

# Análise genética de problemas craniofaciais – revisão da literatura e diretrizes para investigações clínico-laboratoriais (parte 2)

Ricardo Machado Cruz\*, Silviene Fabiana de Oliveira\*\*

## Resumo

**Objetivo:** esse artigo tem como objetivo ser uma fonte de informação acerca das técnicas e análises genéticas mais utilizadas em investigações clínicas e laboratoriais visando a identificação e a caracterização de genes relacionados a doenças ou distúrbios complexos, especialmente os que atingem as estruturas do crânio e da face. **Metodologia:** são traçadas algumas diretrizes para guiar os futuros pesquisadores nos processos de seleção de amostras e obtenção de heredogramas para estudos genéticos e fornecidos conceitos e princípios gerais que norteiam métodos de análises genéticas. Tais métodos exigem conhecimento a respeito de transmissão gênica, genética molecular e utilização de marcadores moleculares, assim como envolvem o domínio de técnicas laboratoriais como, por exemplo, reações de polimerização em cadeia (PCR), eletroforese e seqüenciamento de DNA. **Resultados e Conclusões:** as análises genéticas, em especial as análises de segregação e de ligação, representam importantes ferramentas à disposição dos pesquisadores na tentativa de relacionar fenótipos a genes específicos e na busca da exata localização cromossômica dos mesmos. Espera-se com esse artigo que os cirurgiões-dentistas clínicos possam começar a perceber a importância do assunto e buscar se aprofundar nessa área.

**Palavras-chave:** Heredogramas. Análise de segregação. Análise de ligação. Máis formações craniofaciais.

## INTRODUÇÃO

A necessidade de um melhor entendimento dos fatores genéticos que levam ao desenvolvimento de distúrbios que alteram o crescimento e desenvolvimento normal das estruturas do crânio e da face tem aumentado o interesse da classe odontológica pela genética humana. O presente trabalho visa auxiliar esses profissionais, revisando

alguns conceitos básicos e sugerindo diretrizes, no que diz respeito à coleta da amostra, à elaboração de heredogramas para investigações clínicas e laboratoriais, bem como apresentar os principais métodos de análise genética, que norteiam a elaboração de estudos genéticos.

Esses métodos exigem um conhecimento mais aprofundado de genética molecular, de como li-

---

\* Mestre em Odontologia - Ortodontia pela UFRJ. Doutor em Biologia Animal – Genética pela UnB.

\*\* Mestre em Ciências Biológicas - Genética pela USP (Ribeirão Preto). Doutora em Ciências Biológicas - Genética pela USP (Ribeirão Preto).

dar com as mais diversas técnicas de laboratório e como avaliar os dados obtidos. Com essas ferramentas, os pesquisadores buscam relacionar determinados fenótipos com genes específicos, além de procurar conhecer a exata localização cromossômica de cada um deles. Com isso, novas condutas diagnósticas e terapêuticas poderão ser propostas no futuro.

## **DIRETRIZES PARA INVESTIGAÇÕES GENÉTICAS**

### **Escolha do problema**

Ao se escolher o fenótipo a ser investigado deve-se procurar saber se estudos prévios feitos em humanos e/ou evidências de estudos feitos em animais dão sustentação à tese de que existe uma base genética para essa condição. Além disso, deve-se certificar se existem métodos eficazes para mensurar ou quantificar a gravidade do problema, como, por exemplo, medir e descrever diferenças na forma e no tamanho dos órgãos afetados, visando classificar o grau de comprometimento e determinar a idade de acometimento ou surgimento dos sinais e sintomas da doença ou da condição estudada. Condições favoráveis para reunir pacientes que mostrem uma história familiar do fenótipo investigado são um fator muito importante, uma vez que a melhor evidência no estabelecimento da contribuição relativa de genes e ambiente na definição de certos parâmetros craniofaciais em epidemiologia genética é dada por estudos familiares, devido à maior incidência do problema em parentes de probandos afetados<sup>6,14,17</sup>.

Um grande dilema no tratamento clínico dos problemas craniofaciais diz respeito às respostas variáveis que diferentes pacientes apresentam a um mesmo tratamento<sup>11</sup>. Em geral, quanto maior o componente genético, pior é o prognóstico de sucesso em um tratamento. Há esperanças de que em um futuro próximo seja possível avaliar, previamente ao tratamento, a resposta individual ao mesmo, baseado em perfis genéticos. Outra questão é com relação à época de expressão de um

dado gene e se essa seria a melhor época para o tratamento<sup>11</sup>.

Em outras palavras, pode-se, de fato, alterar a expressão do fenótipo de um determinado padrão morfogenético, mas o grau de sucesso que pode ser alcançado irá depender: da contribuição relativa de cada fator na etiologia do problema existente e da extensão na qual o padrão morfológico pode ser influenciado pelo tratamento clínico<sup>14</sup>. Apesar das restrições, estima-se que, nas próximas décadas, um amplo escaneamento pré-natal para anomalias craniofaciais seja, possivelmente, um procedimento de rotina<sup>11</sup>.

### **Seleção da amostra e obtenção de herodogramas**

O desenho do estudo a ser empregado e a escolha da análise estatística norteiam a busca da amostra. Porém, em todos os casos, e em especial para análises de segregação e de ligação, é imprescindível uma identificação e caracterização precisa da mesma, em especial quanto aos critérios de inclusão e exclusão de probandos e na exatidão na caracterização clínica do fenótipo em questão<sup>8,11</sup>.

Populações isoladas e geneticamente homogêneas são consideradas ideais em estudos dessa natureza. Como essas populações são muito raras, uma estratégia é a estratificação de populações não ideais, buscando assim minimizar um viés nos resultados<sup>6</sup>. A estratégia mais utilizada é a estratificação da mesma quanto à ancestralidade, muitas vezes confundida com estratificação racial. De acordo com dados genéticos, não existe suporte para a categorização de humanos em diferentes raças, pois há maior diversidade de genótipos entre indivíduos de um mesmo grupo étnico que entre eles<sup>15,18,21</sup>. Além do que, a maior parte das populações humanas apresenta constituições complexas, o que inclui sub-estruturação e miscigenação genética. A população brasileira, por exemplo, apresenta uma alta diversidade étnica, sendo que a cor da pele, principal característica morfológica utilizada em estratificações, já foi demonstrada como

um pobre indicador de ancestralidade genética<sup>16</sup>. O conhecimento da ancestralidade dos indivíduos da amostra é uma informação relevante, pois, em geral, os alelos apresentam uma origem única em uma população e/ou região geográfica específica e, por conseqüência, uma maior freqüência dentre os descendentes dos mesmos<sup>4</sup>.

Para análise de ligação, a análise de famílias em que há agregação com no mínimo três gerações de indivíduos acessíveis para coleta de amostras biológicas é a mais comum na busca da base genética de um dado fenótipo complexo. Nesses casos, a família é geralmente acessada a partir de um probando e não aleatoriamente na população<sup>19</sup>. No caso dos problemas no complexo craniofacial, para que as famílias sejam incluídas no estudo confirma-se o diagnóstico utilizando exames clínicos, fotográficos e radiográficos de rotina dos cirurgiões-dentistas. De acordo com as resoluções do Ministério da Saúde em vigor no Brasil, os indivíduos (probandos e familiares) ou seus responsáveis legais devem ler, concordar e assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para integrar a amostra. É importante frisar que tanto os protocolos de estudo como o TCLE devem ser aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Instituição que coordena a investigação e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

A pesquisa nas famílias tem que ser realizada de forma sistemática. O adequado é desenhar o heredograma buscando o maior volume de componentes possíveis, independente do *status* fenotípico dos mesmos e estendê-lo pelos dois lados da família, mesmo que os dados sugiram que a segregação do fenótipo ocorre em apenas um deles. O *status* fenotípico é questionado um a um sem a omissão de ramos que, porventura, pareçam não apresentar membros afetados. Visando não ser tendencioso, perguntas como "Quem tem esse problema na família?" não devem ser formuladas.

Como dependem da memória dos entrevistados, os históricos familiares tendem a ser inexatos,

incluindo tanto falsos positivos quanto negativos, porém há uma tendência para as famílias superestimarem os relatos de doenças, particularmente quando o diagnóstico é incerto.

O *status* de cada componente do heredograma, afetado ou não, deve ser também confirmado seguindo-se os mesmos critérios utilizados para a avaliação dos probandos, sendo que quando não é possível a confirmação precisa devem ser assinalados nos heredogramas como "*status* desconhecido". Para características de aparecimento tardio, como, por exemplo, durante o surto de crescimento da puberdade ou na fase adulta<sup>10</sup>, é comum estabelecer uma idade de corte e classificar os indivíduos não afetados abaixo dessa idade como "*status* desconhecido".

A busca de validação das histórias familiares sugere que o relato fenotípico por parte dos probandos é muito confiável para parentes de primeiro grau (tipicamente 80-90%), mas muito menor para parentes de segundo grau. Dessa forma, é importante a consulta de outros membros da família que podem reportar casos omitidos<sup>19</sup>, assim como confirmar ou não as informações já fornecidas pelo probando.

Heredogramas podem ser desenhados manualmente ou com a utilização de ferramentas para edição gráfica de dados, como por exemplo, o programa PELICAN 1.1.0 - (Pedigree Editor for Linkage Computer Analysis)<sup>5</sup>. Para tanto, devem-se utilizar os símbolos convencionais, sendo que os probandos são indicados por uma seta<sup>6</sup> (Fig. 1).

O desenho dos heredogramas é analisado inicialmente por inspeção visual e em seguida utilizando programas computacionais, visando executar análises matemáticas mais complexas. O objetivo é verificar se há um componente genético na etiologia do problema nas famílias estudadas e, em caso positivo, determinar o padrão ou padrões de herança do mesmo, assim como outras variáveis genéticas como penetrância, herdabilidade e freqüência do(s) gene(s) principal(is).

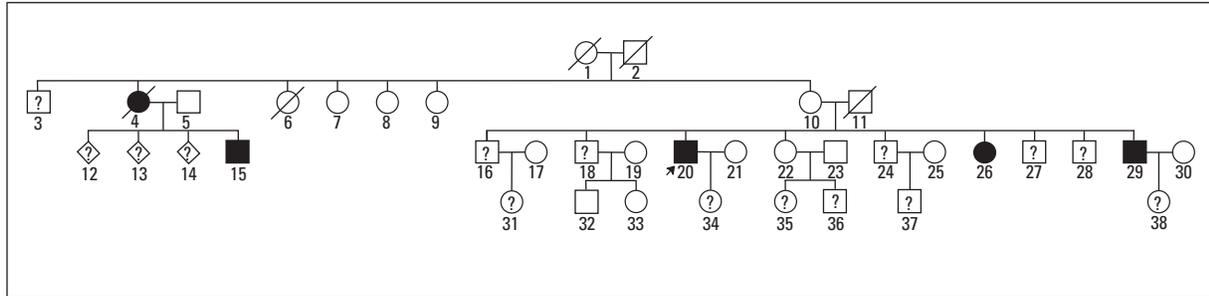


FIGURA 1 - Heredograma, obtido a partir do probando (indivíduo 20 marcado com uma seta), mostrando a segregação do prognatismo mandibular (indivíduos afetados apresentam as figuras preenchidas) em quatro gerações de uma família com padrão de herança autossômico dominante sugestivo (característica ocorre em ambos os gêneros e há transmissão direta entre pais e filhos de qualquer gênero), com penetrância incompleta (determinados indivíduos não apresentam a característica, porém possivelmente apresentam o genótipo - exemplo: indivíduo 10, mãe do probando).

## MÉTODOS EM ESTUDOS GENÉTICOS

### Avaliação de heredogramas

O principal objetivo de se analisar heredogramas é avaliar a ocorrência ou não de um ou mais componentes genéticos relevantes, assim como buscar um modelo genético que melhor explique a segregação familiar de uma dada característica.

O modelo genético é estimado pelo padrão familiar da característica em questão. A avaliação do heredograma pode fornecer informações preliminares sobre a localização genômica e sobre dominância e recessividade do alelo relacionado à característica-alvo. Para a avaliação da localização genômica analisa-se se há ocorrência nos dois gêneros e a segregação da característica nas gerações consideradas. Estima-se também o número de casos em que ambos os genitores dos probandos são afetados e aqueles nos quais apenas um genitor é afetado e qual o gênero do mesmo ou se ambos os genitores são não-afetados. A mesma avaliação deve ser buscada com relação aos avós e, por isso, é interessante coletar dados de, no mínimo, duas gerações acima dos probandos.

Nos casos de herança dominante simples, espera-se que todos os indivíduos que apresentam um dado fenótipo possuam ao menos um dos pais afetados. A presença de fenocópias e/ou penetrância incompleta, assim como mutação nova, produz exceções a esta regra e pode complicar a análise

de heredogramas. E ainda, é observado que muitas características ocorrem tanto de forma familiar quanto esporádica, como por exemplo, o prognatismo mandibular e os cânceres em geral. Uma observação comum nesses casos, com inúmeros exemplos relatados quanto ao câncer de mama, é que a forma familiar tende a ocorrer em idades mais precoces<sup>19</sup>.

Nos casos esporádicos, uma primeira conclusão é de que a mesma apresenta um padrão de herança autossômico recessivo com rara história familiar. Porém, tais casos esporádicos podem também ser reflexo de uma etiologia não-genética (fenocópias) ou de uma mutação nova<sup>20</sup>, pois apesar dos genes serem usualmente transmitidos inalterados de uma geração para a outra, podem ocorrer eventos (mutações) que causam alterações nos mesmos<sup>13</sup>.

Uma fenocópia não é capaz de transmitir o fenótipo para nenhum de seus descendentes, nem terá ancestrais afetados (a não ser que eles também sejam fenocópias). Exemplo disso é a mordida cruzada anterior esquelética na idade adulta, desenvolvida a partir de uma mordida cruzada anterior dentária na infância, ocasionada exclusivamente pelo ambiente, que não foi corrigida adequadamente, e que pode ser confundida com prognatismo mandibular hereditário.

Outro ponto a ser levado em consideração

na avaliação dos heredogramas é a ocorrência de consangüinidade, isto é, casamento entre parentes próximos. Essa questão, muitas vezes negligenciada durante a anamnese, é um fator que pode auxiliar na definição do padrão de herança e explicar alguns padrões complexos de herança onde indivíduos afetados, posicionados distantes no mesmo heredograma, podem compartilhar os mesmos alelos.

Da mesma forma, para saber se um fenótipo é influenciado ou limitado a um dos gêneros, independente da localização genômica, pode-se analisar, nos heredogramas, a ocorrência daquela característica nos irmãos e irmãs dos probandos, visando definir se há um equilíbrio na prevalência do fenótipo entre os indivíduos do gênero masculino e do feminino. Diferença de taxas de incidência entre os gêneros ocorrem, em geral, em função de diferenças hormonais (que estão particularmente sob controle genético) e diferenças de desenvolvimento ou ambientais como, por exemplo, exposições ocupacionais e alguns hábitos.

Por último, é também possível que dois modelos diferentes de herança sejam identificados em uma mesma família, indicando a provável segregação de dois ou mais diferentes genes ou grupos de genes relacionados à mesma característica.

A figura 1 apresenta um exemplo de heredograma, para o qual é possível sugerir que o gene localiza-se no genoma autossômico, em decorrência da distribuição similar da característica entre os dois gêneros, e que o alelo responsável é dominante, porém com penetrância incompleta.

### **Análise de segregação**

A proposta acerca do melhor modelo genético para a herança de uma dada característica nem sempre é viável pela simples análise visual dos heredogramas, em especial quando a ocorrência de um determinado fenótipo resulta de uma combinação de fatores genéticos e ambientais em parte previsíveis e, em parte, devido ao acaso. Conseqüentemente, deve-se inicialmente distinguir

as agregações familiares inteiramente acidentais daquelas onde há uma tendência sistemática para que um determinado fenótipo segregue pelas gerações, o que envolve um componente genético.

A análise de segregação é uma técnica usada para identificar o modelo genético que melhor explique a agregação familiar observada para uma dada característica. Busca saber se o mesmo ocorre devido a um ou mais genes principais, poligenes ou inter-relação gene-ambiente. Em outras palavras, é o processo de adequar os dados de modelos genéticos formais aos fenótipos de membros de uma família, geralmente avaliados a partir de probandos afetados<sup>3,19</sup>.

As análises de segregação têm sugerido que vários problemas craniofaciais não apresentam um modelo de herança simples e devem seguir as regras de herança complexa. Isso porque vários desses fenótipos são produtos de uma interação de diferentes genes, cada um com um pequeno, mas substancial efeito, com componentes ambientais<sup>13</sup>.

A análise de segregação clássica não requer informações a respeito dos genótipos. Trata-se de uma investigação da agregação familiar, focando o padrão de segregação dentro de cada família, individualmente, ao invés de se usar a média da população, sendo que os resultados podem variar, por vezes sensivelmente, de acordo com os métodos de avaliação empregados. Apesar de ser possível fazer esse tipo de análise em núcleos familiares ou em heredogramas pequenos, os heredogramas mais extensos são mais informativos<sup>19</sup>.

Os dados contidos nos heredogramas são usados para alimentar programas de computador específicos, como, por exemplo, o programa Pointer<sup>1,8,9,12</sup>. As análises são baseadas em testar a adequação dos heredogramas aos possíveis modelos genéticos e permitem estimar os valores de máxima verossimilhança e os limites de confiança para diversos parâmetros desses modelos. Dentre os parâmetros estão: a dedução da penetrância e a frequência alélica do(s) gene(s) principal(is),

a herdabilidade do componente poligênico quando da sua existência, a distribuição do genótipo na população (uma função da frequência alélica para um gene mendeliano principal) e as probabilidades de transmissão dentro das famílias. O modelo de análise de segregação desse programa pressupõe, em relação à manifestação do fenótipo estudado, a existência de uma escala de predisposição subjacente, para a qual poderiam contribuir de modo independente, um *locus* autossômico principal, um componente multifatorial e, ainda, fatores aleatórios do ambiente. Uma vez que os genótipos são desconhecidos, todas as possíveis combinações de genótipos que são compatíveis com os dados observados e com as leis de Mendel são computadas.

Nem sempre os resultados de uma análise de segregação são claros, pois várias características fenotípicas que afetam o complexo craniofacial apresentam uma heterogeneidade etiológica significativa, ou seja, um mesmo defeito em um gene pode produzir diferentes anomalias fenotípicas e um distúrbio qualquer pode ocorrer em função da atividade gênica defeituosa em diferentes células. De maneira inversa, diferentes defeitos genéticos ou combinação de defeitos genéticos podem produzir anomalias fenotípicas similares. Outros agentes coadjuvantes podem fazer um defeito gênico “saltar” uma geração e, com isso, também complicar o cenário de diagnóstico. Exemplo disso são os heredogramas pequenos, em função da baixa atividade reprodutiva, e os fenômenos de impressão genômica (*imprinting* genômico), isto é, ativação diferencial de genes por efeito de origem parental<sup>13</sup>.

Uma outra dificuldade na análise de alguns casos se deve às características multifatoriais descontínuas. A explicação mais aceita repousa na suposição de que há uma escala básica de variação contínua da suscetibilidade para desenvolver uma dada condição, resultante de uma combinação de todas as influências genéticas e ambientais. A condição está presente somente quando a susce-

tibilidade excede um valor limiar crítico e quanto maior o nível de suscetibilidade além desse limiar, mais severo é o problema. Um exemplo clássico de característica multifatorial descontínua é a fenda labial e palatina. Os pais de um probando afetado são geralmente normais, e pode não haver nenhuma história familiar, mas por produzir um filho afetado supõe-se que os pais carreguem alguns alelos relacionados a esse distúrbio. Entretanto, esses pais devem apresentar também alelos que permitem a ocorrência do fenótipo normal. Somente quando esse equilíbrio ultrapassa certo limiar a má formação ocorrerá. Para os familiares (parentes de primeiro grau) de uma criança afetada, existe uma tendência de aumento da suscetibilidade ao fenótipo anormal, de modo que se espera encontrar uma frequência aumentada dessa má formação entre eles. À medida que o grau de parentesco se distancia, a tendência à suscetibilidade diminui e se aproxima dos valores normais para a população em geral, com uma redução correspondente na incidência. Quanto mais severa a má formação em uma criança afetada, maior a suscetibilidade de novos casos na família, incluindo os parentes mais próximos<sup>13</sup>.

### Análise de ligação

De acordo com o Projeto Genoma Humano, a nossa espécie possui cerca de 30.000 genes distribuídos ao longo de 22 cromossomos autossômicos e 2 sexuais. Portanto, cada cromossomo carrega centenas ou milhares de genes, sendo que existe uma especificidade intra-específica na ordem dos mesmos, os mapas gênicos. Dessa forma, os cromossomos homólogos contêm os mesmos genes nas mesmas posições. Os genes que estão situados no mesmo cromossomo são ditos sintênicos, enquanto os genes sintênicos que estão fisicamente próximos são ditos ligados. Os genes são considerados completamente ligados caso os alelos dos mesmos não possam ser separados por recombinação e parcialmente ligados quando há recombinação entre eles em uma taxa inferior a 50%.

A análise de ligação é o processo de busca da localização aproximada de um gene pela observação de evidências de co-segregação com marcadores genéticos cujas localizações já são conhecidas. Co-segregação é a tendência de dois ou mais genes serem herdados juntos e, conseqüentemente, de indivíduos com fenótipos similares apresentarem os mesmos alelos para o *locus* do marcador.

É possível identificar a localização cromossômica aproximada de um gene principal como um resultado do fenômeno da recombinação meiótica entre genes parcialmente ligados, sendo que a frequência de recombinação está diretamente relacionada à distância física entre dois *loci*. Dessa forma, a observação de que um gene desconhecido e um dado marcador estão ligados ou parcialmente ligados permite concluir que os mesmos são sintênicos e, com isso, estimar a posição genômica do novo gene.

A busca pela localização genômica de genes relacionados a fenótipos específicos em humanos sofreu um salto qualitativo e quantitativo com a introdução da metodologia de análise de ligação utilizando marcadores genéticos tipo polimorfismos de DNA anônimo<sup>2</sup>. A idéia básica da análise de ligação é determinar os genótipos dos membros de uma família com casos da característica em questão para vários marcadores genéticos. Famílias extensas com muitos casos de afetados ainda vivos são altamente informativas para esse propósito. Para isso, indivíduos pré-selecionados, pertencentes às famílias de interesse, são chamados para a doação de material biológico, de onde é feita a extração do DNA. Os métodos de laboratório para a genotipagem de marcadores atualmente incluem as reações de polimerização em cadeia (PCR), usadas para amplificar uma seqüência única de DNA em uma quantidade suficiente para que possa ser genotipada, e a genotipagem, normalmente realizada em seqüenciadores automáticos de DNA.

Após a genotipagem é possível extrapolar a constituição alélica dos indivíduos com relação

aos *loci* analisados. Para tanto, os dados mais informativos são aqueles dos indivíduos cujos pais são heterozigotos para os *loci* em questão e cujos genótipos já sejam conhecidos, pois dessa forma é possível inferir com relativa certeza de onde veio cada um dos alelos dos filhos. Como boa parte dos marcadores moleculares apresenta vários alelos, essas análises tornaram-se mais efetivas.

Tendo os heredogramas com os fenótipos dos diversos membros familiares e os genótipos dos indivíduos para os marcadores escolhidos, pode-se fazer cálculos estatísticos de análise de ligação, geralmente utilizando programas avançados de computador. Para tanto, se utiliza pares de familiares (*relative pair*), pares de irmãos afetados (*affected sib pair*) ou pares de familiares afetados (*affected relative pair*)<sup>3</sup>.

O método dos pares de familiares compara o genótipo dos marcadores genéticos idênticos por descendência (IBD - *Identical by descent*) entre familiares. Nesse caso, todas as possibilidades de parentes, dado um tipo particular de relacionamento (primo-primo; irmão-irmã; etc...), são consideradas e é determinado se os pares com fenótipos similares tendem a ter os mesmos alelos para os marcadores, isto é, numa frequência maior do que seria esperado ao acaso<sup>3,19</sup>.

Já o método de pares de irmãos afetados testa a hipótese de que tais pares, que possuem fenótipos similares, compartilhem alelos na vizinhança do *locus* da doença, mais do que seria esperado em pares de irmãos escolhidos randomicamente<sup>3,19</sup>.

Espera-se que pares de irmãos compartilhem ao acaso dois alelos IBD (derivados do mesmo avô) um quarto das vezes, um alelo IBD em metade e que não compartilhem nenhum alelo um quarto das vezes. Essa situação é considerada verdadeira, independente do fenótipo, se os marcadores estudados não estiverem ligados a nenhum *locus* relacionado à doença. Se dois irmãos são ambos afetados pela doença, e um gene relacionado à doença está ligado a um determinado marcador, então se espera ver um maior compartilhamento

de alelos marcadores IBD do que seria esperado ao acaso<sup>3,19</sup>.

Em princípio, o método de pares de irmãos afetados pode ser generalizado para qualquer forma de pares de familiares afetados. Na prática, entretanto, os relacionamentos IBD podem ser difíceis de determinar para esses parentes mais distantes. Nesses casos então os métodos IBS (*Identical by status*) são mais comumente utilizados<sup>19</sup>. Se as frequências dos alelos marcadores na população são conhecidas, é possível calcular as probabilidades de ocorrência dos genótipos para cada tipo de relacionamento<sup>6</sup>.

É possível, por acaso, que toda a prole afetada herde um dado alelo, enquanto a prole não afetada herde um outro alelo de um dado marcador genético, mesmo quando este não está ligado ao gene da doença. Este resultado enganador torna-se menos provável à medida que se aumenta o número de pessoas no estudo. Para determinar se o resultado de ligação é devido apenas ao acaso, compara-se a probabilidade de dois *loci* estarem ligados com uma determinada frequência de recombinação (indicada por  $\theta$ ) versus a probabilidade de que os dois *loci* não estejam ligados (frequência de recombinação = 50%, ou  $\theta = 0,5$ ). Em todos esses testes, utiliza-se o *LOD SCORE* (logaritmo das chances) que pode ser aplicado tanto em núcleos familiares como em heredogramas mais extensos. Ele é calculado somando-se as probabilidades de todas as combinações entre genótipos dos marcadores e a ocorrência da doença. Para facilitar o processo de análise dos dados, esse procedimento geralmente é feito fixando-se os parâmetros de segregação (penetrância e frequência alélica) em valores determinados em análises de segregação prévias. Na interpretação do *LOD SCORE*, um valor igual ou menor a -2 é considerado evidência contra a ligação e um valor maior ou igual a +3 é prova convincente a favor da mesma.

As análises podem ser feitas entre um único gene da característica e um único *locus* marcador (ligação de dois pontos) ou usando dois ou mais

*loci* de marcadores simultaneamente (ligação de múltiplos pontos). Este tipo de análise oferece maior eficácia, uma vez que identifica os marcadores flanqueadores que estão adjacentes ao gene em questão, ajudando, portanto, na localização do mesmo. O mapeamento de múltiplos pontos é exequível atualmente somente para um pequeno número de marcadores em heredogramas simples de qualquer tamanho ou para um número grande de marcadores em heredogramas simples de tamanho modesto. Um dos programas de computador mais utilizados para essas análises é o *Genehunter*<sup>19</sup>.

### Escaneamento do genoma total

Uma vez demonstrado pela análise de segregação que parece haver um gene principal para uma determinada doença, outra abordagem possível é começar a busca por ele de uma maneira mais abrangente, pesquisando no genoma inteiro. Realizando uma busca sistemática pelo genoma humano total em famílias extensas, é possível identificar os *loci* principais de suscetibilidade para uma doença específica<sup>17</sup>.

Atualmente, o primeiro escaneamento do genoma total na busca de um gene qualquer é realizado com, em geral, 300 a 500 marcadores simultaneamente. Quando uma região específica demonstra evidência de ligação (*LOD SCORE* positivos), estreita-se a busca excluindo todas as regiões com valores de *LOD SCORE* altamente negativos, concentrando os esforços apenas nas regiões estudadas que mostraram indícios de ligação. Para isso adicionam-se marcadores para gerar um mapeamento mais denso, capaz de cobrir aquela região, deixando-a com menos de 5cm (aproximadamente 5 milhões de pares de bases).

Entretanto, é necessário se certificar que não se trata de um falso indicativo. Às vezes, um *locus* pode ser identificado em uma família, mas não confirmado em outras. Nesse caso, poder-se-ia pensar em uma herança poligênica ou heterogeneidade de *locus*<sup>19</sup>. Por outro lado, se forem

observados indícios de ligação com uma região candidata em várias famílias, o banco de dados do genoma humano pode ser acessado para a busca de genes candidatos, de acordo com sua posição no cromossomo<sup>8</sup>. Nesse caso, é necessário que haja uma repetição dos resultados em vários outros testes antes que uma clonagem posicional se justifique<sup>17</sup>.

### Estudos de associação

Os estudos de associação podem ser usados para mapear genes, complementando a análise de ligação. Eles buscam uma relação estatística entre genótipos de um marcador genético e uma doença em uma dada população, isto é, o genótipo e a doença ocorrem juntos mais frequentemente do que esperado por acaso. Associação não significa obrigatoriamente que o gene envolvido com a doença e o marcador estejam no mesmo cromossomo.

Ao comparar os genótipos de *loci* candidatos encontrados em amostras de casos e controles em uma ou mais populações, hipóteses de que eles estejam associados com a característica são testadas. Esses estudos se baseiam em mapas de desequilíbrio de ligação. Atualmente existe um grande projeto sendo desenvolvido, o HapMap, que procura mapear regiões de desequilíbrio de ligação, desenvolvendo um mapa de haplótipos do genoma humano<sup>7</sup>.

As análises de associação são de realização complexa, em decorrência de vários problemas na constituição das amostras de caso-controle. Dentre eles, tem sido considerada como o mais importante a estratificação étnica, que pode mimetizar os sinais de associação e levar a resultados falso positivos<sup>3</sup>.

### Análise do gene identificado

Uma vez identificado um gene buscam-se alterações no mesmo que possam explicar o seu papel no desenvolvimento da característica. Polimorfismos que sejam encontrados nos casos afetados,

mas raros nos casos-controle, podem indicar a presença de mutações causais. A epidemiologia genética também ajuda inferindo a frequência de cada mutação e o efeito de cada uma no risco, incluindo as possíveis interações com a idade e fatores ambientais, dentre outros.

Porém, é interessante ressaltar que encontrar a localização de um gene dentro do genoma é apenas o passo inicial no sentido de entender o funcionamento e o papel fisiológico daquele gene. É necessário ainda estudar sua expressão, os produtos resultantes, sua forma de regulação e de interação com o ambiente.

### CONCLUSÃO

A identificação dos genes responsáveis pelas diversas alterações no processo normal de crescimento e desenvolvimento do complexo craniofacial, bem como nas alterações na estrutura dentária, irá pavimentar o conhecimento dos caminhos da genética molecular, relacionados ao dia-a-dia do profissional de Odontologia, e ajudar no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Apesar da suspeita de envolvimento de fatores genéticos no desenvolvimento de vários desses fenótipos, poucos estudos até agora têm determinado as suscetibilidades genéticas dessas características. A identificação dessas suscetibilidades é o primeiro passo em direção ao entendimento completo de sua patogênese molecular<sup>14</sup>. A identificação desses genes será muito útil no estabelecimento de condutas clínicas preventivas, interceptoras e corretivas mais eficazes.

## Genetic analysis of craniofacial problems – a review of the literature and some guidelines for clinical and laboratorial investigation (part 2)

### Abstract

**Aim:** The aim of this paper is to inform the reader about genetic techniques and analysis used in clinical and laboratorial investigations for the identification and characterization of the genetic determinants for complex disorders, especially those that attain craniofacial structures. **Methods:** General concepts and principles of important methods of genetic analysis are given as well as some guidelines for future researchers, concerning sample gathering and pedigrees construction. These methods described here require knowledge about genetic transmission, molecular genetics and DNA markers, and involve the ability to deal with the current laboratorial techniques, including polymerase chain reactions, agarose or polyacrilamide gel and the use of DNA sequencers. **Results and Conclusions:** Those genetic analysis, mainly the segregation and the linkage analysis, are considered important tools in the attempt to make the relationship between some phenotypes and specific genotypes, and to search for the exact chromosomal localization of each one of these genes. The knowledge of these information can help clinical dentists to understand the important role played by genetics, leading them to get deeper into the subject.

**Key words:** Pedigrees. Segregation analysis. Linkage analysis. Craniofacial disorders.

## REFERÊNCIAS

1. BORECKI, I. B.; PROVINCE, M. A.; RAO, D. C. Power of segregation analysis for detection of major gene effects on quantitative traits. **Genet. Epidemiol.**, New York, v. 11, no. 5, p. 409-418, 1994.
2. BOTSTEIN, D.; RISCHE, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nat. Genet.**, New York, v. 33, p. 228-237, 2003.
3. BURTON, P. R.; TOBIN, M. D.; HOPPER, J. L. Series: genetic epidemiology 1. Key concepts in genetic epidemiology. **Lancet**, London, v. 366, p. 941-951, Sept. 2005.
4. CAVALLI-SFORZA, L. L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. **The history and geography of human genes**. Princeton: Princeton University, 1994.
5. DUDBRIDGE, F.; CARVER, T.; WILLIAMS, G. W. Pelican: pedigree editor for linkage computer analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20/22, no. 14, p. 2327-2328, Sept. 2004.
6. GASS, J. R.; VALIATHAN, M.; TIWARI, H. K.; HANS, M. G.; ELSTON, R. C. Familial correlations and heritability of maxillary midline diastema. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v. 123, p. 35-39, 2003.
7. HAPMAP. Disponível em: <<http://www.hapmap.org>>. Acesso em: 4 fev. 2007.
8. LALOUEL, J. M.; MORTON, N. E. Complex segregation analysis with pointers. **Hum. Hered.**, Basel, v. 31, p. 312-321, 1981.
9. LIDRAL, A. C.; REISING, B. C. The role of MSX1 in human tooth agenesis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 81, no. 4, p. 274-278, 2002.
10. LITTON, S. F.; ACKERMAN, L. V.; ISACSON, R. J.; SHAPIRO, B. L. A genetic study of Class III malocclusion. **Am. J. Orthod.**, St. Louis, v. 58, no. 6, p. 565-77, 1970.
11. MAH, J. Genetics of the "Habsburg jaw". **Eur. Orthod. Society Res.**, London, v. 1, p. 1-8, 2001.
12. MORTON, N. E.; RAO, D. C.; LALOUEL, J. M. **Methods in genetic epidemiology**. Basel: Karger, 1983.
13. MOSSEY, P. A. The heritability of malocclusion: part 1 – genetics, principles and terminology. **Br. J. Orthod.**, Oxford, v. 26, no. 2, p. 103-113, June 1999.
14. MOSSEY, P. A. The heritability of malocclusion: part 2 – the influence of genetics in malocclusion. **Br. J. Orthod.**, Oxford, v. 26, no. 3, p. 195-203, Sept. 1999.
15. OLIVEIRA, S. F.; FERREIRA, L. B. Biological views of the inexistence of human races. **Eubios J. Asian Int. Bioeth.**, Christchurch, v. 14, p. 60-63, 2004.
16. PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C. M.; PENA, S. D. J. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, D. C., v. 100, p. 177-182, 2003.
17. SHARMA, P.; FATIBENE, J.; FERRARO, F.; JIA, H.; MONTEITH, S.; BROWN, C.; CLAYTON, D.; BROWN, M. J. A genome-wide search for susceptibility loci to human essential hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 35, p. 1291-1296, June 2000.
18. TEMPLETON, A. R. Human races: a genetic and evolutionary perspective. **Am. Anthropol.**, Washington D. C., v. 100, no. 3, 1998.
19. THOMAS, D. C. **Statistical methods in genetic epidemiology**. New York: Oxford University, 2004.
20. VRIES, L. de; KAUSCHANSKY, A.; SHOHAT, M.; PHILLIP, M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 89, no. 4, p. 1794-1800, Apr. 2004.
21. YU, N.; CHEN, F.C.; OTA, S. Larger genetic differences within Africans than between Africans and Eurasians. **Genetics**, Baltimore, v. 161, p. 269-274, 2002.

### Endereço para correspondência

Ricardo Machado Cruz  
SHIS QI 9/11- Bloco L – Sala 101- Lago Sul  
CEP: 71.625-210 - Brasília / DF  
E-mail: ricardomacruz@uol.com.br