

Investigação de desequilíbrios genômicos em indivíduos com fendas orais e coloboma e (ou) micro/anoftalmia

Palavras-Chave: desequilíbrios genômicos, fendas orais, micro/anoftalmia

Autores/as:

Catharina Augusta de A. Pimentel, UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, UNICAMP

Isabella Lopes Monlleó, Universidade Federal de Alagoas

Ilária Cristina Sgardioli, Unicamp

INTRODUÇÃO:

As fendas orais (FO) têm prevalência estimada de 1:700 -1000 indivíduos, sendo que as fendas orais sindrômicas representam cerca de 30% dos casos. Estas são definidas na presença de anomalias associadas e (ou) déficit cognitivo, predominando defeitos de sistema nervoso central e oculares. Diferentes etiologias são conhecidas, entre as quais os desequilíbrios genômicos (DG). O espectro MAC (Microftalmia/Anoftalmia/Coloboma) ocorre em 1/7.000 nascimentos, sendo que 33-95% dos casos apresentam defeitos extraoculares, com destaque para FO e alterações do sistema nervoso; condições monogênicas predominam neste grupo. Nesta, os DG poderiam ter relevância. Esta associação de FO e espectro MAC tem prevalência desconhecida e tem sido pouco investigada e foi detectada em um contingente significativo dos casos registrados na Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais (BBAC), sediada na Unicamp e com cerca de 2200 casos registrados.

METODOLOGIA:

1. Seleção da casuística

Foram incluídos indivíduos selecionados na BBAC, que apresentaram fenda oral de qualquer tipo com anomalias do complexo coloboma e (ou) micro/anoftalmia, sendo de qualquer idade ou sexo e com etiologia desconhecida. Os critérios de exclusão foram indivíduos com doenças monogênicas ou com outras etiologias definidas que apresentem fenda oral e micro/anoftalmia.

2. Técnica

Para realização da Técnica de Chromosomal Microarray Analysis (CMA) foi utilizado DNA total obtido no biorrepositório específico. Prévio à realização da técnica, a integridade e pureza das amostras foi testada, sendo possível a utilização de 25 amostras. Para a técnica de CMA foram utilizados os chips CytoScanTM 750K Array ou CytoScanTM HD Array (Affymetrix®, Santa Clara, CA, USA). A análise e a interpretação dos dados utilizaram o programa Chromosome Analysis Suite (ChAS), que é uma plataforma personalizada para a técnica de CMA e disponibilizado gratuitamente pelo fabricante, e o protocolo previamente padronizado no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica.

3. Revisão bibliográfica

Realizou-se um levantamento bibliográfico na ferramenta de pesquisa do *PubMed*, para a investigação de prevalência e etiologias associadas aos fenótipos investigados no projeto (complexo MAC e FO). Além disso, analisou-se os genes e as síndromes envolvidos na causativa do complexo MAC associado a FO.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Análise do CMA

Entre os 2.200 casos registrados na BBAC, foram detectados 28 casos com FO associados ao espectro MAC, todos esporádicos. Até o momento 20 apresentaram material biológico disponível e com qualidade adequada para análise e, portanto, realizou-se a técnica de CMA. Dos casos já investigados, 19 apresentaram os parâmetros de qualidade dentro do indicado pelo fabricante, e apenas um caso teve os parâmetros inconclusivos e necessita de técnica complementar para a finalização (Figura 1).

Os resultados da análise estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição da presença e o número de CNVs* e genes presentes nestas regiões

| Número do caso | Presença de CNV | | Genes relacionados ao caso clínico investigados | Coordenada genômica |
|----------------|--------------------|---------------|---|-----------------------------|
| | Total de variantes | Total de VOUS | | |
| 1 | 37 | 4 | PCYT1A | 3q29(195751951_195968643)x3 |
| 2 | 29 | 1 | Nenhum | - |
| 3 | 7 | 1 | Nenhum | - |
| 4 | 26 | 7 | Nenhum | - |
| 5 | 25 | 4 | PDGFRA | 3q29(195460464_195743997)x3 |
| 6 | 16 | 3 | Nenhum | - |
| 7 | 36 | 3 | Nenhum | - |
| 8 | 5 | 1 | Nenhum | - |
| 9 | 4 | 2 | Nenhum | - |
| 10 | 8 | 2 | PRDM16 | 1p36.32(3224676_3336608)x3 |
| 11 | 3 | 0 | Nenhum | - |
| 12 | 6 | 0 | Nenhum | - |
| 13 | 4 | 0 | Nenhum | - |
| 14 | 4 | 0 | Nenhum | - |
| 15 | - | - | - | - |
| 16 | - | - | - | - |
| 17 | 2 | 0 | Nenhum | - |
| 18 | 0 | 0 | Nenhum | - |
| 19 | 4 | 0 | Nenhum | - |
| 20 | 2 | 0 | Nenhum | - |

Legenda (Tabela 01): CNVs (Copy number variation); VOUS (Variant of Unknown Significance), PCYT1A (Fosfato citidililtransferase 1, colina, alfa), PDGFRA (Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas), PRDM16 (Proteína que contém o domínio 16).

Os genes *PCYT1A* (3q29, Fosfato citidililtransferase 1, colina, alfa), *PDGFRA* (4q12, Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas) e *PRDM16* (1p36.32, Proteína que contém o domínio 16), descritos respectivamente nos indivíduos 1, 5 e 10 foram identificados em região de VOUS, porém suas coordenadas genômicas não foram identificadas em regiões críticas e, portanto, não estão estabelecidas como causativos de defeitos congênitos. Não há descrição, também, de associação com fenda oral ou coloboma e (ou) micro/anoftalmia relacionados a esses genes.

Apesar dos parâmetros de qualidade não estarem dentro da referência, o padrão evidenciado como resultado do caso 16 sugere a presença de um cromossomo 4 recombinante (Figura 1A e 1B). Para sua confirmação, a técnica escolhida foi o exame de cariótipo de sangue periférico com banda G do trio (propósito e genitores). A família foi contatada e aguarda o comparecimento, após à pandemia, para execução desta técnica.

Figura 1A

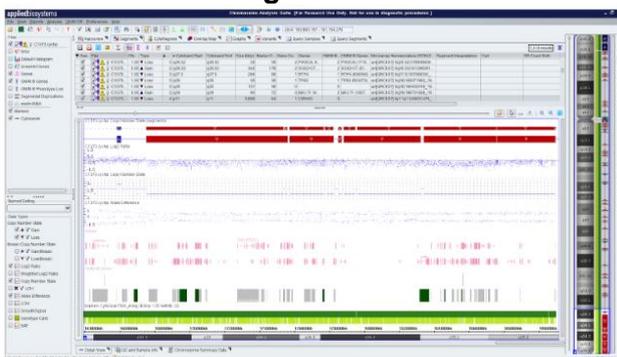


Figura 1B

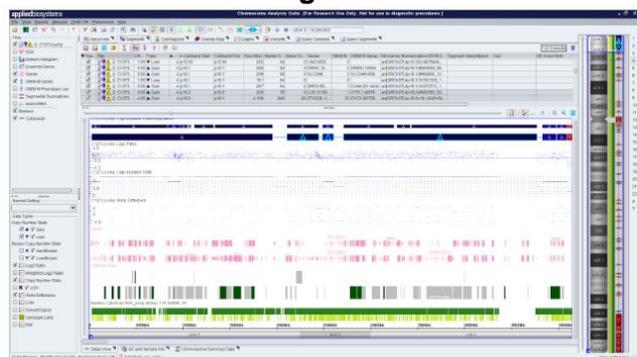


Figura 1: 1A - Representação esquemática da suspeição do cromossomo 4 recombinante do caso 16 obtido no Programa ChAS, evidenciando uma deleção na extremidade do braço longo e 1B - Representação esquemática da suspeição do cromossomo 4 recombinante do caso 16 obtido no Programa ChAS evidenciando uma duplicação na extremidade do braço curto.

2. Revisão Bibliográfica

Após a seleção dos artigos, foram analisados os genes mais prevalentes e suas respectivas etiologias para complexo MAC e(ou) FO. Vale ressaltar ainda que, há muitos estudos a serem realizados na investigação das etiologias de MAC e(ou) FO, e que durante a revisão as causas foram apontadas como pouco elucidadas, sendo dez para estes fenótipos. Entretanto, foi sugerido: aberrações cromossômicas que representam entre 25-30% de pacientes com AO/MO, sendo 20-45% dos casos sindrômicos (SLAVOTINEK, 2011); condições monogênicas e teratogênicas, como infecções ou uso de substâncias nocivas ao longo da gestação.

Além disso, observou-se que alguns genes descritos em alguns casos ainda estão sendo investigados para FO e(ou) MAC, mas não são determinados como causativos de doenças, como o gene *YAP1* (*Yes-associated protein 1*) localizada em 11q13, no qual houve descrição do complexo MAC associado à FO e outras alterações.

Após uma pesquisa nos artigos e no OMIM, obteve-se a Tabela 2, no qual estão relacionados os genes mais prevalentes e reconhecidos como causadores de MAC e (ou) FO e suas respectivas síndromes associadas.

Tabela 02: Descrição dos genes reconhecidos como causadores de MAC e (ou) FO e suas respectivas síndromes.

| Genes | Fenótipo | Doenças associadas | Prevalência |
|----------------|----------|---|-------------|
| <i>SOX2</i> | AO/MO | Microftalmia sindrômica 3, Hipoplasia do Nervos ópticos. | 15-20% |
| <i>OTX2</i> | AO/MO | Deficiência do hormônio Pituitário e Distrofia retinal de início precoce | 2-8% |
| <i>PAX6</i> | AO | Síndrome de Gillespie, Aníridia, Catarata com distrofia córnea de início tardio | 1-2% |
| <i>STRA6</i> | AO/MO/FO | Microftalmia sindrômica 9 e Microftalmia isolada com coloboma 8 | - |
| <i>ALDH1A3</i> | MO/AO | Microftalmia isolada 8 | - |
| <i>RARB</i> | AO/MO | Microftalmia sindrômica 12 | - |
| <i>RAX</i> | AO/MO | Microftalmia isolada 3 | - |
| <i>VSX2</i> | AO/MO | Microftalmia com coloboma 3 e Microftalmia isolada 2 | 1,5% |
| <i>VAX1</i> | AO/MO/FO | microftalmia sindrômica 11 | - |

Legenda (Tabela 2): *SOX2* (*Sex-determining region Y-box 2*); *OTX2* (*Orthodenticle homeobox 2*); *PAX6* (*Paired box 6*); *STRA6* (*Stimulated by retinoic acid 6*); *ALDH1A3* (*Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3*); *RARB* (*Retinoic acid receptor, beta*); *FOX3* (*Forkhead box E3*); *VSX2* (*Visual system homeobox 2*); AO (*Anoftalmia*) e MO (*Microftalmia*) e FO (*Fenda oral*).

3. Discussão

A investigação de desequilíbrios genômicos em FOS, como os casos descritos neste trabalho, têm sido investigadas por *CMA* em poucos estudos. Este é o primeiro estudo que aborda a associação entre esses dois defeitos congênitos.

Muitos defeitos congênitos estruturais estão associados à FO. Em um dos estudos analisado Forrester e Merz (2006) e colaboradores, houve uma taxa acima do esperado relacionando FO com AO/MO (1,69%) quando se comparou esses defeitos sem a FO, sendo o terceiro defeito mais comum. Destaca-se que esses defeitos congênitos nem sempre estarão isolados.

A associação de fenda com coloboma e(ou) micro/anoftalmia configura quadro de anomalias congênitas múltiplas, que têm prevalência estimada de desequilíbrios genômicos em cerca de 15%. Assim, seria esperado que a técnica de *CMA* fosse resolutive nesta proporção. Dos 20 casos investigados, 19 não apresentaram desequilíbrios genômicos patogênicos e apenas 1 apresentou alteração inconclusiva (1/20, 0,05%), sugestiva de cromossomo 4 recombinante.

Os cromossomos recombinantes são rearranjados estruturalmente com uma nova composição segmentar resultante do “*crossing-over*” durante a gametogênese, e geralmente se origina de genitores portadores de inversões ou inserções. Para esta investigação, o exame de cariótipo seria um método de investigação complementar ao *CMA*.

O coloboma e(ou) micro/anoftalmia tem prevalência de 0,9-4,9: 10.000 indivíduos nascidos vivos, sendo que as formas sindrômicas compreendem cerca de 1/3 dos casos de ano/microftalmia. Já foram descritos cerca de 39 genes conhecidos que estão associados a ano/microftalmia, sendo os principais: *SOX2*, *OTX2* e *FOXE3*, como descritos na tabela acima. Não foram evidenciados desequilíbrios genômicos envolvendo essas regiões gênicas nesta amostra.

Durante a revisão, houve um considerável número de artigos relacionando a alteração no gene *TMEM107* (Proteína transmembrana 107) com os fenótipos descritos. Essa mutação está relacionada às ciliopatias humanas, onde há defeitos na regulação proteica dos cílios primários. Apesar da mutação estar associada à Síndrome Oral-facial-digital, de Meckel Gruber e Joubert, não houve confirmação para os complexos MAC e(ou) FO. Porém, pesquisas em modelo animal detectaram algumas disfunções morfológicas craniofaciais (AO/MO e FO) no período embrionário, resultantes dessa variante. Logo, a investigação e análise deste gene pode, futuramente, ser uma das possibilidades diagnósticas dos casos de complexo MAC e(ou) FO, à medida que outras pesquisas e aprofundamentos neste ramo sejam encaminhadas.

Até o momento, os resultados deste estudo mostraram que apesar do quadro de anomalias congênitas múltiplas, não ocorreram desequilíbrios genômicos investigados no estudo. Além deste resultado, pode-se observar que há estudos, no qual a prevalência entre o complexo FO e complexo MAC se mostrou presente e com altas taxas (Forrester et Al., 2005). Desse modo, é possível que a melhor estratégia para investigação desta associação, na maioria dos casos seja a busca por variantes patogênicas por meio de sequenciamento de alto desempenho. Mesmo assim, a presença de um caso de cromossomo 4 recombinante, ainda a ser confirmada, abre a possibilidade de que aberrações cromossômicas possam também ser consideradas durante a investigação.

CONCLUSÕES:

Foram identificados 28/2.200 casos de associação de fenda oral com micro/anoftalmia na BBAC, configurando prevalência de 0,013. Não foram encontrados desequilíbrios genômicos patogênicos nos 20 casos investigados até o momento. Em um caso, em que há suspeita de um cromossomo 4 recombinante, técnicas complementares estão indicadas.

Ademais, frente aos achados clínicos, revisão bibliográfica e análise laboratorial, o exame por CMA e cariótipo podem ser indicados, porém a técnica por *microarray* não é a melhor estratégia de início, uma vez que as amostras podem ser majoritariamente gênicas e, portanto, outras metodologias podem ser indicadas.

Esse tipo de estudo, auxilia no desenvolvimento e elaboração de melhores técnicas diagnósticas, no conhecimento de síndromes e na estruturação de abordagens clínicas, com o intuito de promover melhorias psicomotoras e psicossociais aos pacientes e seus familiares que muitas vezes não estão habituados às situações rotineiras envolvendo as alterações encontradas.

Em suma, pode-se destacar a relevância do projeto em identificar estratégias que melhorem os diagnósticos de indivíduos, uma vez que alguns são tardios; registrar continuamente a ocorrência dos distúrbios genômicos e, conseqüentemente, suas alterações clínicas e aumentar a informação a respeito destes casos clínicos, já que há grande prevalência de anomalias craniofaciais. Deste modo, consegue-se delinear melhor os distúrbios genômicos que impactam nas fendas orais e na micro/anoftalmia.

BIBLIOGRAFIA

MILLER, David T., et al. **Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies.** The American Journal of Human Genetics, 2010.

LESLIE, Elizabeth J., et al. **Genetics of cleft lip and cleft palate.** American Journal Of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 2013.

- SETÓ-SALVIA, Núria; STANIER, Philip. **Genetics of cleft lip and/or cleft palate: Association with other common anomalies**. European Journal Of Medical Genetics, 2014.
- RITTLER, Monica et al. **Associated anomalies among infants with oral clefts at birth and during a 1-year follow-up**. American Journal Of Medical Genetics Part A, 2011.
- GREGORY-EVANS, Cheryl y et al. **Ocular coloboma: a reassessment in the age of molecular neuroscience**. Journal Of Medical Genetics, 2004.
- PATEL, Aara; SOWDEN, Jane C.. **Genes and pathways in optic fissure closure. Seminars in cell & developmental biology**. Elsevier, 2017.
- ROOS, Laura et al. **Congenital Microphthalmia, Anophthalmia and Coloboma among Live Births in Denmark**. Ophthalmic Epidemiology, 2016.
- MATÍAS-PÉREZ, Diana; GARCÍA-MONTALVO, Iván Antonio; ZENTENO, Juan Carlos. **Genes relacionados con microftalmia y anoftalmia hereditarias**. Gaceta de México, 2017.
- WILLIAMSON, Kathleen A.; FITZPATRICK, David R.. **The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma**. European Journal Of Medical Genetics, 2014.
- OMIM. Online mendelian inheritance in man. Disponível em: [<https://www.omim.org/>](https://www.omim.org/). Acesso em: 22 abr. 2019.
- FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICA. Projeto crânio-face brasil. Disponível em: <https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/projeto-cranio-face-brasil>>. Acesso em: 22 abr. 2019.
- SGARDIOLI, Ilária Cristina. **Investigação da Síndrome de deleção 22q11.2 utilizando diferentes estratégias para aplicação em saúde**. Campinas, Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas, 2018.
- VOLPE-AQUINO, Roberta M. et al. **CranFlow: An Application for Record-Taking and Management Through the Brazilian Database on Craniofacial Anomalies. Birth Defects Research**. Campinas, Wiley Online Library, 2017.
- VIEIRA, Társis Antonio Paiva. **Guia prático para interpretação de desequilíbrios genômicos identificados pelas técnicas de chromosomal microarray analysis (CMA)**. Campinas, 2018.
- KEARNEY, Hutton M et al. **American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants**. Genetics In Medicine, 2011.
- ALLANSON, Judith E. et al. **Elements of morphology: Introduction**. American Journal Of Medical Genetics Part A, 2009.