dysplasia. *J Pediatr* 76:906-13.
- Slaney SF, Goodman FR, Eilers-Walsman BL, Hall BD, Williams DK, Young ID, Hayward RD, Jones BM, Christianson AL, Winter RM. 1999. Acromelic frontonasal dysostosis. *Am J Med Genet* 83:109-16.
- Suelo G, Fernandes MC. 1993. Frontonasal dysostosis, callosal agenesis, crossed fused ectopia, tibial hemimelia, and preaxial polydactyly of feet: severe expression of the acrocallosal syndrome?. *Am J Med Genet*. 46:355-7.
- Verloes A, Gillerot Y, Walczak E, Van Maldergem L, Koulischer L. 1992. Acromelic frontonasal dysplasia: further delineation of a subtype with brain malformations and polydactyly. *Am J Med Genet* 42:180-3.
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH. 1991. *GLI3* zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352:539-40.
- Johnson RL, Tabin CJ. 1997. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90:979-90.

### 4.2.3 ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE SONIC HEDGEHOG (*SHH*) EM PACIENTES COM O ESPECTRO HOLOPROSENCEFALIA (HPE)

<sup>1,2</sup> Claudia Danielli Pereira Bertolacini, <sup>1</sup>Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

<sup>1</sup>Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Departamento de Genética, USP/Bauru, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista, Departamento de Genética, UNESP/Botucatu, Brasil

Running title: *SHH* analysis in holoprosencephaly

Correspondência para: Lucilene A Ribeiro-Bicudo. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craiofaciais, USP/Bauru. Rua Sílvio Marchione, 3-20, Bauru, SP, Brazil. Telefone: (14) 32358412. lubicudo@centrinho.usp.br

## RESUMO

A Holoprosencefalia (HPE) é uma seqüência malformativa que pode estar acompanhada de outras anomalias estruturais medianas do sistema nervoso central (SNC) e/ou face na qual ocorre uma falha na divisão dos hemisférios cerebrais em direito e esquerdo. Essa anomalia é geneticamente heterogênea, mas agentes ambientais também podem contribuir para a etiologia da HPE. *SHH* é o principal gene implicado na HPE. *SHH* desempenha um papel essencial para o desenvolvimento normal do prosencéfalo precoce e expressa-se na notocorda do embrião humano, na placa precordial e nos membros posteriores. No presente estudo realizamos a análise mutacional da região codificadora do gene *SHH* em 37 indivíduos não aparentados portadores do espectro da HPE. Quatro variações diferentes foram encontradas incluindo duas mutações missense e 2 polimorfismos de um único nucleotídeo não descritos. Essas variantes ocorreram ao longo da extensão do gene. Não houve evidência de associação genótipo-fenótipo baseando-se no tipo ou posição da mutação. Esse estudo confirma a grande heterogeneidade genética da doença e a dificuldade de estabelecer correlação genótipo-fenótipo.

Palavras-Chave: *SHH*, mutação, holoprosencefalia

## **INTRODUÇÃO**

A holoprosencefalia (HPE) consiste em um defeito de desenvolvimento comum que afeta ambos o cérebro anterior e a face. Ela é caracterizada pela separação incompleta do cérebro em dois hemisférios distintos, o direito e o esquerdo. Três níveis de acordo com o aumento da severidade da malformação são descritos: HPE lobar, a qual os ventrículos direito e esquerdo estão separados, mas com alguma continuidade através do córtex frontal; HPE semilobar com uma separação parcial, e a forma mais severa, HPE alobar com um único ventrículo cerebral e nenhuma fissura interhemisférica presente (Demyer and Zeman, 1963). Outro subtipo suave da HPE chamada variante interhemisférica mediana ou sintelencefalia tem sido atualmente reconhecida (Barkovich and Quint, 1993). Recentemente, foi descrito um fenótipo mais leve e distinto dentro do espectro holoprosencefálico denominado holoprosencefalia-*like*. Richieri-Costa e Ribeiro (2006) relataram 22 pacientes com o fenótipo holoprosencefalia-*like* cujas características clínicas incluíam severa fissura unilateral de lábio e palato, variabilidade na expressão de outras anomalias faciais como incisivo central único, ressonância nuclear magnética normal e inteligência dentro da normalidade. A HPE apresenta uma alta incidência de 1:250 durante a embriogênese, mas devido a letalidade intra-uterina a frequência é de 1:16.000 nascidos vivos (Matsunaga and Shiota, 1977, Roach et al., 1975;). Mas considerando os avanços em neuroimagens por ressonância nuclear magnética, crianças com a forma menos severa da HPE, como as formas lobares e fissuras interhemisféricas descritas recentemente, deveriam ser agora identificadas para um aumento da prevalência dessa malformação (Hahn and Plawner, 2004).



A etiologia da HPE é complexa, com ambos fatores ambientais e genéticos envolvidos. Diabetes materna, ingestão de álcool e drogas, bem como defeitos no metabolismo do colesterol, tem sido associados a HPE (Cohen, 1989), enquanto que alguns genes candidatos tem sido identificados em humanos, incluindo o gene Sonic Hedgehog (*SHH*) (Belloni et al, 1996; Roessler et al., 1997).

*SHH* foi o primeiro gene descrito para HPE. Ele desempenha um papel crítico durante o desenvolvimento do cérebro anterior precoce e no desenvolvimento do sistema nervoso central. Shh é um membro da família de moléculas sinalizadoras em vertebrados e é essencial para o desenvolvimento normal de muitas regiões do embrião (McMahon et al., 2003). Somado aos dados funcionais e de expressão demonstrando que o Shh é de fundamental importância no desenvolvimento do cérebro anterior, *SHH* também foi mapeado para uma região no cromossomo humano 7q36 que é próximo ao locus HPE3 (Belloni et al., 1996), tornando-se um excelente candidato para HPE. Algumas mutações diferentes, em heterozigidade, tem sido identificadas em pacientes com HPE incluindo mutações missenses, nonsenes, deleções e frameshift ao longo do gene (Cohen, 2006). Mutações em *SHH* são casos raros em HPE esporádica (3.7%), considerando 17% dos casos de HPE familiar. Em contraste, 37% das famílias HPE, com indivíduos que possuem anomalias estruturais que fazem parte do espectro HPE, carregam mutações no *SHH* (Nanni et al., 1999).

Neste estudo, nós realizamos a análise mutacional das regiões codificantes e dos limites exon-intron do gene *SHH* em pacientes fenotipicamente com o amplo espectro da HPE. Dentre os 37 indivíduos

estudados, foram encontradas 4 variações. Este resultado prova a evidência de que mutações no gene *SHH* podem explicar alguns casos esporádicos de HPE.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

### **Pacientes**

Nós estudamos 37 indivíduos com o espectro HPE, os quais fazem parte da casuística do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Bauru/SP, Brasil. Os Pacientes foram avaliados por um geneticista clínico e o critério utilizado para a inclusão no presente estudo foram a presença de microcefalia, hipotelorismo, fáceis plana, hipoplasia da prémaxila, fissura de lábio mediana/bilateral associados ou não a defeitos no sistema nervoso central e outras anomalias. Amostra de sangue periférico foi obtida de todos os indivíduos, após a assinatura do Termo de Consentimento.

### **Análise molecular**

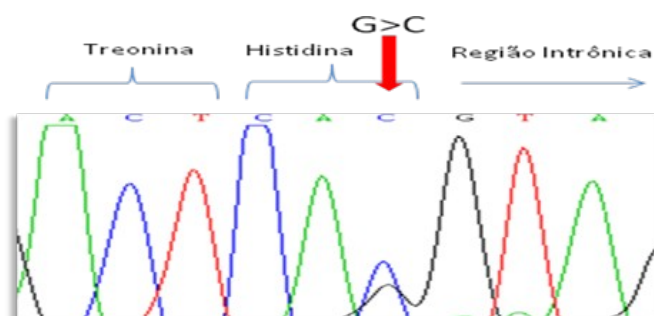
O DNA genômico foi extraído de sangue total por métodos rotineiros. Foi realizada a análise mutacional das regiões codificantes e dos limites exon-intron do gene *SHH* (*Ensembl*: **OTTHUMG00000023664**). Os primers utilizados para a amplificação de *SHH* foram descritos por El-Jaick et al. (2007). A amplificação por meio da PCR foi executada com uma reação final de 35  $\mu$ L, utilizando-se 20ng de DNA/ul modelo, tampão 1x de Amplificação para PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5x de Solução Enhancer PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 nM de  $MgSO_4$ , 200  $\mu$ M de cada dNTP, (Amersham

Biosciences, Piscataway, NJ), 0.25-10 uM de cada primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), e 0.02 U de Taq DNA polimerase/ul (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para a reação da segunda parte do exon 3 (exon 3c) foi adicionado DMSO 10%. As condições da PCR para a amplificação foram de 95°C por 4 minutos seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (s), 60°C por 30s, 72°C por 1 minutos, e uma extensão final de 72°C por 7 min. Para a temperatura de anelamento do exon 3c foi utilizado 72°C for 30s e 73°C for 1 minute para a adição das dNTPs. O Produto da PCR foi analisado pelo método dHPLC (“Denaturing high performance liquid chromatography”) foi realizada utilizando o sistema Transgenomic WAVE system ([www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)), como descrita por Kuklin et al.(1998). Os heteroduplexes foram formados pela denaturação a 95°C e o resfriamento a 1°C por minuto. As amostras que mostraram anormalidades nos resultados obtidos pelo dHPLC foram analisadas por seqüenciamento direto utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Kit e MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare).

## **RESULTADOS**

Analizamos a região codificadora do gene *SHH* em 37 pacientes com HPE. Foram identificadas quatro variações pontuais diferentes no gene (Tabela 1), as quais não foram encontradas nos controles normais. Dessas 4 variações pontuais, 3 levaram a substituição do aminácido (variação missense) e uma não ocasionou a troca do aminoácido (p.L299L). Dentre as variações missense, a variação c.300G>C foi anteriormente descrita em um paciente com HPE por Odent et al (1999). Essa mutação missense está localizada na terceira base do

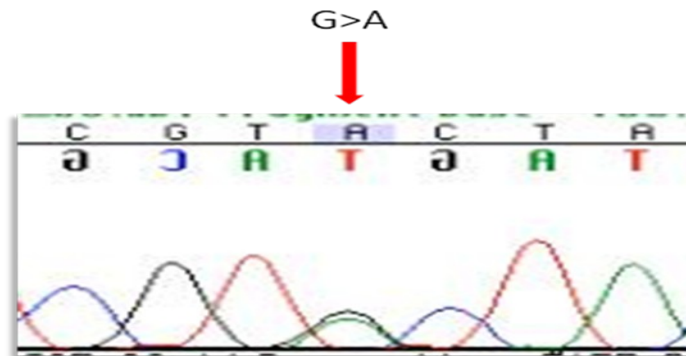
último aminoácido do exon 1 do gene *SHH* e resultou na substituição do aminoácido Glutamina pelo aminoácido Histidina (p.Q100H) (Figura 1). Ela foi identificada em um recém nascido do sexo masculino, portador de *HPE-like*, cujas características clínicas incluíam microcefalia, hipotelorismo ocular, base nasal achatada e fissura de lábio mediana. Pai e mãe não estavam disponíveis para o estudo. A análise dessa mutação pelo programa “ESE finder” (<http://rulai.cdhl.edu>) mostrou que a variante não altera os sítios de ligação desta proteína Shh (**SF2/ASF**, **SF2/ASF (IgM-BRCA1)**, **SC35**, **SRp4**, **SRp55**) com outras proteínas subjacentes, entretanto a análise pelo programa “PolyPhen” (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) mostrou que esta é uma variante de risco.



**Figura 1:** Cromatograma de um indivíduo com *HPE-like*, com mutação no gene *SHH* na posição c.300G>C. A troca de base ocasionou a mudança de aminoácido (p.Q100H).

A mutação missense c.593G>A (Figura 2), encontrada no exon 2, resultou na troca de uma Cisteína por uma Tirosina (p.C198Y). Esta mutação, considerada possivelmente patogênica pelo programa Polyphen, foi encontrada em um indivíduo do sexo feminino, com *HPE* alobar, microcefalia, hipotelorismo

ocular e fissura de lábio e palato a esquerda Os pais foram submetidos a análise contudo, nenhuma variação foi encontrada.



**Figura 2:** Cromatograma de um indivíduo com HPE alobar com mutação no gene *SHH* na posição c.593G>A. A mudança de base resultou na mudança do aminoácido (c.C198Y).

A variação missense c.406G>A foi localizada no exon 2, na primeira base do aminoácido Acido Glutâmico 136, resultando na troca deste por um aminoácido Lisina (p.E136K). Esta variante foi detectada em um indivíduo do sexo masculino com diagnóstico de HPE-*like* cujas características clínicas incluíram hipotelorismo ocular, base nasal achatada e fissura mediana. Pai e mãe não estavam disponíveis para o estudo. A análise desta variação feita no programa Polyphen apontou-a como sendo benigna, portanto considerada como polimorfismo (SNP).

Foi detectada uma mudança de base na região c.897C>G que não resultava na mudança de aminoácido na proteína: p.L299L.

**Tabela 1:** Variações encontradas dentre os 37 pacientes estudados com espectro HPE.

Pacientes do HRAC	Exon	Posição	Efeito na proteína	Consequência
1	Exon 1	c.300G>C	p.Q100H	Patogênica
2	Exon 2	c.593G>A	p.C198Y	Possivelmente Patogênica
3	Exon 3	c.897C>G	p.L299L	Benigna
4	Exon 2	c.406G>A	p.E136K	Não definida

## DISCUSSÃO

Mutações no gene *SHH* do tipo missense, nonsense, deleções e frameshift tem sido identificadas nos exons 1, 2 e 3, em pacientes portadores de HPE. (Nanni et al., 1999). Dependendo da região de localização dessas variações, a atividade sinalizadora do domínio SHH-N e a reação de autoprocessamento realizada pelo domínio SHH-C podem tornar-se comprometidas, alterando assim a função normal da proteína (Cohen, 2006).

No presente trabalho, foi realizada a análise mutacional do gene *SHH* em um grupo de 37 indivíduos portadores do espectro da HPE. Dentre esses indivíduos registrados no HRAC-USP/Bauru, 4 variações diferentes foram encontradas sendo, duas mutações missense e 2 novos SNPs.

Uma das mutações missense encontrada neste estudo (c.300G>C), está localizada em uma região altamente conservada entre as espécies incluindo humanos, macaco *rezus*, camundongos, cachorro, cavalo, armadillo, opossum, platypus, lizard, aves, X-tropicales, stickleback (UCSC Genome Bioinformatics: (www.genome.ucsc.edu). Esta mutação foi anteriormente descrita por Odent et al. (1999) em um paciente com características semelhantes ao paciente analisado em nosso trabalho, ressaltando com isso a característica funcional

desta variação. A troca de base levou a mudança de um aminoácido polar sem carga (Glutamina) por um aminoácido polar com carga (Histidina) podendo com isso levar a alteração conformacional da proteína. Roessler et al. (1997), identificou a troca da primeira base (298C>T) deste mesmo códon (100). Essa mudança levou a formação de um códon de parada (p.Q100X) proporcionando o término prematuro desta proteína.

Dentre as outras 3 variações encontradas, a variante c.897C>G (p.Lys299Lys) não levava a troca de aminoácido, sendo assim considerada benigna. A troca de aminoácido provocada pela variante c.406G>A foi predita como benigna pelo programa PolyPhen. Esta resultou na substituição de um aminoácido com a mesma característica física (polar com carga), o que provavelmente não altera a conformação da proteína. A mutação c.593G>A, também resultou na troca de aminoácido com a mesma característica física (p.C198Y), contudo ela foi considerada pelo programa Polyphen possivelmente patogênica pelo fato de este aminoácido encontrar-se localizado em uma região conservada do gene. Os pais desse indivíduo foram avaliados, e esta é uma mutação *de novo*. O efeito de muitas mutações missense é desconhecido. De acordo com Cohen (2006) mutações missense no gene *SHH* não seriam suficiente para causar o fenótipo da holoprosencefalia. Há relatos de indivíduos com HPE com mutação missense no gene *SHH* e, ainda, mutações em outros genes candidatos como os genes *ZIC2* e *TGIF* (Nanni et al., 1999; Gripp et al., 2000). A ausência das variações c.406G>A e c.897C>G no grupo controle, sugere que elas representam SNPs raros e, no momento não é possível relacioná-los ao fenótipo.

A detecção de mutações no *SHH* em uma minoria do número total de pacientes com HPE demonstra a significativa heterogeneidade etiológica dessa condição. Devemos considerar que o efeito dessas mutações na função do *SHH* é desconhecido. Embora essas alterações não estejam presentes em 100 controles normais, essas mudanças podem representar raros polimorfismos que não afetam a atividade do *SHH*. Estudos funcionais são necessários para determinar se a atividade desta proteína anormal está diminuída.

Não foi observada correlação específica genótipo-fenótipo de acordo com o tipo ou localização das mutações. Além disso, não houve característica clínica única entre os indivíduos com mutação no *SHH* comparado com aqueles sem mutação. O fenótipo de portadores de mutação no *SHH* pode variar de HPE alobar até indivíduos clinicamente normais (Ming e Muenke, 1998).

Em conclusão, os resultados obtidos nesse trabalho mostram a participação do *SHH* na etiologia da HPE, sugerindo que outros genes candidatos para HPE, tais como *ZIC2*, *TGIF*, *SIX3*, e *PTCH*, devam ser investigados. À medida que novos genes relacionados à HPE são identificados e a interação entre seus produtos é investigada obtem-se um melhor entendimento sobre os fatores genéticos e ambientais que contribuem para o desenvolvimento normal do cérebro e HPE.

## **REFERÊNCIAS**

Barkovich AJ, Quint DJ. 1993. Middle interhemispheric fusion: an unusual variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradio* 14:431-40.



- Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW. 1996. Identification of Sonic Hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:353-6.
- Cohen MM Jr. 2006. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76:658-73.
- Cohen MM Jr. 1989. Perspectives on holoprosencephaly: Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. ***Teratology*** 40:211-35.
- Demeyer W, Zeman W, Palmer CG. 1963. The face predicts the brain: Diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arhinencephaly). *Pediatrics* 34:256-63.
- Dubourg C, Lazaro L, Pasquier L, Bendavid C, Blayau M, Le Duff F, Durou MR, Odent S, David V. 2004. Molecular screening of SHH, ZIC2, SIX3, and TGIF genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 24:43-51.
- El-Jaick KB, Fonseca RF, Moreira MA, Ribeiro MG, Bolognese AM, Dias SO, Pereira ET, Castilla EE, Orioli IM. 2000. Single median maxillary central incisor: New data and mutation review. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79:573-80.
- Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, Richieri-Costa A, Zackai EH, Massagué J, Muenke M, Elledge SJ. 2000. Mutations

in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet* 25:205-8.

Hahn JS, Plawner LL. 2004. Evaluation and management of children with holoprosencephaly. *Pediatr Neurol* 3:79-88.

Matsunga E, Shiota K. 1977. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. *Teratology* 16:261-72, dec 1977.

Mcmahon AP, Ingham P, Tabin C. 2003. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev Biol* 53:1-114.

Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, Giannotti A, Imaizumi K, Jones KL, Campo MD, Martin RA, Meinecke P, Pierpont ME, Robin NH, Young ID, Roessler E, Muenke M. 1999. The mutation spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 8:2479-88.

Odent S, Atti-Bitach T, Blayau M, Mathieu M, Aug J, Delezo de AL, Gall JY, Le Marec B, Munnich A, David V, Vekemans M. 1999. Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 8:1683-9.

Orioli IM, Castilla EE, Ming JE, Nazer J, Burle de Aguiar MJ, Llerena JC, Muenke M. 2001. Identification of novel mutations in SHH and ZIC2 in a South American (ECLAMC) population with holoprosencephaly. *Hum Genet* 109:1-6.

- Richieri-Costa A, Ribeiro LA. 2006. Holoprosencephaly-like phenotype: Clinical and genetics perspectives. *Am J Med Genet* 14:2587-93.
- Roach E, Demyer W, Conneally PM, Palmer C, Merritt AD. 1975. Holoprosencephaly: birth data, genetic and demographic analyses of 30 families. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1:294-313.
- Roessler E, Ward DE, Gaudenz K, Belloni E, Scherer SW, Donnai D, Siegel-Bartelt J, Tsui LC, Muenke M. 1997. Cytogenetic rearrangements involving the loss of the Sonic Hedgehog gene at 7q36 cause holoprosencephaly. *Hum Genet* 100:172-8.
- Strachan T and Read AP. 1996. *Human molecular genetics*. Wiley. New York.

## **5. CONCLUSÃO**

No presente estudo, nós identificamos 5 variantes no gene *SHH* dentre os 136 indivíduos com anomalias craniofaciais analisados. Os dados obtidos nesse trabalho mostram que mutações no gene Sonic Hedgehog em indivíduos com fissuras orais não sindrômicas não são comuns. Sugerimos que este gene não esteja envolvido na etiologia dessas malformações e estudos futuros de outros genes candidatos, seriam de grande importância para a elucidação das causas genéticas desses defeitos congênitos.

A não identificação de mutações no gene *SHH* indivíduos com DFN isolada e DFN sindrômica sugere que este não esteja associado a nenhum desses fenótipos, contudo, considerando a heterogeneidade etiológica dessas malformações, a investigação do gene *SHH* e de outros genes envolvidos durante o desenvolvimento craniofacial, deveria ser realizada em um grupo

amostral maior de indivíduos com DFN a fim de esclarecer melhor a origem dessas condições atípicas.

As 2 mutações missenses e os 2 polimorfismos raros encontrados no gene *SHH* nos indivíduos com o espectro HPE, mostraram a participação deste gene nos casos esporádicos. Outros genes candidados deveriam ser avaliados. A heterogeneidade etiológica e o baixo índice de mutação encontrado no respectivo trabalho mostram que não seria viável estabelecer um diagnóstico molecular de rotina deste gene em pacientes com HPE. Contudo, será possível oferecer aos pacientes, os quais foram encontradas as duas mutações, aos seus familiares e aos profissionais envolvidos com a reabilitação, informações adequadas com relação ao prognóstico e ao risco de recorrência familiar dessa anomalia.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES À REVISÃO DE LITERATURA

AHLGREN, S.C., BRONNER-FRASER, M. Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. **Curr Biol**, England, v. 9, n. 22, p. 1304-14, nov 1999.

ALCEDO, J., AYZENZON, M., VON OHLEN, T., NOLL, M., HOOPER, J.E. The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. **Cell**, United States, v. 86, n. 2, p. 221-32, jul 1996.

ARDINGER, H.H., BUETOW, K.H., BELL, G.I., BARDACH, J. et al. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. **Am J Hum Genet**, United States, v. 45, n. 3, p. 348-53, sep 1989.

BAI, C.B., AUERBACH, W., LEE, J.S., STEPHEN, D., and JOYNER, A.L. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. **Development**, England, v. 129, n. 20, p. 4753-61, oct 2002.

BAI, C.B., STELHEN, D., and JOYNER, A.L. All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. **Dev Cell**, United States, v. 6, n. 1, p. 103-15, jan 2004.

BARKOVICH, A.J., QUINT, D.J. Middle interhemispheric fusion: an unusual variant of holoprosencephaly. **AJNR Am J Neuroradiol**, United States, v. 14, n. 2, p. 431-40, mar 1993.

BARR, M., Jr., HANSON, J.W, CURREY, K., SHARO, S. et al. Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. **J Pediatr**, United States, v. 102, n. 4, p. 565-8, apr 1983.

BEATY, T.H., HETMANSKI, J.B., ZEIGER, J.S., FAN, Y.T. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. **Genet Epidemiol**, United States, v. 22, n. 1, p. 1-11, jan 2002.

BELLONI, E., MUENKE, M., ROESSLER, E., TRAVERSO, G. et al. Identification of Sonic Hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. **Nat Genet**, United States, v. 14, n. 3, p. 353-6, nov 1996.

BENDER, P.L. Genetics of cleft lip and palate. **Journal of Pediatric Nursing**, United States, v. 15, n. 4, p. 242-9, aug 2000.

BLANCO, R. , CHAKRABORTY, R., BARTON, S.A., CARREÑO, H. et al. Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. **Hum Biol**, United States, v. 73. n. 1, p. 81-9, feb 2001.

BLANTON, S.H., CORTEZ, A., STAL, S., MULLIKEN, J.B. et al. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. **Am J Med Genet A**, United States, n. 3, p. 259-62, sep 2005.

BONAITI-PELLIE, BRIARD, M.L., FEINGOLD, J., PAVY, B. An epidemiological and genetic study of facial clefting in France. **J Med Genet**, England, 1982 Feb; v. 19, n. 1, p. 8-15, fv 1982.

BROWN, S.A., WARBURTON, D., BROWN, L.Y., YU, C.Y. et al. Holoprosencephaly due to mutation in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. **Nat Gen**, United States, v. 20, n. 2, p.180-3, oct 1998.

CHAMOUN, Z., MANN, R.K., NELLEN, D., VON KESSLER, D.P. et al. Skinny hedgehog, an acetyltransferase required for palmitoylation and activity of hedgehog signal. **Science**, United States, v. 293, n. 5537, p. 2080-2084, sep 2001.

CHENEVIX-TRENCH, G., JONES, K., GREEN, A., MARTIN, N. Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha

and cleft lip and palate. **Am J Hum Genet**, United States, v. 48, n. 5, p. 1012-3, may 1991.

CHIANG, C., LITINGTUNG, Y., LEE, E., YOUNG, K.E. et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic Hedgehog* gene function. **Nature**, England, v. 383, n. 3, p. 407-13, oct 1996.

CHIQUET, B.T., LIDRAL, A.C., STAL, S., MULLIKEN, J.B. et al. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. **Hum Mol Genet**, England, v. 16, n. 18, p. 2241-8, sep 2007.

COHEN, M.M.Jr. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, United States, v. 76, n. 9, p. 658-73, sep 2006.

COHEN, M.M.Jr. Perspectives on holoprosencephaly: Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. **Teratology**, United States, n. 40, v. 3, p.211-35, sep 1989.

COHEN, M.M.Jr. The Hedgehog signaling network. **Am J Med Genet**, United States, v. 123, n. 1, p. 5-28, 2003.

DAKUBO, G.D., WANG, Y.P., MAZEROLLE, C., CAMPSALL, K., et al. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. **Development**, Englando, v. 130, n. 13, p. 2967-80, jul 2003.

DEMEYER, W., ZEMAN, W., PALMER, C.G. The face predicts the brain: Diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arhinencephaly). **Pediatrics**, United States, v. 34, p. 256-63, aug 1963.

DUBOURG, C., LAZARO, L., PASQUIER, L., BENDAVID, C. et al. Molecular screening of SHH, ZIC2, SIX3, and TGIF genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. **Hum Mutat**, United States, v. 24, n. 1, p. 43-51, jul 2004.

EI-JAICK, K.B. Análise mutacional em pacientes com holoprosencefalia: Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Fevereiro 2005.

FIELD, L.L., RAY, A.K., COOPER, M.E. et al. Genome scan for loci involved in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in families from West Bengal, India. **Am J Med Genet A**, United States, v. 130, n. 3, p. 265-71, oct 2004.

FRANCIS-WEST, P., LADHER, R., BARLOW, A., GRAVENSON, A. Signalling interactions during facial development. **Mech Dev**, Ireland, v. 75, n. 1-2, p. 3-28, jul 1998.

FRASER, F.C. The genetic of the cleft lip and palate. **Am J Hum Genet**, United States, v. 22, n. 3, p. 336-52, may 1970.

GOLDEN, J.A. Holoprosencephaly: a defect in brain patterning. **J. Neuropathol Exp Neurol**, United States, v. 57, n. 11, p. 991-9, nov 1998.

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

GUION-ALMEIDA, M.L., RICHIERI-COSTA, A., SAAVEDRA, D. et al. Frontonasal dysplasia: analysis of 21 cases and literature review. **Int J Oral Maxilfac Surg**, Denmark, v. 25, n. 2, p. 91-7, apr 1996.



HEHR, U., GROSS, C., DIEBOLD, U., WAHL, D. et al. Wide phenotypic variability in families with holoprosencephaly and a sonic hedgehog mutation. **Eur J Pediatr**, Germany, v. 163, n. 7, p. 347-52, jul 2004.

HELMS, J.A., KIM, C.H., HU, D., MINKIFF, R. et al. Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. **Dev Biol**, United States, v. 187, n. 1, p. 25-35, jul 1997.

HEUSSLER, H.S., SURI, M., YOUNG, I.D., MUENKE, M. Extreme variability of expression of a Sonic Hedgehog mutation: attention difficulties and holoprosencephaly. **Arch Dis Child**, England, v. 86, n. 4, p. 293-6, apr 2002.

HU, D., HELMS, J.A. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. **Development**, England, v. 126, n. 21, p. 4873-84, nov 1999.

INGHAN, P.W. and MCMAHON, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes Dev**, United States, v. 15, n. 23, p. 3059-87, dec 2001.

JEONG, J., MAO, J., TENZEN, T., KOTTMANN, A.H. et al. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. **Genes Dev**, United States, v. 18, n. 8, p. 937-51, apr 2004.

JEONG, Y., EPSTEIN, D.J. Distinct regulators of Shh transcription in the floor plate and notochord indicate separate origins for these tissues in the mouse node. **Development**, England, v. 130, n. 16, p. 3891-902, aug 2003.

JEZEWSKI, P., VIEIRA, A., NISHIMURA, C., LUDWUING, B. et al. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. **J Med Genet**, England, v. 40, n. 6, p. 399-407, jun 2003.

KATO, M., NAMBA, E., AKABOSHI, S., SHIIHARA, T. et al. Sonic hedgehog signal peptide mutation in a patient with holoprosencephaly. **Ann Neurol**, United States, v. 47, n. 4, p. 514-6, apr 2000.

LACBAWAN, F.L., MUENKE, M. Central nervous system embryogenesis and its failures. **Pediatr Dev Pathol**, United States, v. 5, n. 5, p. 425-47, sep-oct 2002.

LAI, K., ROBERTSON, M.J., SCHAFFER, D.V. The sonic hedgehog signaling system as a bistable genetic switch. **Biophys J**, United States, v. 86, n. 5, p. 2748-57, may 2004.

LIDRAL, A.C., ROMITTI, P.A., BASART, A.M., DORTSCHMAN, T. et al. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. **Am J Hum Genet**, *English*, v. 63, n. 2, p. 557-68, aug 1998.

LOWE, L.H., BOOTH, T.N., JOGLAR, J.M., ROLLINS, N.K. Midface anomalies in children. **Radiographics**, United States, v. 20, n. 4, p. 907-22, jul-aug 2000.

MA, Y., GONG, R., YAO, S., TAIPALE, J. et al. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. **Cell**, United States, v. 111, n. 4, p. 63-75, oct 2002.

MAESTRI, N.E., BEATY, T.H., HETMASKI, J., SMITH, E.A. et al. Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: Including candidate genes and environmental exposures in the models. **Am J Med Genet**, United States, v. 73, n. 3, p. 337-44, dec 1997.

MARAZITA, M.L., FIELD, L.L., COOPER, M.E., TOBIAS, R. et al. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. *Am J Hum Genet*, United States, v. 71, n 2, p. 349-64, aug 2002.

MARAZITA, M.L., FIELD, L.L., TUNÇBILEK, G., COOPER, M.E. et al. Genome-scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate in consanguineous families from Turkey. **Am J Med Genet A**, United States, v. 126, n. 2, p. 111-22, aprl 2004.

MARAZITA, M.L., MOONEY, M.P. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. **Clin Plast Surg**, United States, v. 31, n. 2, p. 125-40, apr 2004.

MARINI, M., CUSANO, R., DE BIASIO, P., CAROLI, F. Previously undescribed nonsense mutation in SHH caused autosomal dominant holoprosencephaly with wide intrafamilial variability. **Am J Med Genet A.**, United States,v. 117, n. 2, p. 112-5, mar 2003.

MARTI, E., BOVOLENTA, P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. **Trends Neurosci**, England, v. 25, n. 2, p. 89-96, feb 2002.

MARTÍ, E., BOVOLENTA, P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. **Trends Neurosci**, England, v. 25, n. 2, p. 89-96, feb 2002.

MARTINELLI. M. , SCAPOLI, L. , PEZZETTI, F. , CARINCI, F. Suggestive linkage between markers on chromosome 19q13.2 and nonsyndromic orofacial cleft malformation. **Genomics**, United States, v. 51, n. 2, p. 177-81, jul 1998.

MATSUNAGA, E., SHIOTA, K. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. **Teratology**, United States, v. 16, n. 3, p. 261-72, dec 1977.

MAZZOLA, H.K. Congenital malformations in the frontonasal area: their pathogenesis and classification. **Clin Plast Surg**, United States, v. 3, n. 4, p. 573-609, oct 1976.

MCCARTHY, R.A., BARTH, J.L., CHINTALAPUDI, M.R., KNAAK, C. et al. Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. **J Biol Chem**, United States, v. 277, n. 28, p. 25660-7, jul 2002.

MERRITTI, L. Part 1. Understanding the embryology and genetics of cleft lip and palate. **Adv Neonatal Care**, United States, v. 5, n. 2, p. 64-71, apr 2005.

MING, J.E., MUENKE, M. Holoprosencephaly: from Homer to Hedgehog. **Clin Genet**, Denmark, v. 53, n. 3, p. 155-63, mar 1998.

MITCHELL, L.E., MURRAY, J.C., O'BRIEN, S., CHRISTENSEB, K. Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population. **Am J Epidemiol**, United States, v. 153, n. 10, p. 1007-15, may 2001.

MUENKE, M., BONE, L.J., MITCHELL, H.F., HART, I. et al. Physical mapping of the holoprosencephaly critical region in 21q22.3, exclusion of SIM2 as a candidate gene for holoprosencephaly, and mapping of SIM2 to a region of chromosome 21 important for Down syndrome. **Am J Hum Genet**, United States, v. 57, n. 5, p. 1074-9, nov 1995.

MURRAY, J.C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. **Clin Genet**, Denmark, v. 61, n. 4, p. 248-56, apr 2002.

NANNI, L., MING, J.E., BOCIAN, M., STERNHAUS, K. et al. The mutation spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. **Hum Mol Genet**, England, v. 8, n. 13, p. 2479-88, dec 1999.

ODENT, S., ATTI-BITACH, T., BLAYAU, M., MATHIEU, M. et al. Expression of the Sonic hedgehog (SHH ) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. **Hum Mol Genet**, England, v. 8, n. 9, p. 1683-9, sep 1999.

ORIOLO, I.M., CASTILHA, E.E., MING, J.E., NAZER, J. et al. Identification of novel mutations in SHH and ZIC2 in a south american (ECLAMC) population with holoprosencephaly. **Hum Genet**, Germany, v. 109, n. 1, p. 1-6, jul 2001.

ORIOLO, I.M., VIEIRA, A.R., CASTILHA, E.E., MING, J.E., MUENKE, M. Mutational analysis of the Sonic Hedgehog gene in 220 newborns with oral clefts in a South American (ECLAMC) population. **Am J Med Genet**, United States, v. 108, n. 1, p. 12-5, fev 2002,

PORTER, J.A., YOUNG, K.E., BEACHY, P.A. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. **Science**, United States, v. 274, n. 5285, p. 255-9, oct 1996.

RICHIERI-COSTA, A., RIBEIRO, L.A. Holoprosencephaly-like phenotype: Clinical and genetics perspectives. **Am J Med Genet**, United States, v. 14, n. 23, p. 2587-93, dec 2006a.

RICHIERI-COSTA, A., RIBEIRO, L.A. PTCH mutations in four Brazilian patients with holoprosencephaly and one with holoprosencephaly-like features and normal MRI. **Am J Med Genet**, United States, v. 140, n. 23, p. 2584-6, dec 2006b.

RILEY, B.M., MURRAY, J.C. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases. **Am J Med Genet A**, United States, v. 43, n. 24, p. 3228-34, dec 2007.

ROACH, E., DEMEYER, W., CONNEALLY, P.M., PALMER, C., MERRIT, A.D. Holoprosencephaly: birth data, genetic and demographic analyses of 30 families. **Birth Defects Orig Artic Ser**, United States, v. 1, n. 2, p. 294-313, 1975.

ROELINK, H., AUGSBURGER, A., HEEMSKERK, J., KORZH, V. et al. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. **Cell.**, United States, v. 76, n. 4, p. 761-75, feb 1994.

ROESSLER, L., BELLONI, E., GUADENZ, K., JAY, P. et al. Mutations in the human sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. **Nat Gen**, United States, v. 14, n. 3, p. 357-60, nov 1996.

ROESSLER, L., BELLONI, E., GUADENZ, K., VARGAS, F. et al. Mutations in the C-terminal domain on sonic hedgehog cause holoprosencephaly. **Hum Mol Genet**, England, v. 6, n. 11, p. 1847-1853, oct 1997a.

ROESSLER, E., WARD, D.E., GAUDEZ, K., BELLONI, E. et al. Cytogenetic rearrangements involving the loss of the Sonic Hedgehog gene at 7q36 cause holoprosencephaly. **Hum Genet**, Germany, v. 100, n. 2, p. 172-81, aug 1997b.

ROESSLER, E., MUENKE, M. Holoprosencephaly: a paradigm for the complex genetics of brain development. **J Inherit Metab Dis**, Netherland, v. 21, n. 5, p. 481-97, aug 1998.

ROESSLER, E., MUENKE, M. Midline and laterality defects: left and right meet in the middle. **BioEssays**, United States, v. 23, n. 10, p. 888-900, oct 2001.

ROESSLER, E., MUENKE, M. How a Hedgehog might see holoprosencephaly. **Hum Mol Genet**, England, v. 12, n. 1, p. 15-25, apr 2003.

ROESSLER, E., DU, Y.Z., MULLOR, J.L., CASAS, E. et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 100, n. 23, p. 13424-9, nov 2003.

SCAPOLI, L., PEZZETTI, F., CARINCI, F., MARTINELLI, M. et al. Lack of linkage disequilibrium between transforming growth factor alpha Taq I polymorphism and cleft lip with or without cleft palate in families from Northeastern Italy. **Am J Med Gene**, United States, v. 75, n. 2, p. 203-6, jan 1998.

SCHIMMENTI, L.A., DE LA CRUZ, J., LEWIS, R.A., KARKERA, J.D. et al. Novel mutation in sonic hedgehog in non-syndromic colobomatous microphthalmia. **Am J Med Genet A**, United States, v. 116, n. 3, p. 215-21, jan 2003.

SCHUTTE, B.C. & MURRAY, J.C. The many faces and factors of orofacial clefts. **Hum Mol Genet**, England, v. 8, n. 10, p. 1853-9, 1999.

SEDANO, H.O., COHEN, M.M. Jr., JIRASEK, J., GORLIN, R.J. Frontonasal dysplasia. **J Pediatr**, United States, v. 76, n. 6, p. 906-13, jun 1970.

SEDANO, H.O., GORLIN, R.J. Frontonasal malformation as a field defect and in syndromic associations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, United States, v. 65, n. 6, p. 704-10, jun 1988.

SEPPALA, M., MICHAEL, J.D., DAVID, C.M., CHEN-MING, F. et al. Gas 1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interact with sonic hedgehog, **J Clin Invest**, United States, v. 117, n. 6, p. 1575-84, jun 2007.

SEZGIN, I., SUNGU, S., BEKAR, E., CETIN, M., and CERAN, H. Cyclopia-astomia-agnathia-holoprosencephaly association: a case report. **Clin Dysmorphol**, England, v. 11, n. 3, p. 225-6, jul 2002.

SHIM, Y.H., BAE, S.H., KIM, J.H., KIM, K.R. et al. A novel mutation of the human 7- dehydrocholesterol reductase gene reduces enzyme activity in patients with holoprosencephaly. **Biochem Biophys Res Commun**, United States , v. 315, n. 1, p.219-23, feb 2004.

SILVA FILHO, O.G., FERRARU JUNIOR, F.M., ROCHA, D.L. & FREITAS, J.A.S. Classificação das fissuras lábio-palatais: breve histórico, considerações clínicas e sugestão de modificação. **Revista Brasileira de Cirurgia**, Brasil, v. 82, n. 2, p. 59-65, 1992.

SIMON, E.M., HEVNER, R.F., PINTER, J.D., CLEGG, N.J. et al. The middle interhemispheric variant of holoprosencephaly. **AJNR Am J Neuroradiol**, United States, v. 23, n. 1, p. 151-156, jan 2002.



SLANEY, S.F., GOODMAN, F.R., EILER-WALSMAS, B.L.C., HALL, B.D. et al. Acromelic Frontonasal Dysostosis. **Am J Med Genet**, United States, v. 83, n. 2, p. 109-16, mar 1999.

SPINA, V., PSILLAKIS, J.M., LAPA, F.S., FERREIRA, M.C. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo**, Brasil, v. 27, n. 1, p. 5-6, jan-fev 1972.

STEIN, J., MILLIKEN, J.B., STAL, S., GASSER, D.L. et al. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. **Am J Hum Gene**, United States, v. 57, n. 2, p. 257-72, aug 1995.

STONE, D.M., HYNES, M., ARMANINI, M., SWANSON, T.A. et al. The tumour suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. **Nature**, England, v. 384, n. 6605, p. 129-34, nov 1996.

SUELO, G., FERNANDES, M.C. Frontonasal dysostosis, callosal agenesis, crossed fused ectopia, tibial hemimelia, and preaxial polydactyly of feet: severe expression of the acrocallosal syndrome?. **Am J Med Genet.**, United States, v. 46, n. 4, p.355-7, jun 1993.

TAIPALE, J., BEACHY, P. The hedgehog and Wnt signaling pathway in cancer. **Nature**, England, v. v. 411, n. 6835, p. 349-54, may 2001.

TALAVORA, M., & CERENKA, J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. **Am J Med Genet**, United States, v. 75, n. 2, p. 126-37, jan 1998.

THOMPSON & THOMPSON. *Genética Médica*, 6º Edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2002.

TWIGG, S.R., KAN, R., BABBS, C., BOCHUKOVA, E.G., et al. Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 101, n. 23, p. 8652-7, jun 2004.

TWIGG, S.R., MATSUMOTO, K., KIDD, A.M., GORIELY, A. et al. The origin of EFNB1 mutations in craniofrontonasal syndrome: frequent somatic mosaicism and explanation of the paucity of carrier males. **Am J Hum Genet**, United States, v. 78, n. 6, p. 999-1010, jun 2006.

VERLOES, A., GILLEROT, Y., WALCZAK, E., VAN MALDERGEM, L., KOULISCHER, L. Acromelic frontonasal dysplasia: further delineation of a subtype with brain malformations and polydactyly. **Am J Med Genet**, United States, v. 42, n. 2, p. 180-3, jan 1992.

WEED, M., MUNDLOS, S., OLSEN, B.R. The role of sonic hedgehog in vertebrate development. **Matrix Biol**, Germany, v. 16, n. 2, p. 53-8, may 1997.

WHITING, J. Craniofacial abnormalities induced by the ectopic expression of homeobox genes. **Mutat Res**, Netherlands, n. 1-2, p. 97-112, dec 1997.

WILKIE, A.O. and MORRISS-KAY, G.M. Genetics of craniofacial development and malformation. **Nat Rev Genet**, England, v. 2, n. 6, p. 458-68, jun 2001.

WONG, F.K., HAGBERG, C., KARSTEN, A., LARSON, O. et al. Linkage analysis of candidate regions in Swedish nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate families. **Cleft Palate Craniofac J**, United States, v. 37, n. 4, p. 357-62, jul 2000.

WYSZYNSKI, D.F., MAESTRI, N., LEWANDA, A.F., MCLNTOSH, I. et al. No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations. **Hum Hered**, English, v. 47, n. 2, p. 101-9, mar-apr 1997.

ZUCCHERRO, T.M., COOPER, M.E., MAHER, B.S., DAACK-HIRSCH, S. et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. **N Engl J Med**, United States, v. 351, n. 8, p. 769-80, aug 2004.

## ANEXO 1



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_  
portador do RG de nº \_\_\_\_\_ residente à Rua (Av.) \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, responsável pelo (a) \_\_\_\_\_

menor \_\_\_\_\_  
matriculado no HRAC com o nº \_\_\_\_\_, concordo em participar (autorizo sua participação) na pesquisa de Título: Análise Mutacional do Gene Sonic Hedgehog (SHH) em pacientes com anomalias craniofaciais, realizada pela pesquisadora Claudia Danielli Pereira Bertolacini, sob a orientação da Prof. Dr. L

A referida pesquisa tem por objetivo:

1. Determinar se o gene SHH desempenha um papel nas fissuras orais não-sindrômicas, e nas anomalias craniofaciais da linha média com ou sem envolvimento do sistema nervoso central, incluindo as Holoprosencefalias e as Displasias Fronto-nasais.
  2. Oferecer informação atualizada e orientação adequada ao paciente, seus familiares e profissionais que estejam envolvidos com a reabilitação, particularmente no grupo das malformações complexas da linha média do SNC dado o desconhecimento destas condições dentro da classe médica geral.
- e fui orientado do seguinte:
1. Serão coletados 2ml de sangue do paciente e seus pais.
  2. A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta.
  3. Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família.
  4. Vocês estarão colaborando para aumentar o nosso conhecimento sobre as possíveis causas das fissuras orais não-sindrômicas.
  5. Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
  6. Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulem entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
  7. Sempre que ocorrerem publicações científicas a identidade do paciente será mantida em absoluto sigilo.
  8. Todos os resultados de exames moleculares estarão disponíveis no prontuário do paciente no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho).
  9. Caso queira apresentar reclamações em relação à participação na pesquisa, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 na Unidade de Ensino e Pesquisa ou pelo telefone (14) 3235-8183.

Estou ciente também de que minha participação é voluntária e dela posso desistir a qualquer momento, sem explicar os motivos e sem comprometer meu tratamento no HRAC.

Bauru, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente (Responsável)



### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) \_\_\_\_\_, portador da cédula de identidade \_\_\_\_\_, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA**, devidamente explicada pelos

profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica ou Art. 29º do Código de Ética do Fonoaudiólogo).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de .

\_\_\_\_\_  
Paciente (Responsável)

\_\_\_\_\_  
Pesquisador(a) responsável