

*RENATA DE LIMA*

***Estudo do Gene SHOX em Casos de Discondrosteose  
de Léri Weill e Displasia Mesomérica de Langer***

2010

RENATA DE LIMA

***Estudo do Gene SHOX em Casos de Discondrosteose de Léri  
Weill e Displasia Mesomélica de Langer***

**Tese apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas  
(FCM) da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção de título de  
Doutor em Ciências Médicas, Área de  
concentração Ciências Biomédicas.**

**Orientador: Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra**

**Co-orientador: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello**

**Campinas**

**Unicamp**

**2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L628e Lima, Renata de  
Estudo do gene *SHOX* em casos de discondrosteose de *Léri Weill* e displasia mesomélica de *Langer* / Renata de Lima. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Andréa Trevas Maciel Guerra; Maricilda Palandi de Mello

Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteína SHOX, humana. 2. Doença óssea. 3. Desenvolvimento. 4. Osteocondroplasia. I. Guerra, Andréa Trevas Maciel. II. Mello, Maricilda Palandi de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Study of SHOX gene in cases of Leri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia**

**Keywords:** • Shox protein, human  
• Bone disease  
• Developmental  
• Osteochondrodysplasias

**Titulação: Doutor em Ciências Médicas**  
**Área de concentração: Ciências Biomédicas**

**Banca examinadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Trevas Maciel Guerra**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Beatriz Alvarez Perez**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Kochi**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edi Lúcia Sartorato**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Barbosa de Melo**

**Data da defesa: 24/06/2010**

---

## Banca examinadora de Tese de Doutorado




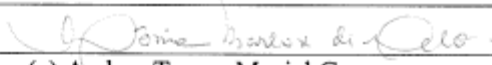

---

Renata de Lima

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Andrea Trevas Maciel Guerra**

---

<b>Membros:</b>
Professor (a) Doutor (a) Cristiane Kochi

Professor (a) Doutor (a) Ana Beatriz Alvarez Perez

Professor (a) Doutor (a) Edi Lucia Sartorato

Professor (a) Doutor (a) Mônica Barbosa de Melo

Professor (a) Doutor (a) Andrea Trevas Maciel Guerra


Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 24/06/2010**

---

*Há quem diga que todas as noites são de sonhos.*

*Mas há também quem diga nem todas, só as de verão.*

*Mas no fundo isso não tem muita importância.*

*O que interessa mesmo não são as noites em si, são os sonhos.*

*Sonhos que o homem sonha sempre.*

*Em todos os lugares, em todas as épocas do ano,*

*dormindo ou acordado*

*(William Shakespeare)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CBMEG e ao Hospital de Clínicas da Unicamp por possibilitar a realização deste estudo e à Fapesp pela ajuda financeira.

Agradeço aos médicos e residentes da Unicamp, sem os quais seria impossível ter o levantamento clínico dos pacientes, em especial à *Cristina Forti Lamada* e *Luciana Oliveira Silva* pelo encaminhamento dos pacientes para o estudo.

Agradeço ao *Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner*, sempre pronto a contribuir.

À equipe de endocrinologia que sempre mostrou interesse pelo estudo e ao departamento de ortopedia pela atenção.

À minha orientadora *Profa. Dra. Andrea Trevas Maciel Guerra* pelo exemplo de dedicação e sabedoria.

À minha co-orientadora *Profa. Dra. Maricilda Palandi de Melo* com quem aprendi a ter persistência e ser um pouco mais minuciosa no que faço.

À *Profa. Dra. Edí Lucia Sartorato* pela alegria e por acreditar naqueles que estão iniciando.

À todos que direta e indiretamente contribuíram para que eu tornasse minha vida não um sonho... Mas a realidade que ela é.

Aos funcionários do CBMEG e FCM pela atenção e carinho

Agradeço aos colegas de laboratório *Madá, Reginaldo, Fabiana (Dra. Fabiana), Zélo, Fernanda Soard (Dra. Fernanda), Renan, Flavia, Mariana* e tantos outros pelo carinho e ajuda.

Em especial à *Juliana (Dra. Juliana Assumpção)* pela paciência que mostrou me acompanhando nos primeiros passos, à *Denise* que contribuiu com o sequenciamento apresentado.

À *Fernanda Coeli (Dra. Fernanda B. Coeli)* que mais que ajuda profissional fez parte dos momentos de dilema, angústia e alegria.

À *Adna* que mesmo que em um tempo curto conseguiu colaborar muito, além de alegrar os dias com sua simpatia e otimismo.

Aos meus alunos de IC da Uniso, *Anderson, Leandro, Rogério, Tiago, Raquelzinha, Diego, Fábio(s), Marília, Nathalia, Isoldinha, Tatiane* e *Jhones* por ajudarem na minha plasticidade neural, com certeza nunca vou ter Alzheimer.

Ao amigo *Luiz Roberto* por ajudar a realizar alguns sonhos.

À *Dalva* pelo carinho que trata tudo que eu tanto amo nas vezes que é necessário minha ausência.

Aos amigos *Silvio, Raquel, André, Fabiano, Leonardo José, Rogilene* e *Vadim* por agüentarem meus sonhos, entusiasmos e entenderem minha multiplicidade. "Guarda teu amigo sob a chave de tua própria vida." (William Shakespeare).

Aos meus pais *Magda* e *William*, pelo fato de viverem com alegria e amor (uma lição de vida). Nada mais importa no mundo que tua transparência e autenticidade.

*"Trate os outros como gostaria de ser tratado"* (Adi Granth)

À minha irmã *Paula*, por sempre acreditar em mim, mesmo que longe, te sinto sempre perto.

*“A arte de viver é simplesmente a arte de conviver ... simplesmente, disse eu?  
Mas como é difícil!”* (Mario Quintana)

Ao *Leonardo*,

Meu amor maduro, pelo companheirismo, amizade, incentivo e inteligência de  
levar a vida.

"Me ame quando eu menos merecer, pois é quando eu mais preciso."  
(Provérbio Chinês)

À minha filha *Camila*

Tanto quero aprender para poder te ensinar....

E tanto você me ensina só num olhar...

“Crianças são mensagens vivas que mandamos para um tempo que não  
veremos.” (Neil Postman)

Aos meus pequeninos Anthony, Celeste, Flora e Sansão.  
Muito bom o amor incondicional!!!



*A estatura somente é um indicativo físico do ser humano,  
nada diz sobre sua intelectualidade ou espiritualidade.*

(Augusto Rubra)

## SUMÁRIO

1 Introdução .....	33
2 Revisão Bibliográfica .....	37
2.1 A Região Pseudoautossômica .....	37
2.2 Gene SHOX .....	38
2.3 Estrutura Molecular do Gene.....	41
2.4. A Proteína SHOX .....	44
2.5 <i>SHOX</i> e o <i>Ciclo Celular</i> .....	49
2.6 Mutações Descritas até o Momento .....	51
2.7 Discondrosterose de Leri-Weill.....	57
2.8 Displasia Mesomelica de Langer .....	59
2.9 Síndrome de Turner .....	60
3 Objetivo .....	63
3.1 Objetivo Geral .....	64
3.2 Objetivos Especificos .....	64
4 Material e Métodos.....	65
4.1 Casuística .....	66
4.2 Estudos Moleculares .....	68
4.2.1 Extração de DNA Gênomico .....	68
4.2.2 Análise de Microssatélites .....	70
4.2.3 Southern Blot.....	72
4.2.4 Sequenciamento .....	76

4.2.5 PCR em Tempo real.....	79
4.2.6 MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) .....	92
5 Resultados e Discussão .....	97
5.1 Pesquisas de Microdeleção por Meio da Análise de Microsatélites .....	98
5.1.1 Resultados .....	101
5.1.2 Discussão de Casos .....	106
5.2 Análise de Southern Blot .....	122
5.3 Análise de Sequenciamento .....	123
5.4 Análises por PCR em Tempo Real .....	141
5.5 Análise de MLPA .....	153
5.5.1 Resultados dos Pacientes deste Estudo .....	157
6 Capítulo Final .....	169
7 Conclusão .....	175
8 Referencia Bibliográfica .....	177
Anexos .....	193

## **ABREVIATURAS**

**DHPLC** = Denaturing High Performance Liquid Chromatography  
(**Cromatografia Líquida de alta Eficiência**)

**DLW** = Discondrosteose de Leri-Weill

**DML** = Displasia Mesomélica de Langer

**FISH** = Hibridação *in situ* fluorescente

**MLPA** = Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (**Multipla Ligação dependente de Sonda de Amplificação**)

**OAR** = Orthopedia Aristaless Rax

**PAR** = Região Pseudoautosômica

**PCR** = Reação em Cadeia da Polimerase

**PHOG** = Pseudoautosomal Homeobox-containing Osteogene gene  
(**Pseudoautosômico Homeobox contendo gene de osteogênese**)

**SHOX** = Short Stature Homeobox gene

**SSCP** = *Single Strand Conformation Polymorphism* (**Polimorfismo de pequena força de conformação**)

**ST** = Síndrome de Turner

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Casuística composta por indivíduos com mesomelia e (ou) deformidade de Madelung associadas ou não a baixa estatura.....	67
<b>Tabela 2</b> - Sequência de primers utilizados para amplificação das regiões SHOX-CA, DXYS10091, DXYS10092, DXYS10093, DXYS10083 e DXYS233 (SHEARS et al.(17); CORMIER-DAIRE et al.(75); BINDER et al.(37). .....	71
<b>Tabela 3</b> - Sequência de pares de <i>primers</i> utilizados para amplificação dos éxons 2, 3 e 4, 5(17) .....	77
<b>Tabela 4</b> - Esquema da reação de sequenciamento.....	78
<b>Tabela 5</b> - Sequência dos pares de primers utilizados para amplificação da região do gene Fator V de coagulação .....	82
<b>Tabela 6</b> - Resultados da análise dos polimorfismos das regiões <i>CA-repeat</i> , DXYS10092, DXYS10093, DXYS10091, DXYS10083 e DXYS233 obtidos em pacientes com mesomelia e (ou) deformidade de Madelung associada ou não à baixa estatura .....	105.
<b>Tabela 7</b> – Comparação dos tipos de deleção entre o caso de DML descrito neste trabalho e casos encontrados na literatura .....	108.
<b>Tabela 8</b> – Mutações encontradas neste estudo de acordo com o paciente .....	125.
<b>Tabela 9</b> – Alterações encontradas no éxon 1 e na região, não traduzida do éxon 2.....	136.
<b>Tabela 10</b> - Resultados das análises da região DXYS10091 baseadas nas corridas realizadas em PCR em tempo real e as médias dos Cts de cada indivíduo .....	146.
<b>Tabela 11</b> - Resultados das análises da região <i>CA-repeat</i> baseados nas corridas realizadas em PCR em tempo real e as médias dos Cts de cada indivíduo .....	151

**Tabela 12** – Resumo dos resultados apresentados neste trabalho. Em amarelo estão assinaladas alterações moleculares com evidências de patogenicidade .....173

## Lista de Figuras

- Figura 1** - Esquema mostrando a localização exata do gene SHOX na região pseudoautossômica 1 nos cromossomos sexuais humanos. Os alelos encontram-se na região Xp22 e Yp11.3.....38
- Figura 2** - Esquema mostra a localização relativa do gene SHOX e a região de microssatélites contígua. As setas indicam as regiões hotspots (pontos quentes de mutação) deletadas em pacientes com DLW e DML. ....40
- Figura 3** - Esquema ilustra o gene SHOX com seus éxons e o splicing alternativo que leva à formação de dois mRNAs distintos. ....41
- Figura 4** - Estrutura molecular do homeodomínio da proteína SHOX, baseada no modelo em silico da proteína PAX (Wilson et al., 1995; Lund et al., 2002). As regiões coloridas indicam as algumas mutações encontradas em indivíduos com Leri-Weill. A cor azul indica alteração na habilidade de ligação ao DNA, a vermelha a capacidade de gerar homodímero, e a amarela a capacidade de entrar no núcleo e a laranja a atividade transcricional. ....44
- Figura 5** - Região no gene SHOX correspondente ao homeodomínio da proteína. ....45
- Figura 6** - Representação da Proteína SHOXa e os domínios existentes. ....47
- Figura 7** - Distribuição da expressão dos genes SHOX (em verde) e SHOX2 (em vermelho) no esqueleto humano. Em detalhe expressão do gene em mão e punho, de acordo com as cores indicadas (adaptado de Clement-Jones et al., 2000) .....49
- Figura 8** - Cascata de ossificação sugerindo ação do gene SHOX na fase hipertrófica do disco epifisário baseada nos resultados obtidos até o momento com relação ao possível papel desse gene na apoptose celular. ....51
- Figura 9**- Principais alterações no gene SHOX descritas até o momento(69)....52
- Figura 10** - Distribuição dos pacientes de acordo com o sexo .....67

- Figura 11** - Esquema de como a fluorescência de SYBR pode ser utilizada em PCR-Tempo Real. As esferas verdes representam o SYBR, em rosa representa-se a Taq-DNA-polimerase durante o ciclo da PCR. Fonte: <http://www.ornat.co.il/upload/Image/SYB.JPG> .....80
- Figura 12** - Gráfico  $\Delta Rn$  (variação no sinal fluorescente) x número de ciclos mostrando uma curva de amplificação obtida em uma reação de PCR em tempo real com suas 3 fases características.....81
- Figura 13**- Curva de dissociação obtida para o gene do fator V de coagulação (Leiden). A curva de dissociação mostra um único pico mostrando a pureza do produto;  $T_m$  de aproximadamente  $60^\circ\text{C}$ ... .....84
- Figura 14** - Exemplos de curvas de amplificação obtidas na PCR em tempo real. CTs (*cycle threshold*) = nº de ciclos necessários para atingir determinado nível de fluorescência (*threshold*). O gráfico mostra que a quantidade de material existente na reação correspondente ao Ct1 é maior que a quantidade de material existente na reações correspondentes aos demais Cts.....85
- Figura 15** – O gráfico de regressão mostra a curva de diluição gerada pelo programa em uma das corridas realizadas .. .....87
- Figura 16** – Esquema localizando as sondas do kit P018-D1 SHOX que anelam ao cromossomo X. Acima a representação do cromossomo X e suas regiões, abaixo a localização das sondas localizadas fora da região PAR1 .....93
- Figura 17** – Representação esquemática das sondas de MLPA. Para cada região a ser analisada são desenhadas duas sondas: a esquerda e a direita que se anelam de maneira adjacente. Cada sonda tem a região que é reconhecida por *primers* universais. A sonda direita tem uma seqüência denominada coringa que varia de tamanho diferenciando os pares de sonda e permitindo a visualização dos fragmentos por eletroforese capilar.....94



<b>Figura 18</b> - A) Oligonucleotídeos sintéticos que compõem o kit P018-D1 SHOX e DNA genômico; B) Hibridização adjacente dos pares de sondas de MLPA nas seqüências alvo; C) Reação de Ligação onde ocorre a união das sondas adjacentes com a enzima ligase; D) Reação de PCR Multiplex: amplificação com <i>primers</i> universais gerando 44 fragmentos de tamanhos diferentes, onde somente o <i>primer</i> direto é marcado com o corante FAM; E) Separação por eletroforese capilar dos fragmentos únicos amplificados. Adaptado de BARBARO, M.(86) .....	95
<b>Figura 19</b> - Heredograma da família 8 e gel correspondente aos resultados do indivíduo IV.2 (caso-índice) e seus pais.....	107
<b>Figura 20</b> - Heredograma da família3 e géis correspondentes aos resultados. Gel a) região Ca-repeat, b) DXYS10092, c) DXYS10093, d) DXYS10091, e) DXYS10083 e f) DXY233. ....	110
<b>Figura 21</b> - Heredogramas das famílias e géis correspondentes aos resultados da família 9 ..	112
<b>Figura 22</b> – Esquema mostrando o resultado em gel de poliacrilamida das famílias dos pacientes. Em (a), família do paciente 10. Em (b), família do paciente 11. Em (c), pacientes 10 e 11.....	113
<b>Figura 23</b> - Heredograma da família 1 e análise em gel da paciente caso 1 (II.4).....	115
<b>Figura 24</b> – Heredograma e análise em gel de poliacrilamida da família da paciente 5.....	116
<b>Figura 25</b> – Heredograma e análise em gel de poliacrilamida da família do paciente 7.....	118
<b>Figura 26</b> – Heredograma e resultado das análises em gel das famílias 2, 4 e 6. ....	120
<b>Figura 27</b> – Heredogramas das famílias das pacientes 10 e 11.....	121
<b>Figura 28</b> – Análise de <i>Southern</i> utilizando sondas do éxon 4,5 do gene <i>SHOX</i> e <i>DMTR1</i> da família 3. Abaixo os índices..	122

- Figura 29** – Alterações encontradas em éxons. A posição 147 já foi descrita em outros estudos, porém com substituições de resíduos diferentes. Em preto, alterações descritas até o momento na literatura. Os números dentro do retângulo indicam os pares de base correspondentes à cada éxon..... 125
- Figura 30** – Mutação IVS3+21G>A. Acima painel da sequência de DNA, considerando a região que mostra a alteração de G por A. Abaixo o heredograma da família.. ..... 126
- Figura 31** – Painel mostra parte do sequenciamento da paciente 2 na região da deleção em heterozigose. Abaixo a representação da proteína SHOXa selvagem e a proteína putativa da paciente..... 128
- Figura 32-** Similaridade apresentada entre a proteína *SHOX* de diversas espécies de animais..... 130
- Figura 33** – Detalhe da região da mutação R147S, na qual podemos verificar que o aminoácido se mantém conservado.. ..... 131
- Figura 34** – Estrutura dos aminoácidos arginina e serina..... 132
- Figura 35**– Detecção da mutação c.439C>A. Acima a região da mutação encontrada na paciente 6; ao lado, heredograma da família; na parte inferior, a sequencia protéica indicando o resíduo alterado e a predição da estrutura secundária... ..... 133
- Figura 36** – Predição das alterações protéicas geradas pelas mutações descritas até o momento na literatura para o códon 147 da proteína SHOXa. .... 134

- Figura 37** – Em (a), esquema mostrando os éxons do gene *SHOX* e sua correspondência ao RNAm e região de 5'UTR. Em (b,) esquema mostrando: em verde, o códon de iniciação do gene, localizado no éxon 2; em amarelo, os códons ATG que antecedem ao códon de início (éxons 1 e 2); e, em violeta, os locais de mutações novas encontradas no éxon 1.....138
- Figura 38** – Esquema do modelo de regulação da transcrição do gene *SHOX* por dois promotores alternativos. Os dois transcritos possuem codificação idêntica, porém distintas regiões de 5'UTR, fato que leva à distinta eficiência de tradução. Modificado de BLASCHKE *et al.* (2003).....139
- Figura 39** – Esquema mostrando as simulações realizadas para estrutura secundária do RNAm a partir da sequência normal e com as sequências com as alterações encontradas nos pacientes deste trabalho. A mutação -6599 G>C apresentou forma secundária diferente das demais. [http://www.genebee.msu.su/services/rna2\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html) .....140
- Figura 40** – Gráfico exibido pelo programa referente aos Cts dos dados capturados nas corridas da região DXYS10091, sendo a linha verde o *threshold* de cada reação. Em (a,) corrida Time3; em (b), corrida Time8; e, em (c), corrida Time9.....143
- Figura 41** – Curvas de dissociação do gene Fator V de coagulação de *Leiden*; Tm aproximadamente 81°C.....144
- Figura 42** - Curvas de dissociação do gene Fator V de coagulação de *Leiden*; Tm aproximadamente 83°C. Os picos menores ou com diferentes Tms correspondem aos controles negativos... .....144
- Figura 43** – Figura representando o gráfico dos valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  por paciente em cada uma das corridas realizadas. O paciente 9 apresenta deleção na região estudada... .....147
- Figura 44** – Figura representado o gráfico dos valores obtidos pelo cálculo de  $\Delta K C_t$ s de cada paciente por corrida realizada. Paciente 9 confirmando a deleção e o paciente 10 com resultado limite para deleção.... .....147
- Figura 45** - Gráfico exibido pelo programa referente aos dados DXYS10091 dos Cts da corrida Time1... .....149

<b>Figura 46</b> - Gráfico exibido pelo programa referente aos dados DXYS10091 dos Cts da corrida Time2.....	149
<b>Figura 47</b> – Curvas de dissociação da região CA-repeat do Time 1; Tm aproximadamente 60°C. Os picos menores ou com diferentes Tms correspondem aos controles negativos.....	150
<b>Figura 48</b> - Curvas de dissociação da região CA-repeat do Time 2; Tm aproximadamente 60°C. Os picos menores ou com diferentes Tms correspondem aos controles negativos.....	150
<b>Figura 49</b> - Figura representando o gráfico dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por paciente em cada uma das corridas realizadas para a região CA-repeat.....	152
<b>Figura 50</b> – Esquema mostrando a proximidade do gene <i>SHOX</i> com a região dos genes <i>CSF2RA</i> e <i>IL3RA</i> . <a href="http://howdy.jst.go.jp/HOWDYCL/CM/topCM.pl">http://howdy.jst.go.jp/HOWDYCL/CM/topCM.pl</a> .....	154
<b>Figura 51</b> - Esquema mostrando alguns locais das regiões investigadas neste estudo e os locais de deleção descritos até o momento de acordo com os autores indicados. Adaptado de SABHERWAL <i>et al.</i> (90).....	156
<b>Figura 52</b> - Resultados da análise de MLPA dos paciente 11. Os gráficos mostram não haver deleção do gene <i>SHOX</i> e da região próxima a este. A hemizigose do gene <i>ILERA</i> é observada. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela homozigose ou hemizigose não confirmada, e a vermelha, resultados de hemizigose confirmada.....	158
<b>Figura 53</b> – Resultados da análise de MLPA do paciente 10. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.....	159
<b>Figura 54</b> - Resultado da análise de MLPA da paciente 1. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada....	160

- Figura 55** – Resultado da análise de MLPA da paciente 2. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada. ....161
- Figura 56** - Esquema de segregação que pode ter ocorrido na paciente 2... ....162
- Figura 57** - Resultado da análise de MLPA da paciente 5. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada... ....163
- Figura 58** - Resultado da análise de MLPA da paciente 6. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.. ....164
- Figura 59** - Resultado da análise de MLPA da paciente 7. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.. ....165
- Figura 60** - Resultado da análise de MLPA da paciente 9. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada, e o vermelho, regiões com hemizigose confirmada... ....166
- Figura 61** - Resultado da análise de MLPA da paciente 4. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.. ....167

## RESUMO

A Discondrosteose de Leri-Weill (DLW), caracterizada por baixa estatura, encurtamento mesomélico dos membros e deformidade de Madelung, deve-se a alterações no gene *SHOX*, localizado na região pseudoautosômica dos cromossomos sexuais e que atua como fator de transcrição. Alterações em um dos alelos são encontradas em casos de baixa estatura com ou sem DLW, e em ambos os alelos na Displasia Mesomélica de Langer (DML), na qual há alterações esqueléticas mais graves. Há variação fenotípica na DLW, atribuída ao envolvimento de outros genes ou a alterações nas regiões reguladoras à jusante *ao gene*. No presente estudo, realizou-se a investigação do gene *SHOX* de 10 pacientes com DLW e um com DML por meio de análises de microsatélites, PCR em tempo real, análise de MLPA e sequenciamento direto. Essas análises permitiram confirmar a etiologia genética do quadro apresentado por sete pacientes, dos quais três apresentavam deleção total ou parcial de um dos alelos. Em um destes pacientes a clínica foi associada a mutação de ponto (IVS3+21G>A no íntron 3), outro paciente (DML) a deleção dos dois alelos, outros pacientes (DLW) a deleção na região *downstream* do gene, outros dois mutações de ponto (c.439C>A no éxon 3 e c.523delC no éxon 4), outro a deleção (c.523delC) associada a mutação na região 5'UTR. Quatro outros pacientes apresentaram alterações de patogenicidade ainda indefinida: mutações não descritas na região 5'UTR, que poderia interferir no processo de tradução do gene (dois casos), e deleção das regiões referentes às sondas 8, 10 e 12 na análise de MLPA (um caso) e outro caso com relação à deleção da sonda *SHOX* reg. Os resultados mostram a grande heterogeneidade alélica associada à DLW e indicam a necessidade de que a

investigação molecular nesses casos seja ampla, permitindo um diagnóstico molecular mais preciso.

## ABSTRAT

Leri-Weill Dyschondrosteosis (LWD) is characterized by short stature, mesomelic shortening of members and Madelung deformity. It results from changes in the *SHOX* gene, located in the pseudoautosomal region of the sex chromosomes. The protein it codes acts as a transcription factor. Changes in one *SHOX* allele are found in cases of short stature with or without LWD, whereas Langer Mesomelic Dysplasia (LMD), in which more serious skeletal disorders occur, results from alterations in both alleles. There is phenotypic heterogeneity in LWD, attributed to the possible involvement of other genes, or to changes in regulatory regions *downstream* of the gene. In the present study, the *SHOX* gene and the chromosomal *SHOX* gene region were evaluated in 11 patients with LWD and LMD by using microsatellite PCR, real time PCR analysis, MLPA analysis, and direct sequencing. Those tests confirmed the genetic etiology of the clinical characteristics in seven patients. Three of them carried alleles bearing a partial or total deletion of the *SHOX* gene, one of which bearing a mutation located in intron 3 (IVS3+21G>A) that has not been described previously; the patient with LMD carried *SHOX* gene deletion in both alleles; and another had a deletion in the *downstream* region of the gene. Two patients bore mutations that have not been described previously in exons 3 (c.439C>A, Arg147Ser) and 4 (c.523delC, Gln175Lisfs44x219). The later was also associated with a mutation in 5'UTR. Four other patients showed nucleotide changes and deletions of undefined pathogenicity: novel mutations in the 5'UTR, which might interfere with the translation process of the gene (two cases), and deletion of regions related to the probes 8, 10 and 12 in the MLPA analysis (one case) and deletion oh probe *SHOX* reg. Results showed great molecular heterogeneity associated with LWD, and pointed out the need of a more detailed research to allow more accurate molecular diagnosis.



## *INTRODUÇÃO*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Entende-se por baixa estatura aquela que se encontra abaixo do limite inferior à curva de referência utilizada para um determinado sexo e idade. Esta pode ser decorrente de vários fatores, ambientais e genéticos, sendo essencial, na avaliação de cada caso, a obtenção dos antecedentes pessoais e familiares do indivíduo, bem como a realização de um exame físico detalhado com a finalidade de avaliar a presença ou não de desproporção corporal, dismorfismos, e malformações que possam sugerir afecções específicas. Os exames radiológicos e laboratoriais também são necessários para uma avaliação correta e segura. O estabelecimento da causa do retardo do crescimento é fundamental para que se determinem as possibilidades terapêuticas.

Clinicamente, as afecções de crescimento são classificadas em primárias, secundárias e baixa estatura idiopática. As afecções primárias do crescimento têm como causa um defeito intrínseco de tecido ósseo/conjuntivo, e seus portadores apresentam características dismórficas e estatura desproporcional. Estas afecções primárias subdivididas em displasias esqueléticas e distúrbios osteometabólicos, incluem diversos quadros sindrômicos de diferentes etiologias que frequentemente se associam a retardo de crescimento intrauterino.

Nas afecções secundárias do crescimento os fatores são extrínsecos ao tecido ósseo/conjuntivo, estando a idade óssea frequentemente em atraso. Incluem-se, nesta categoria, doenças viscerais crônicas, distúrbios endócrinos

(como hipopituitarismo, hipotireoidismo, hipercortisolismo, hiperaldosteronismo, e hipoparatiroidismo) e doenças metabólicas.

Nos casos de baixa estatura idiopática, não há desproporção corporal, quadro dismórfico ou fatores extrínsecos detectáveis, sendo o retardo de crescimento de início pós-natal. Os casos de baixa estatura idiopática incluem os casos de baixa estatura familiar e atraso constitucional do crescimento e da puberdade (maturação lenta), considerados variantes da normalidade <sup>(1)</sup>.

Nos casos de baixa estatura familiar, correspondentes à maioria dos pacientes que procuram por serviços de pediatria, os indivíduos com baixa estatura são totalmente normais em relação a outros aspectos. O crescimento intrauterino, o peso e comprimento ao nascer e o padrão de maturação das crianças estão dentro da normalidade, existe história familiar de baixa estatura, e os pacientes crescem com velocidade normal, dentro do canal de crescimento estabelecido pela altura de seus pais, estando nestes limites sua altura final.

Nos casos de baixa estatura por maturação lenta o crescimento intrauterino, o peso e o comprimento de nascimento são normais. Sua maturação, porém, é lenta, o que é expresso por atraso na idade óssea e no início das manifestações puberais. Existe, frequentemente, história familiar de maturação lenta, e a velocidade de crescimento habitualmente se encontra próxima ao limite inferior da normalidade. Os pacientes tendem a alcançar, após a puberdade, uma estatura final dentro dos limites do canal de crescimento estabelecido pela altura de seus pais <sup>(2)</sup>.

Em 20 a 25% das crianças com variantes da normalidade, há recorrência familiar de baixa estatura; devido a este fato, acredita-se que, em muitos desses, casos haja participação de fatores genéticos ainda não estabelecidos. Até o momento, não se conhece, contudo, a proporção de casos de retardo de crescimento considerados idiopáticos que são, na verdade, decorrentes de afecções hereditárias monogênicas.

A baixa estatura também pode ser apresentada por indivíduos que apresentam anomalias cromossômicas numéricas e estruturais dos autossomos e em diversas outras condições de origem genética, como as síndromes de Russel-Silver (OMIM#180860), Dubowitz (OMIM#223370), Noonan (OMIM#63950), Down (OMIM#190685) e Prader-Willi (OMIM#176270), entre outras.

Nos últimos anos, tem sido constatado que uma parcela desses casos deve-se a alterações no gene *SHOX* (*short stature homeobox-containing gene*), identificado a partir de estudos em indivíduos com síndrome de Turner e Discondrosteose de Leri-Weill (DLW). Assim sendo, alguns casos de baixa estatura diagnosticados como variantes da normalidade consistem, na verdade, em afecções primárias do crescimento de expressividade variável, em que as anomalias esqueléticas são clinicamente pouco evidentes<sup>(3-6)</sup>.

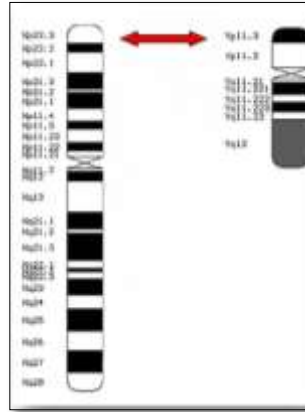
É relevante, portanto, a ampliação do conhecimento a respeito do gene *SHOX* e de suas mutações tendo como base uma amostra de pacientes com displasias esqueléticas decorrentes dessas alterações moleculares: a DLW e a displasia mesomélica de Langer (DML).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A REGIÃO PSEUDOAUTOSSÔMICA

A região pseudoautossômica representa blocos de sequências que apresentam identidade entre cromossomos sexuais em mamíferos (ilhas autossômicas em cromossomos sexuais). Nos humanos, esta região está localizada nas extremidades dos cromossomos X e Y, com cerca de 2,7 Mb (região pseudoautossômica 1 - PAR1) e 0,33 Mb (região pseudoautossômica 2 - PAR2), representando cerca de 2% do cromossomo X e 5% do cromossomo Y<sup>(7)</sup>.

A região PAR1 (Figura 1) é necessária ao pareamento dos cromossomos sexuais durante a meiose masculina, podendo estar relacionada à esterilidade masculina quando ausente<sup>(8)</sup>. Ao compararmos o cromossomo X com o cromossomo Y, verificamos que a região eucromática deste é seis vezes maior que a do cromossomo Y, existindo apenas 54 genes correspondentes, dos quais apenas 24 na região PAR1<sup>(9)</sup>.



**Figura 1** - Esquema mostrando a localização exata do gene SHOX na região pseudoautossômica 1 nos cromossomos sexuais humanos. Os alelos encontram-se na região Xp22 e Yp11.3.

## 2.2 O GENE *SHOX*

Com base no estudo de indivíduos com distúrbio de crescimento e ST (Síndrome de Turner) que apresentavam deleções ou rearranjos envolvendo a região pseudoautossômica dos cromossomos sexuais, foi identificado o gene hoje denominado *SHOX*.

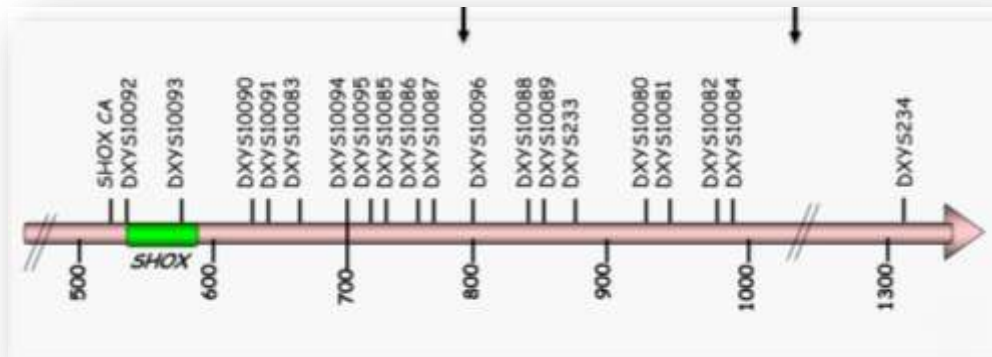
Em estudos realizados em 1997, ELLISON *et al.*<sup>(10)</sup> isolaram um gene da **PAR1** (Figura 1) que codifica um fator de transcrição altamente expresso em células osteogênicas e o denominaram *PHOG* (*pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene*). Nesse mesmo ano, RAO *et al.*<sup>(11)</sup> identificaram a deleção de um segmento de 170 Kb na **PAR1** em 36 indivíduos com baixa

estatura. Indivíduos das mesmas famílias, com estatura normal, não apresentavam essa deleção, não encontrada tampouco em indivíduos com rearranjos envolvendo as regiões Xp22 e Yp11.3, mas que não apresentavam baixa estatura.

Partindo dos fatos descritos acima, um gene foi isolado dessa região e denominado *SHOX* (*short stature homeobox-containing gene*), sugerindo-se sua haploinsuficiência como causa da baixa estatura observada em pacientes com ST e também em indivíduos com retardo de crescimento idiopático<sup>(12)</sup>. Embora se tratasse do mesmo gene (*PHOG*) descrito por ELLISON *et al.*<sup>(10)</sup>, prevaleceu a determinação *SHOX*.

Mutações no gene *SHOX* causam principalmente baixa estatura, devido ao retardo no crescimento ósseo, além de anomalias esqueléticas múltiplas características da DLW<sup>(13-22)</sup>, e da DML<sup>(17,23)</sup>, ou anomalias esqueléticas isoladas, como redução mesomélica dos membros e deformidade de Madelung<sup>(16,24,25)</sup>.

Recentemente, vários autores ressaltaram a importância de duas regiões “downstream” ao gene *SHOX*, uma entre o *SHOX* e a região DXYS233 e outra entre esta e a região do microsatélite DXYS234 (Figura 2). Acredita-se que estas regiões contenham *enhancers* ou acentuadores, que são sequências de DNA que aumentam a afinidade da maquinaria de transcrição por um certo promotor, e que se apresentam alteradas em vários casos de DLW sem alterações no gene *SHOX*<sup>(26-28)</sup>.



**Figura 2** - Esquema mostra a localização relativa do gene *SHOX* e a região de microssatélites contígua. As setas indicam as regiões *hotspots* (pontos quentes de mutação) deletadas em pacientes com DLW e DML.

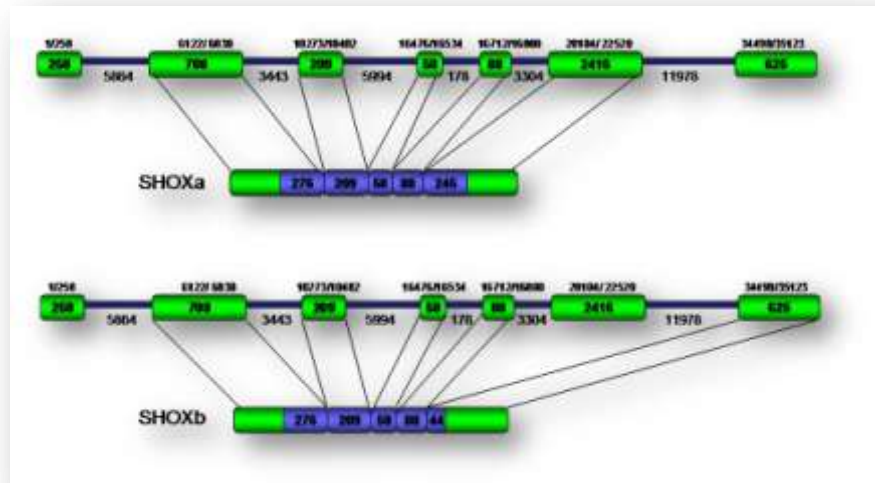
Em adultos, a expressão do *SHOX* ocorre em células ósseas trabeculares<sup>(10)</sup>. RAO *et al.*<sup>(29)</sup>, ao demonstrarem a localização nuclear da proteína SHOX, também mostraram sua ação como proteína ativadora de transcrição em células osteogênicas.

Análises em embriões humanos permitiram concluir que o *SHOX* é altamente expresso em células do primeiro e segundo arcos faríngeos e no desenvolvimento dos membros<sup>(30)</sup>. Esses achados, juntamente com a demonstração de que o gene *SHOX* está presente apenas em vertebrados<sup>(31,32)</sup>, indicam que este gene tem um papel preponderante no desenvolvimento ósseo.

O gene transcreve duas proteínas, denominadas SHOXa e SHOXb. A isoforma SHOXa (Figura 3) é essencial para o desenvolvimento esquelético normal devido à presença da região OAR, fundamental para manter o potencial de



transativação do gene, pois acredita-se que o SHOXb atue modulando negativamente a ação do SHOXa<sup>(29)</sup>.



**Figura 3** - Esquema ilustra o gene *SHOX* com seus éxons e o *splicing* alternativo que leva à formação de dois mRNAs distintos.

### 2.3 ESTRUTURA MOLECULAR DO GENE

O gene *SHOX* (Figura 3) possui 7 éxons, cujas extensões variam de 58 a 2.416 pb. Existe um sítio de *splicing* alternativo no éxon 6 que dá origem a 2 mRNAs, *SHOXa* e *SHOXb*<sup>(12)</sup>, que codificam, respectivamente, proteínas de 292 e 225 aminoácidos (GenBank acessos NM\_000451 e NM\_006883,

respectivamente). Estudos por meio de células somáticas híbridas indicam que tanto *SHOXa* quanto *SHOXb* escapam à inativação do cromossomo X<sup>(12)</sup>.

RAO *et al.*<sup>(29)</sup> demonstraram que *SHOXa* induz transcrição gênica *in vitro*, mas seu papel exato na ontogênese, no metabolismo e no crescimento ósseo ainda não foi definido<sup>(33)</sup>.

O gene *SHOX* apresenta a região de 5'UTR com 694 pb, que inclui o éxon 1 e parte do éxon 2. Existem 7 códons AUG que antecedem o *start codon*, todos os quadros de matriz de leitura apresentam identidade entre 44 e 67% com a sequência consenso Kozak (A/G)CC(A/G)CCAUGG (AUG<sub>1</sub> e AUG<sub>3</sub>) e 3(A/G)+4G favorável para transcrição<sup>(34)</sup>.

Defeitos no gene *SHOX* foram inicialmente identificados em aproximadamente 60% dos casos de DLW, sendo os 40% restantes sem base genética identificada<sup>(35-37)</sup>. Essa alta proporção de casos de origem indefinida sugeriu a presença de regiões não codificantes envolvidas com o gene, ou até mesmo interação do gene *SHOX* com outros genes.

Na tentativa de esclarecer esses casos, BENITO-SANZ *et al.*<sup>(25)</sup> buscaram pequenas deleções em regiões localizadas aproximadamente 30-530 kb “downstream” do gene *SHOX*. As análises mostraram que 15% dos indivíduos do estudo apresentavam deleção nessa região, sugerindo a existência de uma longa região com elementos regulatórios de transcrição ou um locus adicional na região PAR1 que, quando deletado ou mutado, resultaria em fenótipo aparentemente

igual ao de pacientes com DLW com mutações no *SHOX*. No mesmo ano, SCHNEIDER *et al.*<sup>(38)</sup> descreveram uma região “downstream” do gene *SHOX* ausente em indivíduos com diagnóstico clínico de DLW e que não apresentavam alteração nesse gene.

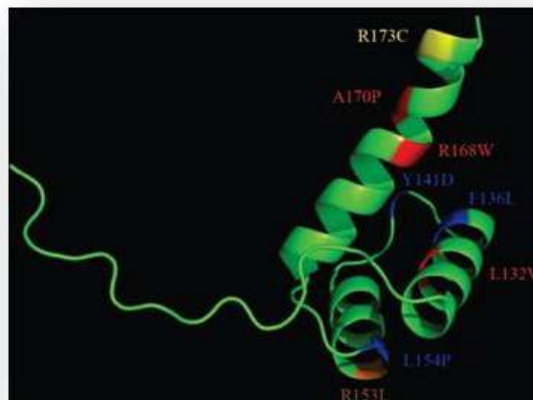
Em continuação a estes estudos, e na tentativa de mapear a localização de um *enhancer* do gene *SHOX*, BENITO-SANZ *et al.*<sup>(39)</sup> utilizaram diversos microssatélites para a região “downstream” do gene, identificando alterações da região PAR1 em 61,5% dos indivíduos com DLW, dos quais 38% foram deleções, indicando que esta região deve ser estudada em indivíduos clinicamente diagnosticados como DLW e que não possuem alteração no gene.

FUKAMI *et al.*<sup>(27)</sup> descreveram a presença de uma região *enhancer* localizada aproximadamente 800-pb “downstream” do gene *SHOX*, no domínio de conservação ECS4, cuja interação se dá com o promotor do éxon 2.

Uma segunda região considerada um ponto quente de recombinação e possivelmente envolvida com o gene *SHOX* foi descrita por ZINN *et al.*<sup>(28)</sup> em torno de 1400-pb “downstream” a esse gene.

## 2.4 A PROTEÍNA SHOX

As duas proteínas SHOX, SHOXa e SHOXb, são semelhantes nos primeiros 211 aminoácidos, ou seja, não compartilham a porção C-terminal. Apresentam três hélices, sendo as duas primeiras em posições antiparalelas e a terceira formando hélice-volta-hélice com a segunda (Figura 4); a terceira hélice encontra o DNA na volta maior<sup>(29)</sup>.

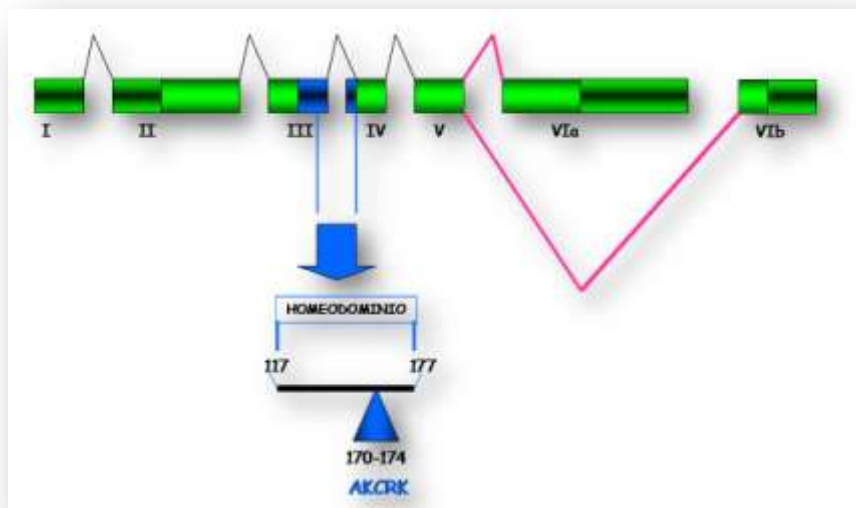


**Figura 4** - Estrutura molecular do homeodomínio da proteína SHOX, baseada no modelo em silico da proteína PAX (Wilson et al., 1995; Lund et al., 2002). As regiões coloridas indicam as algumas mutações encontradas em indivíduos com Leri-Weill. A cor azul indica alteração na habilidade de ligação ao DNA, a vermelha a capacidade de gerar homodímero e a amarela a capacidade de entrar no núcleo e a laranja a atividade transcricional.

A proteína SHOX pertence à família de fatores de transcrição do tipo *homeobox*, caracterizada pela presença de um domínio de 60 aminoácidos (Figura 5). Esta região de homeodomínio é descrita como responsável pela ligação com o

DNA. Os fatores de transcrição, cuja função é a de ativar ou reprimir a expressão de determinados genes, têm um importante papel durante a embriogênese e desenvolvimento, regulando o padrão de formação e organogênese<sup>(40,41)</sup>. Mutações em genes *homeobox* estão associadas a diversas afecções humanas.

Uma vez que SHOX pertence à subclasse Q<sup>50</sup> (aminoácido Glutamina na posição 50) de proteínas de homeodomínio, acredita-se que a sequência do DNA à qual ela se liga seja a sequência palindrômica 5'-TAAT(N)<sub>3</sub>ATTA-3', onde (N)<sub>3</sub>=GGC, sendo necessária a formação de dímero (SHOX-SHOX) para melhor atividade<sup>(42)</sup>.



**Figura 5** - Região no gene *SHOX* correspondente ao homeodomínio da proteína.

Observou-se que mutações que tornam a proteína SHOX truncada na região C-terminal estão relacionadas à maioria dos casos de DLW e à baixa estatura idiopática, por impedirem a ativação dos genes-alvo. Estudos mostraram

também que as mutações da região C-terminal não interferem na localização nuclear da proteína; logo, o prejuízo da atividade da proteína SHOX truncada não decorre de interferência no seu deslocamento para dentro do núcleo<sup>(29)</sup>.

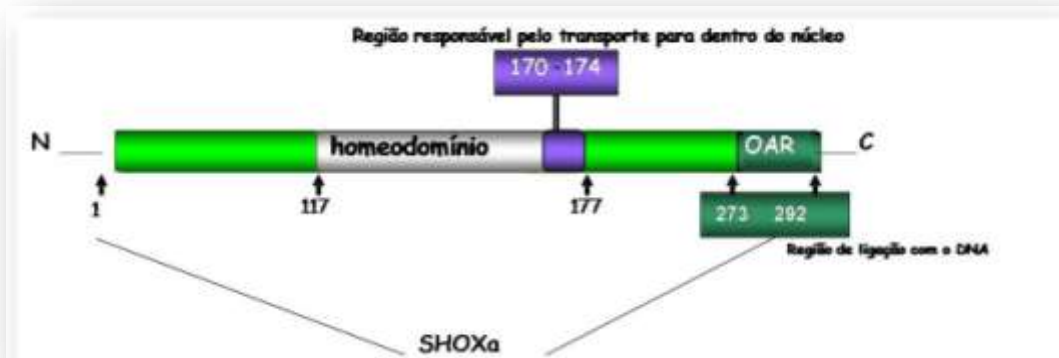
Em estudos realizados com proteínas mutantes foi constatado que a região interna do homeodomínio (AKCRK, 170-174) é responsável pela regulação da entrada da proteína no núcleo<sup>(43)</sup>.

SCHNEIDER *et al.* (2005) encontraram duas novas mutações (R173H e Y141D) que interferem na translocação da proteína para o núcleo e/ou reduzem a capacidade de dimerização. A mutação R173H está localizada no penta peptídeo do homeodomínio AKCRK, enquanto a mutação Y141D localiza-se fora deste homeodomínio.

Em testes com as proteínas SHOX mutantes nos resíduos R153L, R195X e S106A, estas se mostraram ineficientes com relação à ativação da transcrição, não afetando a proliferação celular; concluiu-se, assim, que a região de homeodomínio não apenas é responsável pela translocação da proteína para o núcleo como também pode estar relacionada à dimerização e ligação com o DNA<sup>(31,44,45)</sup>.

A capacidade da proteína em promover a ativação dos genes-alvo foi estudada por RAO *et al.*<sup>(29)</sup>. Culturas celulares que apresentavam genes mutados na região terminal (como a mutação R195X) sintetizavam proteínas não funcionais com ausência dos 19 aminoácidos finais e não possuíam atividade de transcrição. Isto se deve à ausência da região do domínio OAR (*orthopedia aristaless rax*),

responsável em grande parte pela ligação proteína/DNA que induz transcrição (Figura 6).



**Figura 6** - Representação da Proteína SHOXa e os domínios existentes.

Considerando que existe um sítio de *splicing* alternativo que determina a síntese de dois tipos de proteínas (SHOXa e SHOXb), e que a mutação que determina o truncamento da proteína SHOXa impossibilita a formação da proteína SHOXb em sua integridade, podemos considerar que indivíduos com o gene mutado na região terminal apresentam uma haploinsuficiência de ambas as proteínas, o que pode gerar o fenótipo de DLW. Mutações distintas foram encontradas, entretanto, em pacientes com DLW, o que pode ser justificado com base na alteração conformacional da proteína traduzida, em que diferentes mutações podem levar a inativação da proteína final.

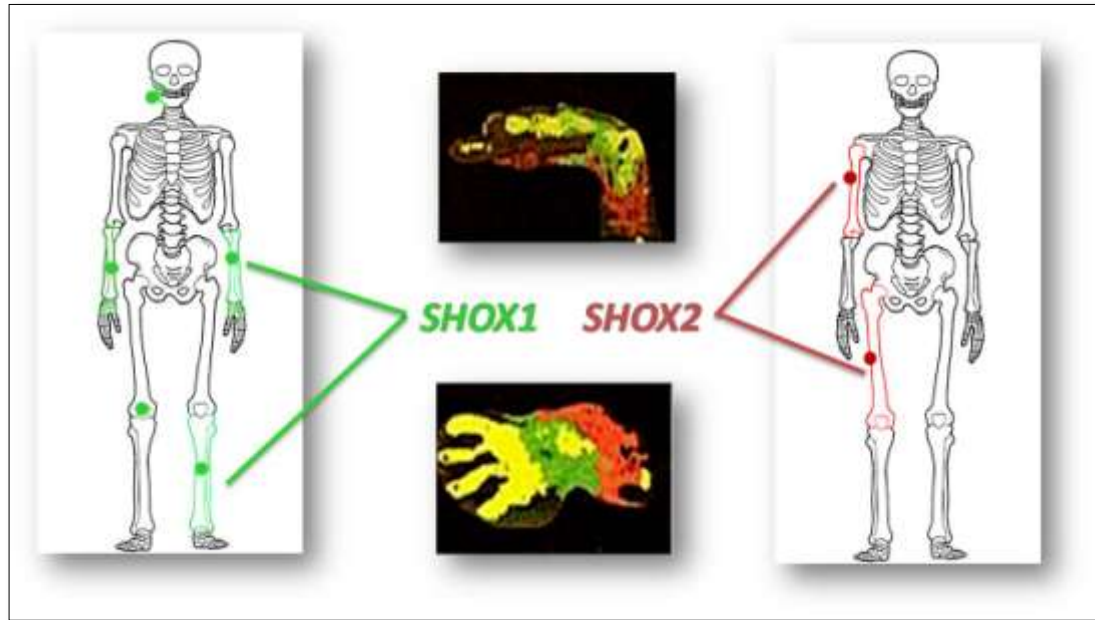
Há um grupo de indivíduos que apresentam uma grande variação fenotípica com alteração genética no gene *SHOX*, mas sem DLW. Este fato pode ser explicado pelo *splicing* alternativo, com formação de duas proteínas. De

acordo com BINDER *et al.*<sup>(46)</sup>, as duas proteínas teriam papéis distintos, sendo SHOXa ativador transcricional preferencial e SHOXb um modulador da atividade de SHOXa, podendo o heterodímero SHOXa/SHOXb e o homodímero SHOXb ter atividade diferenciada do homodímero SHOXa. Outra hipótese é que exista a formação de heterodímeros com a proteína do gene *SHOX2* (*Short stature Homeobox 2*), localizado no cromossomo 3q25-q26.1.

A proteína SHOX2 (SHOT) possui estrutura semelhante à proteína SHOX, apresentando homeodomínios idênticos e sítios de fosforilação conservados<sup>(47)</sup>. Tanto o gene *SHOX* quanto *SHOX2* têm provável origem no gene *Og12x* de camundongo, que durante a embriogênese se expressa em quatro regiões: sistema nervoso central, coração, região craniofacial e região proximal dos membros. O mesmo padrão de expressão é observado em embriões humanos com o gene *SHOX2*, enquanto a expressão de *SHOX* foi detectada somente nos arcos faríngeos e membros (Figura 7). O gene *SHOX* é expresso inicialmente no tecido mesenquimal ainda não diferenciado; quando ocorre condensação do mesênquima, *SHOX* é fortemente expresso na região pericondral. Esta expressão específica no desenvolvimento ósseo sugere que a proteína SHOX esteja envolvida na morfologia do osso<sup>(30)</sup>.

A comparação entre a estrutura dos genes *SHOX* e *SHOX2* e respectivas proteínas mostrou que existe, além de um homeodomínio homólogo, o domínio OAR (*orthopedia aristaless rax*), composto por 14 aminoácidos na região C-terminal<sup>(30)</sup>.





**Figura 7** - Distribuição da expressão dos genes *SHOX* (em verde) e *SHOX2* (em vermelho) no esqueleto humano. Em detalhe expressão do gene em mão e punho, de acordo com as cores indicadas (adaptado de Clement-Jones *et al.*, 2000)

## 2.5 *SHOX* E O CICLO CELULAR

MARCHINI *et al.*<sup>(31)</sup> demonstraram que a expressão do *SHOX* em células osteogênicas, em fibroblastos e nos condrócitos leva à parada do ciclo celular e apoptose. Esses eventos estão associados a alterações na expressão de vários outros genes, incluindo os de pRB, p53, e os inibidores da ciclina quinase p21(Cip1) e p27(Kip1). Isso não ocorre, porém, em células provenientes de indivíduos com DLW (*SHOX-mutante*). Além disso, esse gene se expressa

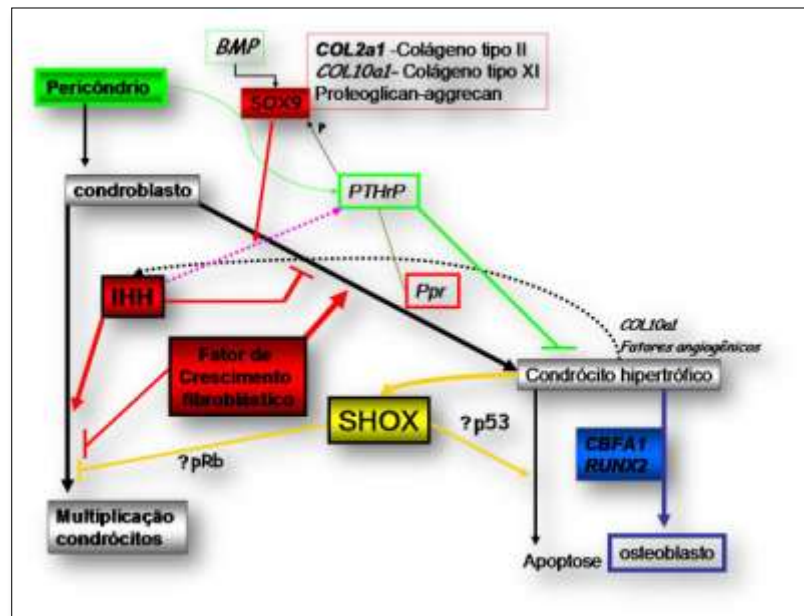
principalmente em condrócitos hipertróficos/apoptóticos da placa de crescimento, indicando que a proteína SHOX possa ter um papel direto na regulação da proliferação e viabilidade dessas células.

A proteína pRb (p110), produzida pelo gene supressor de retinoblastoma, e as proteínas a ela relacionadas, como p107 e p130, atuam no controle da proliferação celular por meio da formação de complexos com outras proteínas celulares, como as da família de fatores de transcrição E2F, e são reguladas por fosforilação e desfosforilação. Os sinais iniciam-se com a fosforilação de uma destas proteínas associada a E2F por parte de um dos complexos CDK/ciclinas, resultando em ruptura do complexo (proteína/E2F) e liberação de E2F.

Nos diferentes estágios do ciclo celular observamos a variação das proteínas associadas a fatores E2F, assim como variação dos próprios E2Fs. Em estágio G<sub>0</sub> (células quiescentes), a associação se dá entre p130 e E2F-4; no entanto, durante a progressão para o estágio G<sub>1</sub>, ocorre escassez deste complexo<sup>(48-52)</sup>. Em células em diferenciação, assim como em células em início da fase G<sub>1</sub>, o complexo observado é o pRb/E2F-1. Já no final desta fase e no início da fase S, observa-se o complexo p107/E2F-4<sup>(53)</sup>.

A indução de *SHOX* gera o aumento da expressão de p53, p21, p27 e p130, e diminuição de pRb e p107<sup>(31)</sup>. A regulação negativa de pRb e p107 sugere diferenciação celular<sup>(53)</sup>; por sua vez, o aumento de p53 levaria os condrócitos à apoptose para que estes sejam substituídos por osteoblastos, ocorrendo o processo histológico de ossificação (Figura 8). Estas observações de ação

antiproliferativa e apoptótica sugerem que a ausência funcional do gene *SHOX* promove uma proliferação atípica dos condrócitos, assim como problemas na sua diferenciação<sup>(54)</sup>.

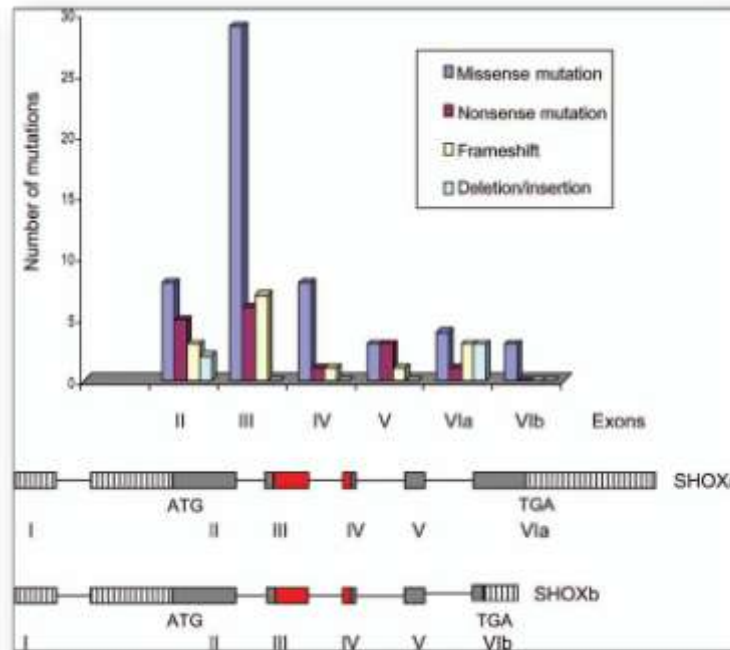


**Figura 8** - Cascata de ossificação sugerindo ação do gene *SHOX* na fase hipertrófica do disco epifisário baseada nos resultados obtidos até o momento com relação ao possível papel desse gene na apoptose celular.

## 2.6 MUTAÇÕES DESCRITAS ATÉ O MOMENTO

A frequência de portadores de mutações no gene *SHOX* nas populações já estudadas era antes estimada em torno de 1:4.000 indivíduos<sup>(55)</sup>; estudos mais recentes sugerem que essa frequência possa chegar a 1:1.000, sendo as principais alterações encontradas até o momento resumidas na Figura 9<sup>(54)</sup>. De

uma forma geral, as deleções/inversões intragênicas são as alterações menos frequentes; outra observação se refere à alta taxa de mutações no éxon 3.



**Figura 9** - Principais alterações no gene *SHOX* descritas até o momento<sup>(54)</sup>.

Microdeleções do gene *SHOX* são mais frequentemente observadas que mutações intra-gênicas<sup>(55)</sup>, o que, segundo OGATA *et al.*<sup>(56)</sup> e MAY *et al.*<sup>(57)</sup>, seria decorrente da abundância de sequências repetitivas em torno desse gene, predispondo a um *crossing over* desigual entre cromossomos homólogos ou recombinação intracromossômica.

RAO *et al.*<sup>(11)</sup>, estudando o gene *SHOX* em 91 pacientes de ambos os sexos com baixa estatura idiopática, por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de polimorfismos de conformação de fita simples

(SSCP), detectaram um indivíduo com uma mutação em heterozigose no nucleotídeo 674 que introduzia um códon de terminação, levando, assim, à produção de uma proteína truncada. Esses autores sugeriram, assim, que 1,1% dos indivíduos com baixa estatura idiopática fossem portadores de mutações nesse gene.

Posteriormente, BELIN *et al.*<sup>(13)</sup> e SHEARS *et al.*<sup>(14)</sup>, com base em casos de DLW nos quais havia rearranjos envolvendo a PAR1, comprovaram que mutações e deleções no gene *SHOX* eram a causa da DLW. Nesses dois trabalhos, foram descritas 14 famílias com DLW, num total de 12 deleções e 2 mutações de ponto, sendo que essas últimas levavam ao surgimento de códons de terminação. Para detecção das deleções, esses dois grupos de autores analisaram perda de heterozigozidade na PAR1 por meio de microssatélites presentes na região Xp22.3 (DXYS233, no caso de SHEARS *et al.*<sup>(14)</sup>, e DXYS233 e DXYS234, no trabalho de BELIN *et al.*<sup>(13)</sup>), e do polimorfismo intragênico *SHOX-CA repeat*, seguindo-se o sequenciamento do gene nos casos em que não havia sido detectada hemizigose.

Por sua vez, BINDER *et al.*<sup>(18)</sup> realizaram a análise do gene *SHOX* em 68 crianças com baixa estatura idiopática. Não foram detectadas mutações por meio da técnica de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP), porém uma das pacientes, uma menina de 15 anos, apresentava deleção do gene detectada por meio da análise de microssatélites, havendo hemizigose de *SHOX-CA repeat*.

GRIGELIONIENE *et al.*<sup>(21)</sup> avaliaram 28 probandos com DLW e 7 com deformidade de Madelung isolada por meio da análise do polimorfismo *SHOX-CA repeat*, de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), com sonda específica para o gene *SHOX*, *Southern blotting* e sequenciamento direto. Foram detectadas alterações em 22 dos 28 probandos com DLW (79%), sendo 16 deleções e 6 mutações de ponto, enquanto, em uma paciente com deformidade de Madelung isolada, havia uma duplicação intracromossômica do gene *SHOX*.

MÜSEBECK *et al.*<sup>(58)</sup> procuraram determinar a frequência de deleções no gene *SHOX* em crianças com baixa estatura por meio de FISH. Nenhuma das 35 crianças analisadas com baixa estatura idiopática apresentava deleções, contudo estas foram detectadas em 5 dos 12 pacientes em que o déficit de crescimento estava associado a anomalias de antebraços (particularmente a deformidade de Madelung).

CORMIER-DAIRE *et al.*<sup>(20)</sup> analisaram 23 famílias com DLW, das quais 16 já haviam sido descritas por BELIN *et al.*<sup>(13)</sup> e HUBER *et al.*<sup>(19)</sup>. Em 12 dessas famílias, foram detectadas deleções no gene *SHOX* por meio da análise de microssatélites, e em 6 o sequenciamento permitiu a detecção de mutações de ponto. Em 3 outras famílias, nas quais essas alterações não foram encontradas, mas havia ligação da DLW à PAR1, esses autores sugeriram o envolvimento de mutações em regiões promotoras. Baseados em duas famílias que não apresentaram alterações quanto à deleção ou mutação pontual do gene *SHOX*,

nem deleção na região PAR1, CORMIER-DAIRE *et al.*<sup>(20)</sup> sugeriram, ainda, haver heterogeneidade genética na determinação da DLW.

ROSS *et al.*<sup>(22)</sup> realizaram a análise molecular de 21 famílias com DLW por meio de FISH, DHPLC (***Denaturing High Performance Liquid Chromatography***) – método de identificação de mutações e polimorfismos baseado na detecção de heteroduplex entre nucleotídeos mal emparelhados em DNA dupla-fita amplificado por PCR – e sequenciamento direto. Detectaram alterações em 100% dos casos: deleções foram observadas em 17 famílias (81%) e mutações de ponto em 4 (19%). Esses autores atribuem a detecção de alterações no *SHOX* em todos os casos analisados à maior sensibilidade do DHPLC seguido de sequenciamento direto em identificar mutações de ponto, em comparação à técnica de SSCP utilizada por outros autores.

Em 2002, RAPPOLD *et al.*<sup>(15)</sup> pesquisaram a existência de deleções ou mutações de ponto no gene *SHOX* em 900 indivíduos com baixa estatura idiopática. Dentre eles, 750 foram analisados por meio de SSCP, sendo detectadas 3 mutações de ponto consideradas funcionais (0.4%); 150 foram analisados pela técnica de FISH, sendo detectados 3 casos de deleção (2%). Esses autores consideraram, assim, que, entre crianças com baixa estatura idiopática, a frequência daquelas com mutações no gene *SHOX* seria semelhante à de portadoras de deficiência de hormônio de crescimento e de síndrome de Turner.

Por sua vez, FLANAGAN *et al.*<sup>(37)</sup> verificaram a frequência de mutações no gene *SHOX* entre 18 probandos com deformidade de Madelung bilateral com o uso de FISH, análise de segregação por meio dos polimorfismos DXYS233, DXYS234 e *SHOX-CA repeat*, e sequenciamento direto de toda a região codificante desse gene. Deleções foram identificadas em 6 dos 18 probandos, e mutações de ponto em outros 3; em 3 casos havia, ainda, indicações da existência de deleções ou rearranjos em regiões que flanqueavam o gene. Dentre as mutações de ponto encontradas, 2 levavam ao surgimento de *stop codons* prematuros e outra abolia um sítio de *splicing*; nesse último caso, o RNA correspondente ao alelo mutante não foi detectado entre os produtos de RT-PCR obtidos de fibroblastos de medula óssea, indicando que o mRNA deve ser rapidamente degradado *in vivo*.

MORIZIO *et al.*<sup>(24)</sup> avaliaram 56 pacientes com baixa estatura idiopática por FISH, encontrando deleções em 4 casos (7,1%). Já BINDER *et al.*<sup>(16)</sup>, estudando 140 crianças com baixa estatura idiopática por meio da análise dos polimorfismos DXYS233 e *SHOX-CA repeat*, encontrou deleções em 3 probandos (2%).

Ao analisar 33 indivíduos pertencentes a 20 famílias com deformidade de Madelung bilateral e encurtamento de membros, BINDER *et al.*<sup>(46)</sup> encontraram deleções em sete famílias (35%) e mutações de ponto em outras sete (35%). Em outras seis famílias (30%), não foram encontradas alterações no gene. Estudos de



ligação sugerem existir genes adicionais contribuindo para a DLW (CORMIER-DAIRE *et al.*<sup>(20)</sup>.

Vários autores descreveram diversas mutações no gene *SHOX*, entre as quais deleção completa ou parcial do gene, inserções, transições e transversões. As mutações ocorrem preferencialmente no éxon 3, onde se localiza o homeodomínio 1.

Embora muitas mutações tenham sido descritas em indivíduos com baixa estatura e DLW, em alguns casos, nada foi observado. Mais recentemente, alterações na região 3' do gene foram descritas, sugerindo a existência de um *enhancer cis*-atuante nesta região<sup>(59)</sup>.

## **2.7 DISCONDROSTEOSE DE LERI-WEILL**

A Deicondrosteose de Leri-Weill (DLW) (OMIN 123700) foi descrita em 1929 por LERI e WEILL<sup>60</sup> e caracteriza-se por estatura de magnitude variável, chegando, na idade adulta, a uma altura que varia de 135 cm até a normal. As anomalias das extremidades são características: consistem de encurtamento mesomélico (segmento intermediário) dos membros, particularmente os superiores, e deformidade de Madelung. Outras anomalias esqueléticas, como

mãos e pés pequenos e encurtamento de IV metacarpianos e (ou) metatarsianos, também podem ser encontradas.

Há alguns anos, a DLW era considerada anomalia de herança autossômica dominante, sendo constatado, porém, um excesso de mulheres afetadas entre os casos registrados<sup>(61)</sup>. Novos estudos demonstram que se trata, na verdade, de afecção de herança pseudo-autossômica dominante, devido ao fato do gene estar localizado em região pseudo-autossômica nos cromossomos X e Y<sup>(13,14)</sup>. Vários trabalhos mostram que de 50 a 90% dos pacientes clinicamente diagnosticados com DLW possuem mutação na região do gene *SHOX*<sup>(15-16)</sup>.

BENITO-SANZ *et al.*<sup>(39)</sup> descreveram pacientes com DLW com deleções em pontos distintos, demonstrando a heterogeneidade das deleções do gene *SHOX* nestes pacientes, e indicando ainda que a região “downstream” do gene é de extrema importância para ser analisada nestes casos.

No mesmo ano, utilizando a nova técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) para detecção de alterações na região PAR1, BENITO-SANZ *et al.*<sup>(62)</sup> analisaram 26 pacientes com DLW e identificaram deleções nessa região em 61,5% deles. Deleções *downstream* do gene foram encontradas em 38% dos probandos, indicando a importância da análise da região em pacientes com DLW que não apresentam deleção do gene *SHOX*<sup>(62)</sup>.

## 2.8 DISPLASIA MESOMÉLICA DE LANGER

A DML (OMIM 249900) caracteriza-se por baixa estatura acentuada com aplasia ou hipoplasia grave de ulna e fíbula associada a espessamento e encurtamento do rádio e da tibia, deformidade de mãos e pés e hipoplasia de mandíbula. É resultante de nulizigose do gene *SHOX* ou, como ocorre em muitos casos, de homozigose da mutação no gene determinante da DLW<sup>(17,23)</sup>, tendo sido caracterizada como “nova forma” de Síndrome de Leri-Weill grave<sup>(63)</sup>.

Em vários dos casos relatados as análises moleculares evidenciaram alterações em ambos os alelos do gene *SHOX*, ou, em alguns outros, alterações apenas da região “downstream” do gene<sup>(59)</sup>.

A nulizigose do gene *SHOX* foi descrita em um menino com DML cujo pai, mãe e avó materna tinham DLW moderada, sugerindo que a região cromossômica que apresentava deleção foi transmitida para as novas gerações<sup>(64)</sup>.

ZINN *et al.*<sup>(23)</sup> confirmaram a deleção completa do gene *SHOX* em um caso de DML, mostrando que esse gene é essencial para o desenvolvimento esquelético. Outros estudos também confirmaram a sua importância no desenvolvimento, mostrando que pacientes com fenótipo clássico de Langer apresentavam mutações em homozigose ou heterozigose composta, concluindo ser a DML a forma homozigótica da DLW.

THOMAS *et al.*<sup>(65)</sup> analisaram um feto com DML apresentando ausência das regiões *CA-repeat* do gene *SHOX* e da região *DXYS233*, microssátélite próximo ao gene. Recentemente, CAMPOS-BARROS *et al.*<sup>(66)</sup> descreveram um caso de DML em que o propóscito apresentava deleção da região PAR1 aparentemente em heterozigose; neste caso, os pais haviam transmitido as deleções da região PAR1, nas quais o gene *SHOX* estava ausente, porém as deleções apresentadas pelo pai diferiam da deleção apresentada pela mãe.

## **2.9 SÍNDROME DE TURNER**

A síndrome de Turner (ST) é caracterizada citogeneticamente pela presença de um cromossomo X e perda total ou parcial do segundo cromossomo sexual, levando, assim, à monossomia de um ou mais genes comuns aos cromossomos X e Y que escapam à inativação. A baixa estatura é a principal característica, presente em cerca de 95% dos casos<sup>(67)</sup>. O segundo sinal mais constante (90%) é o hipogonadismo de origem gonadal; além disso, na ST são observadas diversas malformações, dismorfismos e patologias adquiridas<sup>(68)</sup>.

Nas pacientes com ST, podem ser identificadas várias fases distintas no crescimento espontâneo<sup>(69)</sup>, como: retardo do crescimento intraútero, sendo o comprimento ao nascer cerca de 1 desvio-padrão abaixo da média; velocidade de

crescimento normal ou próxima do normal do nascimento até 2 a 3 anos de idade; declínio progressivo da velocidade de crescimento dos 3 aos 14 anos, com desvio gradual e progressivo dos percentis normais de crescimento; e ausência do estirão puberal, sendo que o crescimento durante a adolescência persiste lentamente por vários anos, acompanhado de atraso na fusão das epífises ósseas.

O distúrbio do crescimento esquelético observado na ST manifesta-se, além da baixa estatura, por distúrbio do crescimento dos ossos longos e da base do crânio, levando a posicionamento anômalo do meato auditivo e alteração da relação entre o ouvido médio e a tuba, e, conseqüentemente, a otites médias recorrentes, fácies característica com micrognatia, *cubitus valgus*, pescoço curto, peito escavado, tórax em escudo, encurtamento de metacarpianos e metatarsianos, particularmente do IV metacarpiano, palato ogival, *genu valgum*, escoliose, e ainda, em 7,5% dos casos, deformidade de Madelung nos punhos. A deformidade de Madelung, também chamada deformidade em baioneta, caracteriza-se por um encurvamento lateral e dorsal do rádio associado a anomalias do carpo e deslocamento ou subluxação dorsal da extremidade distal da ulna<sup>(70)</sup>.

Correlações entre fenótipo e cariótipo permitiram estimar que a região Xp22 do cromossomo X é responsável pelo surgimento dos estigmas da ST, quando ausente<sup>(71)</sup>, e que, no cromossomo Y, esses genes estariam localizados numa pequena região do braço curto Yp11.3<sup>(72)</sup>.

## *OBJETIVOS*

---

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a frequência de alterações no gene *SHOX* em indivíduos com quadro clínico compatível com discondrosteose de Léri-Weill ou displasia mesomélica de Langer.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Investigar a existência de microdeleções por meio da análise de microssatélites.

Investigar a ausência de Heterozigosee por novas técnicas disponíveis, como “Real Time” e MLPA.

Investigar a existência de mutações de ponto no gene *SHOX* dos pacientes que apresentaram os alelos em heterozigose.

## *MATERIAL E MÉTODOS*

---

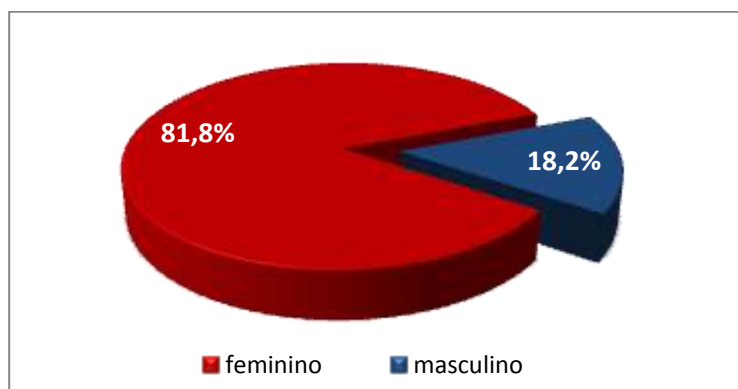


## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CASUÍSTICA**

A casuística deste trabalho foi composta por onze pacientes acompanhados nos serviços de Pediatria (Pediatria Geral, Crescimento e Desenvolvimento e Endocrinologia Pediátrica), Ortopedia (Cirurgia de Mão) e Genética (ambulatórios do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo – GIEDDS – e de Erros Inatos do Metabolismo) do HC – UNICAMP. Esses indivíduos apresentavam características clínicas compatíveis com DLW (dez casos) ou DML (um indivíduo). Os pacientes participaram mediante a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, baseado no projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (Processo nº 939/2001 – Anexo 1).

Dos onze pacientes do grupo (Tabela 1), com idades variando entre 4,9 e 23,5 anos, dois eram do sexo masculino e 9 do sexo feminino (Figura 10). Esses pacientes, que apresentavam encurtamento da porção média dos membros (mesomelia) e (ou) deformidade de Madelung com ou sem baixa estatura, eram procedentes dos serviços já citados, sendo que alguns foram encontrados através de busca nos arquivos do HC por meio do código internacional de doenças e de pesquisa no arquivo nosológico do serviço de Radiologia.



**Figura 10** - Distribuição dos pacientes de acordo com o sexo.

**Tabela 1** – Casuística composta de indivíduos com mesomelia e (ou) deformidade de Madelung associadas ou não a baixa estatura.

Caso nº.	Sexo	Idade decimal (anos)	Estatura cm	Score Z estatura	Anomalias esqueléticas	Recorrência familiar	Hipótese Diagnóstica
1	F	22,3	141	-2,05	MES + MAD	Irmã com quadro semelhante; outra irmã e sobrinho com BE	DLW
2	F	4,9	113	-2,30	MES + MAD	Mãe e avó materna com quadro semelhante	DLW
3	F	11,3	130	-2,10	MES + MAD	Vários casos de BE e (ou) MAD na irmandade e na família materna	DLW
4	F	12,5	143	-2,00	MAD	Mãe com quadro semelhante	DLW
5	F	23,5	160	-0,52	MAD	não	DLW
6	F	22,4	158,7	-0,72	MES + MAD	Mãe apresenta quadro semelhante	DLW
7	M	7,9	100,1	-4,95	MES	não	DLW
8	F	5	83	-5,98	MES + MAD	Mãe, bisavó e bisavô paternos	DML
9	M	13	139	-2,24	MES + MAD	Irmãos, mãe	DLW
10	F	10,10	135	-0,54	MÊS+MAD	Mãe	DLW
11	F	13,6	144	-2,31	MAD+BRA	Irmã	DLW

**MES = mesomelia; MAD = deformidade de Madelung; BE = baixa estatura; BRA=braquidactília**

## 4.2 ESTUDOS MOLECULARES

Os estudos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maricilda Palandi de Mello.

### 4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As amostras do DNA genômico foram obtidas a partir de sangue total periférico (aproximadamente 10 mL) colhido em 1 mL de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico dihidratado) 10 % pH 8,0 como anticoagulante, no Ambulatório de Pediatria do HC da UNICAMP.

Adicionou-se Solução A (Quadro 1) ao sangue coletado até o volume de 50 mL e manteve-se o tubo a 4°C por 30 minutos, para lise das hemácias. Centrifugou-se a 2.000 rpm, 4°C por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado (“pellet”) em 20 mL de Solução A. Após a repetição da operação, o “pellet” foi ressuspendido em 1 mL de Solução B (Quadro 1) diluída para 1x. Acrescentaram-se 250 µl de Solução C (Quadro 2), contendo Proteinase K<sup>(74)</sup>.

Incubou-se a mistura sob leve agitação a 37°C, durante um período de aproximadamente 18 horas, ou a 65°C, por 2 horas. Para a extração do DNA, adicionou-se 1,25 mL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (Applied Biosystems).

Homogeneizou-se a mistura por inversão cuidadosa do tubo durante 5 minutos, após o que se centrifugou a 2.500 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente, para separação e recuperação da fase aquosa (superior). À fase aquosa, acrescentou-se novamente igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 seguindo-se a centrifugação. Repetiu-se o procedimento duas vezes com solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) e por último com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v:v). Para a precipitação do DNA, acrescentou-se 1/10 do volume obtido de acetato de sódio 3 M e 2,5x o volume de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com o auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70% antes de ser ressuspendido em volume que variou de 200-500 µl de TE 1x. A concentração de DNA foi calculada através de leitura de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro, sendo a integridade do DNA testada em eletroforese com gel de agarose 0,8%.

**Quadro 1** – Composição das soluções A e B.

<b>Solução A</b>		<b>Solução B (2x concentrada)</b>	
Triton-X	1%	Na <sub>2</sub> EDTA	20mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM	NaCl	20mM
Sacarose	0,32M	Tris-HCl	20mM (pH 8,0)
Tris-HCl	10mM (pH 8,0)		

**Quadro 2** – Composição da solução C.

<b>Solução C (para 1mL)</b>
0,5 mL de solução B
1mg de Proteinase K (Boehringer Mannheim GmgH, Mannheim, Germany)
0,5 mL de SDS 10%

#### **4.2.2 ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES**

Para realização do trabalho utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) para amplificação dos fragmentos referentes às regiões de repetições próximas e dentro do gene. As regiões estudadas foram CA-repeat (dentro do gene), DXYS10092, DXYS10093, DXYS10091, DXYS10083 e DXYS233 (Figura 3).

Foram realizados PCRs, utilizando-se  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP para marcação radioativa dos fragmentos, em seguida separados em gel de poliacrilamida 7%. O gel de poliacrilamida foi secado, exposto em filmes de raios-X por períodos variáveis e, posteriormente, revelado. Como método alternativo, fez-se a PCR normal, sendo os fragmentos produzidos separados em eletroforese em gel de poliacrilamida 7%, e depois, feita a coloração com prata.

A amplificação feita por PCR radioativo foi efetuada em um volume final de 12,5  $\mu$ L, contendo de 50 a 100 ng de DNA genômico, 20 nM de cada *primer*, 200  $\mu$ M de cada dNTP (0,2 mM dATP + 0,2 mM dTTP + 0,2 mM dGTP + 0,1 mM dCTP

+ 1 $\mu$ Ci [ $\alpha^{32}$ P] dCTP), 0,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão de reação para enzima, MgCl<sub>2</sub> (1,0 a 1,5 mM). As sequências dos *primers* utilizados para cada região, assim como o tamanho do produto esperado, encontram-se descritos na Tabela 2<sup>(14,18,75)</sup>. Foram usados os ciclos de amplificação de SHEARS *et al.*<sup>(14)</sup>; CORMIER-DAIRE *et al.*<sup>(75)</sup> e BINDER *et al.*<sup>(18)</sup>, adaptados de acordo com a Tm de cada *primer* utilizado.

**Tabela 2** - Sequência de *primers* utilizados para amplificação das regiões SHOX-CA, DXYS10091, DXYS10092, DXYS10093, DXYS10083 e DXYS233 (SHEARS *et al.*<sup>(14)</sup>; CORMIER-DAIRE *et al.*<sup>(75)</sup>; BINDER *et al.*<sup>(18)</sup>).

Região	Sequência dos pares de <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho pb	% H	Temp.°C
<b>DXYS233</b>	S - TGGGAATTCGAGGCT A - TGATTTCCATCCT-GGGGT	271-291	<b>92</b>	55
<b>SHOX-CA</b>	S - CATGTCATATATATATGTGATCC A - GACACAGAAATCCTTCATAAAAT	136-156	<b>86</b>	55
<b>DXYS10091</b>	S – GAATTGCTTGAACCTGGC A - AGGGAGGTCATACCTTGTTGAA	202-222	<b>60</b>	55
<b>DXYS10092</b>	S - TTCGTGACAAAGGCCTTTGC A - CTACAAGTCCTAGTACCTAC	317-367	<b>96</b>	53
<b>DXYS10093</b>	S – GCCCGTGATCCAGTACTG A - CAACTTCCTTGAAATCTTC	233-259	<b>69</b>	55
<b>DXYS10083</b>	S – GGGGGTGTGGAAATGGTATAAT A – TTACAATGTATGTCAGCAGAGACC	150-172	<b>82</b>	51

**A=** fita *antisense*; **S=** fita *sense* ; **H=** heterozigose para o loco em questão

Após execução da PCR, ao produto foi adicionado um tampão de carregamento contendo 95% de formamida; 0,05% de azul de bromofenol; e 20

mM de EDTA, pH 8,0. A seguir, as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95<sup>o</sup> C e aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida 7%. A eletroforese foi realizada a 1350 V, 50 W, 50 mA, por 3 a 5 horas, dependendo do tamanho dos fragmentos gerados para cada região estudada. Os géis foram colocados em secador de gel por uma hora e posteriormente expostos a filmes de raios-X (Hyperfilm MP – Amersham-Pharmacia) a -70<sup>o</sup> C por 2 a 24 horas, dependendo do decaimento do material radioativo estimado pelo tempo de estoque no laboratório (meia-vida do <sup>32</sup>P = 14,5 dias).

#### **4.2.3 “SOUTHERN BLOT”**

A fim de padronizar uma técnica alternativa para detecção de hemizigose, devido a impossibilidade de se determinar homozigose ou hemizigose por microssatélites, foi realizado em um caso de deleção (paciente 3) o experimento de “Southern blotting”, para a técnica foram utilizados como sonda o fragmento exon 4,5 para o gene *SHOX* e sonda do fragmento exon 3 para o gene controle (*DMRT1*).

Foram digeridos 12 µg de DNA genômico com a enzima de restrição *Hind III* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) em um volume total de 200 µL segundo o protocolo descrito pelo fabricante da enzima, sendo as reações incubadas em

banho-maria a 65°C por 18h. Após a incubação, a eficiência da reação foi testada separando as amostras em gel de agarose 0,8%. Em seguida, o DNA foi precipitado com 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, por 2 h a -20 °C. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos em microcentrífuga e, o precipitado contendo DNA digerido foi lavado com etanol 70%. Após centrifugação (13.000 rpm por 10 minutos), o DNA foi ressuspendido em 20 µL de TE, e aplicado em gel de agarose de baixa eletroendosmose (Sigma Chem. Corporation) a 0,8% em tampão TBE para separação dos fragmentos; a corrida eletroforética durou em média 18h a 50V.

Após ser fotografado, o conteúdo do gel foi transferido para uma membrana de *nylon* (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences), seguindo-se as especificações do fabricante (da membrana). Antes da transferência o gel foi despurinado em HCl 0,25 N por 12 min, e, em seguida, desnaturado em NaOH 0,4 N, NaCl 1N por 30 min. O DNA foi transferido para a membrana por capilaridade durante aproximadamente 18 h, como descrito em SAMBROOK *et al.*<sup>(74)</sup>. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de neutralização (tampão fosfato de sódio 0,1 M) durante 30 min. A membrana foi secada em papel de filtro e colocada em forno a 80°C por 2h.



#### 4.2.3.1 SONDAS

Como sonda, empregou-se um produto de 330 pb, obtido a partir da amplificação por PCR dos éxons 4 e 5 do gene *SHOX*. Para o procedimento, foram utilizados os *primers* **4,5S** (5'-TCTCTCTCTGCTTCTCCCCA-3') e **4,5AS** (5'-CAGGTCCCTAGGGATCTTCA-3'). Como controle, fez-se uso de um produto de PCR com tamanho de 226 pb, do gene *DMRT1* (*Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor*), tamanho próximo ao do produto empregado para o gene *SHOX*. O gene *DMRT1* foi escolhido por ser um gene de cópia única situado no cromossomo 9. Para amplificação do fragmento *DMRT1*, foram utilizados os *primers* DMRT1. 1s (5'-ACTTCTCCTAGGGGCACCAT-3') e DMRT1. 1a (5'-ACTTCTTGCTCCCGGCA C-3'). O ciclo de amplificação usado por SHEARS *et al.*<sup>(17)</sup> para éxon 4,5 do gene *SHOX* foram utilizados para a sonda que identificaram o gene *SHOX*, os primers usados por ASSUMPÇÃO (2002) foram utilizados para a sonda de *DMRT1*. As sondas e DNA foram marcadas com  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham Biosciences) pelo método de *Random Priming* (Primer Randomico), seguindo-se o protocolo do fabricante do kit *Random Primers DNA Labeling System* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos).

A sonda foi purificada através de filtração em gel, usando-se uma coluna de Sephadex G-50 (Sigma Chem. Corportion), empacotada em solução saturada de Tris-HCl, 1 M, pH 8,0, em uma seringa de 1 mL, através de sucessivas centrifugações por 4 min a 3.000 rpm. Antes de purificar a sonda, equilibrou-se a

coluna com 100 µl de TE, por centrifugação. Retirou-se 1 µl da sonda purificada para a contagem do nível de incorporação radioativa em contador de cintilação líquida (LKB).

#### **4.2.3.2 HIBRIDIZAÇÃO**

As membranas contendo os DNAs digeridos foram hibridizadas com as sondas *Éxon 4,5* e *DMRT1*, seguindo-se o protocolo descrito por MORNET, *et al.*<sup>76</sup>, porém, com algumas modificações. As membranas foram pré-hibridizadas em Tris-HCl 0,2 M, pH 7,0, contendo 50% formamida (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), 10x Denhardt's, 5x SSC, 1% SDS, e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado, e incubadas em forno de hibridização (Amersham Biosciences) a 42°C, por aproximadamente 18 h. A solução de hibridização foi substituída, contudo, usando-se apenas 5x Denhardt's, e adicionando-se a sonda marcada desnaturada em NaOH 0,3 N. As membranas foram hibridizadas a 42°C por 16 h. Após hibridização, os filtros foram lavados em solução de adstringência média (1x SSC; 0,1% SDS) à temperatura ambiente, por 10 min<sup>(74)</sup>. Em seguida, lavaram-se os filtros duas vezes em solução de alta adstringência (0,5x SSC; 0,1% SDS) a 65°C durante 5 min.

#### **4.2.3.3 AUTORRADIOGRAFIA E REMOÇÃO DA SONDA DAS MEMBRANAS:**

Os filtros lavados foram expostos a filmes de raios-X (Hyperfilm MP-Amersham) em cassetes de exposição contendo intensificador de sinal (*Lightning Plus* - Dupont), a -70°C por 2 dias. Após esse período, os filmes foram revelados. A sonda foi removida dos filtros, incubando-se os mesmos em solução Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, 0,04% de EDTA e 0,1% de SDS, a 100°C, até que a solução atingisse a temperatura ambiente. Os filtros tratados foram selados em saco plástico, armazenados a 4°C e posteriormente re-hibridizados.

#### **4.2.4 SEQUENCIAMENTO**

Uma vez confirmada a heterozigozidade nos pacientes, foram avaliadas possíveis mutações no gene *SHOX*. Para isto realizou-se a amplificação dos éxons 1 a 5 por PCR, utilizando-se 4 pares de *primers*, descritos na Tabela 3<sup>(14)</sup>. Priorizaram-se os éxons 2, 3 e 4,5 uma vez que as alterações descritas até o momento neles se concentravam. Além disto, os *primers* para as demais regiões apresentaram problemas quanto ao anelamento. Como os éxons não são

extensos, foram usados os próprios *primers* de amplificação, não sendo necessária a utilização de *primers* internos. Os ciclos de amplificação foram modificados com relação àqueles descritos por SHEARS *et al.*<sup>(14)</sup>.

**Tabela 3** - Sequência de pares de *primers* utilizados para amplificação dos éxons 2, 3 e 4, 5<sup>(14)</sup>.

Éxon	Sequência de pares de <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho pb	Temp. °C
2	S - AGGCGTAAATAAGAGCGCTG	500	57
	A - GAGACGGGAGCTGCAAATGT		
3	S - GTTGCGCAAAACCTCCCC	328	60
	A - CGTGCTGTGCGCTCCC		
4,5	S - TCTCTCTCTGCTTCTCCCCA	330	57
	A - CAGGTCCCTAGGGATCTTCA		

A= fita *antisense* S= fita *sense*

Após a amplificação, as amostras foram separadas em gel de agarose 1%, fotografadas e purificadas com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega Corporation, Estados Unidos). A reação de sequenciamento foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, estando os ciclos de amplificação e as condições da reação representados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Esquema da reação de sequenciamento.

REAÇÃO	[ ] FINAL	CICLO GERAL
Produto da PCR	1 µg	<b>1ciclo</b> 94°C, 5 min
Tampão (10x)	1x	<b>30ciclos</b> 94°C, 1 min T <sub>m</sub> do “primer”, 1min 30 seg 72°C, 5 min
“*primer”	0,6 pmoles	
Big Dye – Applied Bisystem- v3.1	2 µL	
Água qsp	10µL	<b>1ciclo</b> 72°C, 5 min

\* As sequências dos *primers* utilizados para o sequenciamento estão listadas na Tabela 3.

A reação de sequenciamento foi purificada com etanol 80% gelado, seguida de 45 min de centrifugação a 3700 rpm. O sobrenadante foi descartado, acrescentando-se etanol 70%, sucedendo-se mais 10 minutos de centrifugação a 3700 rpm; em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hi-Di (*Applied biosystem*), desnaturadas a 95°C por 5 min e imediatamente colocadas em gelo. Foram então sequenciadas no *ABI PRISM 3700 DNA Analyser* (*Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos*). Os *softwares* utilizados para a análise das sequências foram: *Chromas, Gene Runner* e/ou *CLC Main Workbench 5*

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com a sequência normal do DNA do gene *SHOX* (NT\_028413) com o auxílio dos programas de análise *Chromas* e *Gene Runner*.

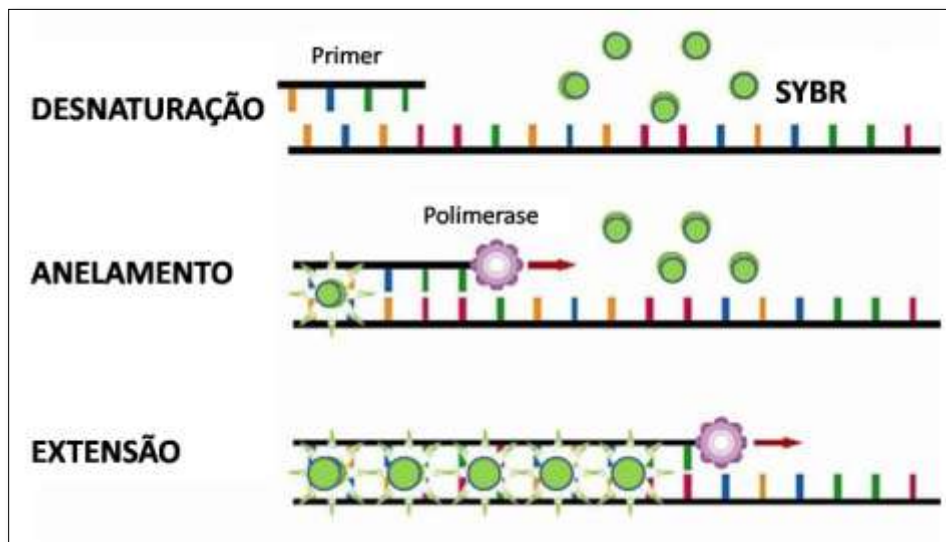
#### 4.2.5 PCR EM TEMPO REAL

A técnica de PCR em tempo Real foi realizada na tentativa de confirmação de hemizigose e exclusão de homozigose em pacientes que apresentavam banda única em determinadas regiões nas análises de microssatélite.

A PCR em tempo real, uma técnica confiável para a detecção e medida de produtos gerados durante cada ciclo da reação em cadeia da polimerase, tem como base a emissão de compostos fluorescentes que geram um sinal a cada ciclo da reação. Esta emissão aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR.

A capacidade medida do produto em “tempo real” é possível devido ao acúmulo de fluorescência a cada ciclo da reação. Assim, pode-se saber a quantidade de produto em um ponto no qual a reação ainda está na fase exponencial<sup>(77)</sup>. Por este motivo, essa técnica permite a quantificação, o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, eliminando a detecção em gel de eletroforese<sup>(78)</sup>

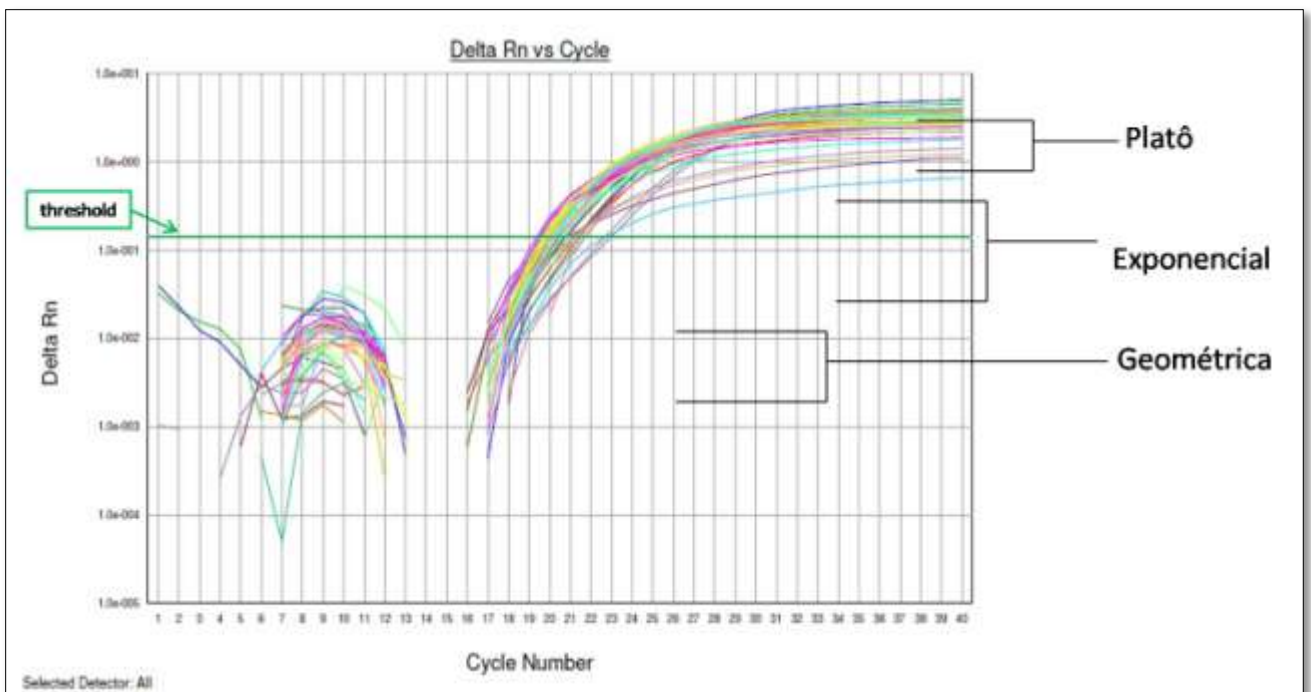
Neste trabalho, foi utilizado o composto fluorescente *SYBR Green*, um fluoróforo em suspensão, intercalante de DNA dupla fita (Figura 11), que emite uma fluorescência verde com a excitação da luz capturada pelo sistema ótico do termociclador. Quando o fluoróforo não está ligado ao DNA, este exibe uma fluorescência muito pequena, porém esta aumenta significativamente ao se ligar à fita dupla de DNA.



**Figura 11** – Esquema de como a fluorescência de SYBR pode ser utilizada em PCR-Tempo Real. As esferas verdes representam o SYBR, em rosa representa-se a Taq-DNA-polimerase durante o ciclo da PCR.  
Fonte: <http://www.ornat.co.il/upload/Image/SYB.JPG>.

#### 4.2.5.1 REAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

Durante a reação de PCR, o sinal fluorescente ( $R_n$ ) aumenta na mesma proporção da quantidade de produto amplificado, o que a torna representante da quantidade de material existente na reação. Com a finalização dos ciclos da PCR (40 ciclos), existe a presença de uma curva de amplificação de um produto de PCR em tempo real, a qual é formada por três fases distintas que caracterizam a progressão (Figura 12).



**Figura 12** - Gráfico  $\Delta R_n$  (variação no sinal fluorescente) x número de ciclos mostrando uma curva de amplificação obtida em uma reação de PCR em tempo real com suas 3 fases características.



Inicialmente foi determinada a concentração de cada amostra de DNA, utilizando-se espectrofotometria a 260 nm, obtida através do cálculo:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = (\text{OD}_{260}) \times (\text{fator de diluição}) \times (50\mu\text{g DNA/mL}) / 1 \text{ unidade OD}_{260}$$

Após obtenção de cada concentração, foi realizada a diluição de cada uma das amostras para uma concentração final de 100ng/ $\mu\text{L}$ .

Para a realização da PCR, foi utilizado o equipamento 7300 Real-Time PCR System e placas contendo 96 poços (MicroAmp®Optical 96-WellReaction Plate), ambos da Applied Biosystems. Cada placa foi montada para uma determinada região de interesse, sendo que todas continham uma curva de diluição com 4 pontos em triplicata.

Todas as reações foram feitas com um volume final de 12,5  $\mu\text{L}$ /poço: 6,25  $\mu\text{L}$  de Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu\text{L}$  de amostra (ou água ultrapura, no caso dos controles negativos), 0,7 $\mu\text{L}$  de cada *primer* e o restante de água ultrapura. Os *primers* usados foram os mesmos que os da reação de análise de microssatélites (Tabela 3), sendo utilizado o gene Fator V de coagulação humana como controle endógeno ou calibrador (Tabela 5).

**Tabela 5** – Sequência dos pares de *primers* utilizados para amplificação da região do gene Fator V de coagulação

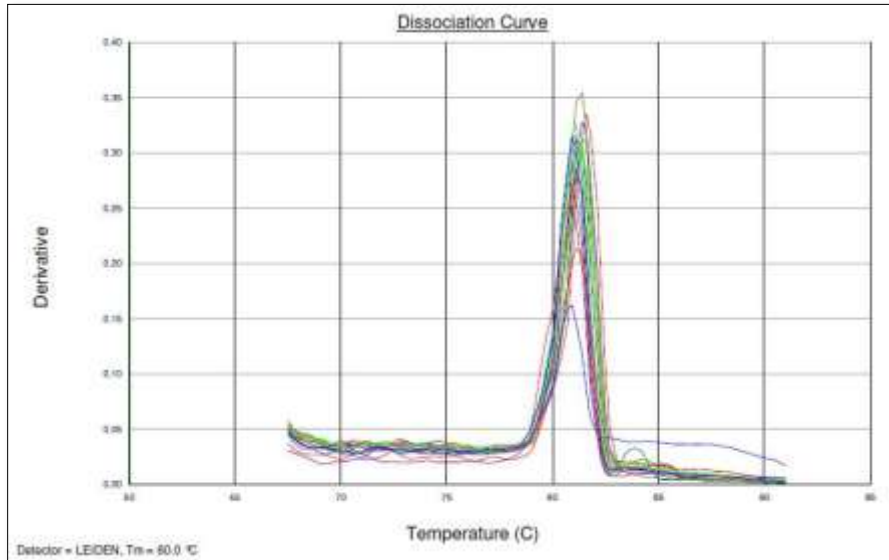
Gene	Sequência de pares de <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho pb	Temp. °C
Leiden/ éxon 10	S - CTTGAAGGAAATGCCCCATTA A - TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA	220	55

As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a ( $T_{\text{anelamento}}$ )°C por 30 segundos e extensão a 72°C, por 1 minuto, um novo ciclo foi acrescentado a 72°C, por 5 minutos, seguido de fase de dissociação com desnaturação por 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C.

A amplificação dos segmentos realizada pela PCR em tempo real foi analisada por meio da quantificação relativa, a qual determina o número de cópias de um gene alvo em relação a um controle interno. Os cálculos baseiam-se, indiretamente, na comparação dos CTs (Cycle threshold), que correspondem aos ciclos de PCR nos quais o sinal de amplificação exponencial alcança intensidade fluorescente superior ao limiar de detecção (ponto inicial).

#### **4.2.5.2 CURVA DE DISSOCIAÇÃO**

A fluorescência foi medida ao final de cada fase de extensão. Uma fase de dissociação foi realizada, originando uma curva de dissociação (Figura 13). Esta curva contém informações que possibilitam verificar a pureza do produto formado e confirmar a ausência de dímeros de iniciadores ou outros produtos inespecíficos.

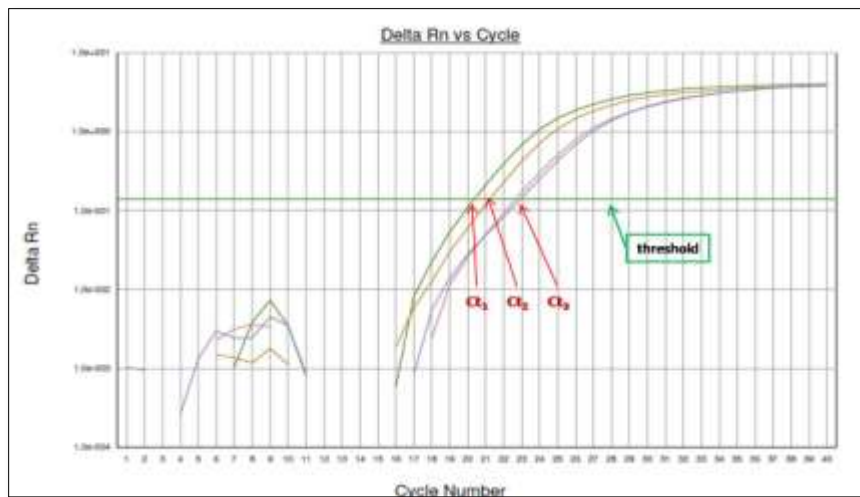


**Figura 13-** Curva de dissociação obtida para o gene do fator V de coagulação (Leiden). A curva de dissociação mostra um único pico mostrando a pureza do produto;  $T_m$  de aproximadamente 60°C.

#### 4.2.5.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO

A amplificação das regiões de interesse realizadas pela PCR em tempo real foi analisada por meio da quantificação relativa, a qual determina o número de cópias da região alvo (microsatélite ou éxon) em relação a um controle interno (Fator V, Leiden), comparado a um controle negativo. Os cálculos baseiam-se, indiretamente, na comparação dos CTs (Ciclo limiar), que correspondem aos ciclos de PCR nos quais o sinal de amplificação exponencial alcança intensidade fluorescente superior ao limiar de detecção, conforme mostra a Figura 14.

À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar a quantidade de produto da PCR existente em cada reação, através das diferenças de  $T_m$  (temperatura de fusão) entre cada um dos produtos de PCR amplificados. Quanto maior for a quantidade inicial de DNA genômico, mais cedo o produto acumulado é detectado na PCR e menor será o valor do CT.

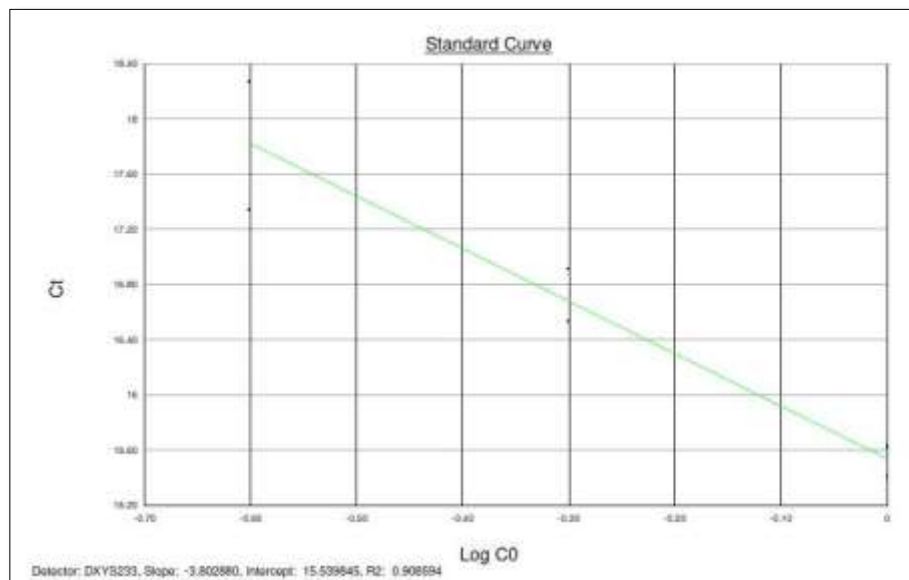


**Figura 14** - Exemplos de curvas de amplificação obtidas na PCR em tempo real. CTs (ciclo limiar) = nº de ciclos necessários para atingir determinado nível de fluorescência (*threshold/linha limite*). O gráfico mostra que a quantidade de material existente na reação correspondente ao  $Ct_1$  é maior que a quantidade de material existente na reações correspondentes aos demais Cts.

Embora o trabalho tenha aplicado o método de análise relativa dos dados, utilizou-se a Curva Padrão para controle da eficiência da reação. A Curva Padrão se baseia na comparação de dados obtidos em uma diluição padrão com os das amostras desconhecidas<sup>(79-81)</sup>. Foi construída uma Curva Padrão para cada região no genoma analisada.

Para síntese da curva, fez-se uma diluição seriada das amostras, estando inicialmente todas estas na concentração de 100ng/μL. Cada uma das diluições seriadas foi realizada em triplicada com as concentrações de 100ng/μL, 10ng/μL, 1ng/μL e 0,1ng/μL. Os CTs das amostras em teste foram determinados pelo *Software 7300 System SDS*, que acompanha o equipamento da Applied Biosystems

Para cada curva padrão, o *software* procura o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o  $R^2$ , o *slope* (inclinação da curva) e o *y intercept*<sup>(82)</sup> (Figura 15). O  $R^2$  mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de CT das amostras padrão (um valor de 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). A inclinação indica a eficiência de amplificação para o ensaio (um valor de -3,32 representa uma eficiência de 100%), e o y-interseção indica o valor esperado de CT para uma amostra com quantidade 1. Utilizando-se a inclinação, pôde-se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula:  $E = 10 (-1/\text{inclinação}) - 1$ .



**Figura 15** – O gráfico de regressão mostra a curva de diluição gerada pelo programa em uma das corridas realizadas.

#### 4.2.5.4 ANÁLISE DE DELEÇÃO POR qPCR

##### 4.2.5.4.1 MÉTODO $2^{-\Delta\Delta Ct}$

O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  é frequentemente utilizado para quantificação relativa, pois possibilita o cálculo da dosagem sem a necessidade de realização de curva padrão, o que se torna possível a partir do momento que o método assumir que as eficiências das reações são iguais. Para que seja realizada a quantificação relativa utilizando  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , é necessário um controle endógeno. Neste trabalho, estudou-se a derivação do método LIVAK & SCMITTGEN<sup>(83)</sup> para posterior aplicação em análises de deleção.

A derivação do método parte da equação:

$$X_n = X_0 \times (1 + EX)^n,$$

onde  $X_n$  é o número de moléculas alvo no ciclo  $n$ ,  $X_0$  é o número de moléculas alvo inicial e  $EX$  é a eficiência de amplificação da molécula alvo. O valor de  $n$  é dado pelo ciclo de amplificação ( $Ct$ ), indicando qual ciclo da reação que está sendo estudado. Deste modo,

$$X_T = X_0 \times (1 + EX)^{C_{T,X}} = K_X$$

$X_T$  é o número de moléculas alvo no limite (número) do ciclo de amplificação e  $K_X$  é a constante. O mesmo raciocínio é aplicado para o controle interno:

$$R_T = R_0 \times (1 + ER)^{C_{T,X}} = K_R.$$

Quando dividimos  $X_T$  (valor alvo) por  $R_T$  (valor endógeno), teremos a constante  $K$ .

$$= \frac{X_T X_0 \times (1 + EX)^{C_{T,X}} K_X}{R_T R_0 \times (1 + ER)^{C_{T,X}} K_R} = K$$

Os valores exatos de  $X_T$  e  $R_T$  dependem de vários fatores, como: sequência do *primer*, fluoróforo utilizado e pureza da reação. Logo, as constantes  $K$  ( $K_X$  e  $K_R$ ) não têm que ser iguais. Se assumirmos que as eficiências das reações são iguais, teremos:  $E_X = E_R = E$ ,

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1+E)^{C_{t,x} - C_{t,r}} = K, \text{ logo}$$

$$X_N \times (1+E)^{\Delta_{CT}} = K,$$

Reorganizando a expressão temos:

$$X_N = K \times (1+E)^{-\Delta_{CT}}$$

Como último passo, divide-se o  $X_N$  de cada alvo (a) pelo  $X_N$  do calibrador (cb):

$$= \frac{X_{N,a}}{X_{N,cb}} \times K \times (1+E)^{-\Delta_{CT,a}} = (1+E)^{-\Delta_{CT}}$$



$$\frac{X_{N,cb}}{K \times (1 + E)^{-\Delta Ct,cb}}$$

A quantia-objetivo, normalizada para uma referência endógena e relativa para um calibrador, é dada por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

#### 4.2.5.4.2 MÉTODO $\Delta K Ct$

Este método utilizado para o cálculo, adaptado por WEKSBURG *et al.*<sup>(84)</sup> baseado em MOODY *et al.*<sup>(85)</sup>, considera a correção de alguns fatores de efeitos adversos afetando a eficiência da reação através da normalização os valores de Ct, uma vez que reações com exatos 100% de eficiência nem sempre são conseguidas.

Inicialmente, normaliza-se o gene de referência de cada paciente da corrida de Real-time, utilizando-se para isto a média do gene de referência de todas as amostras.

$$\left[ \frac{\sum_{i=1}^N C_{IRi}}{N} \right] - C_{IRi} = \Delta Ct_R - Ct_{Ri}$$

↑  
Média do endógeno de todos os pacientes

↑  
Média do endógeno do paciente

Em seguida, divide-se  $AC_{tR} - Ct_{Ri}$  pelo valor da inclinação da reação do gene de referência, para que o valor específico de  $C_t$  do gene de referência do indivíduo seja ajustado.

$$\frac{(AC_{tR} - Ct_{Ri})}{(\text{valor da inclinação}_{\text{gene referência}})}$$

Para que haja a normalização do gene alvo do indivíduo em concordância com o gene de referência e os genes alvos dos indivíduos restantes, considera-se a Inclinação da reação do gene alvo.

$$\frac{(AC_{tR} - Ct_{Ri})}{(\text{Inclinação}_{\text{gene referência}})} \times (\text{Inclinação}_{\text{gene alvo}})$$

Seguidamente soma-se a este o  $C_t$  do gene alvo do indivíduo e, assim, este estará ajustado conforme os parâmetros da reação. Este novo  $C_t$  é denominado de  $KC_t$ .

$$KC_t = \frac{(AC_{tR} - Ct_{Ri})}{(\text{Inclinação}_{\text{gene referência}})} \times (\text{Inclinação}_{\text{gene alvo}}) + Ct_{\text{gene alvo indivíduo}}$$

Finalmente se compara o resultado do paciente com o controle normal conhecido, ambos normalizados.

$$\Delta KC_t = KC_{t_{\text{controle}}} - KC_{t_{\text{afetado}}}$$

$$KC_{t_{\text{controle}}} = Ct_{\text{do controle corrigido}}$$

$$KC_{t_{\text{afetado}}} = Ct_{\text{do afetado corrigido}}$$

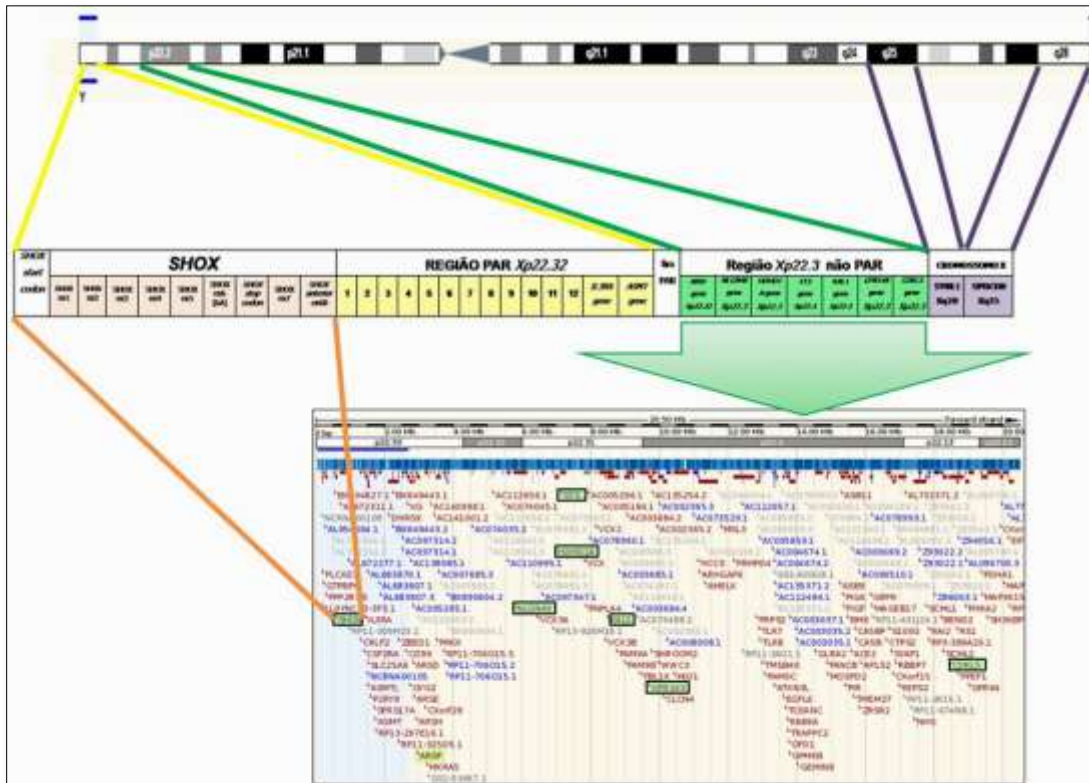
O  $\Delta KC_t$  representa o número de cópias, perda ou ganho, da região estudada em relação ao controle que se tomou como referência. Em conclusão, o valor de  $\Delta KC_t$  igual a 0 ( $\pm 0,35$ ) indica uma taxa igual à referência. A perda de um alelo tem como resultado um  $\Delta KC_t$  com valor igual a -1 ( $\pm 0,35$ ), indicando uma microdeleção, com relação ao controle que tomamos como referência. Consequentemente, um resultado de  $\Delta KC_t$  igual a +1 ( $\pm 0,35$ ) indica um ganho consistente com uma microduplicação.

#### **4.2.6 MLPA (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION)**

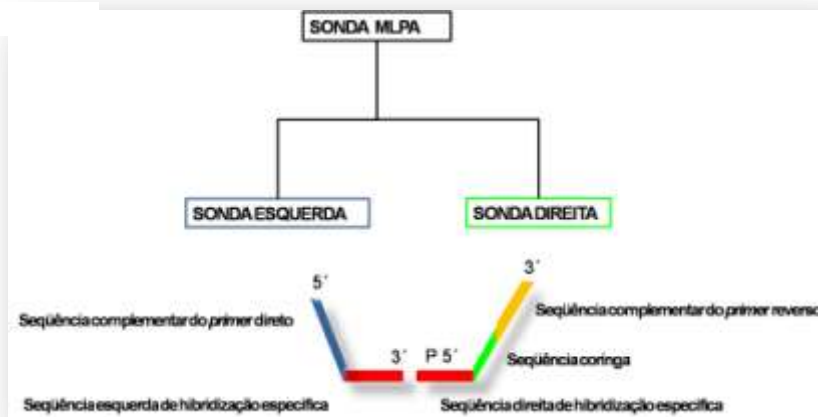
A análise de MLPA foi realizada para detecção de possíveis deleções tanto no gene SHOX como na região “downstream” a este. Trata-se de uma técnica atual que possibilita análise abrangente de várias regiões simultaneamente. Todos os pacientes analisados por microssatélites foram posteriormente analisados utilizando-se a técnica de MLPA.

O kit utilizado para a realização do experimento foi o SALSA MLPA kit P018-D1 SHOX, composto por 44 sondas que geraram fragmentos de 136 pb a 445 pb. Estas sondas são divididas em 26 sondas na região PAR1, incluindo exons do gene SHOX, 8 sondas no cromossomo X localizadas fora da região

PAR1 (genes ARSF, NLGN4X, HDHD1A, STS, KAL1, GPR143, CDKL5, PDCD8 E SYBL1) (Figura 16) e 10 sondas de referência (regiões 5q31, 16p13, 11q13, 13q14, 13q34, 18q21, 3p21, 16p13, 1p33 e 5q31) (<http://www.mrc-holland.com>).



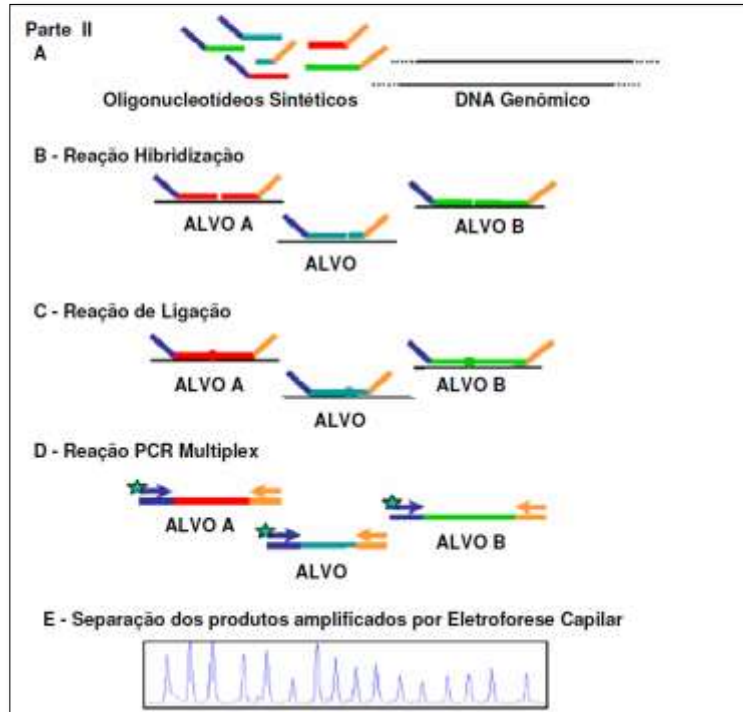
**Figura 16** – Esquema localizando as sondas do kit P018-D1 SHOX que anelam ao cromossomo X. Acima a representação do cromossomo X e suas regiões, abaixo a localização das sondas localizadas fora da região PAR1.



**Figura 17** – Representação esquemática das sondas de MLPA. Para cada região a ser analisada são desenhadas duas sondas: à esquerda e a direita que se anelam de maneira adjacente. Cada sonda tem a região que é reconhecida por *primers* universais. A sonda direita tem uma seqüência denominada coringa que varia de tamanho diferenciando os pares de sonda e permitindo a visualização dos fragmentos por eletroforese capilar.

#### 4.2.6.1 Desnaturação do DNA genômico e hibridização com sondas SALSA MLPA

Para a realização da desnaturação o DNA genômico foi diluído com TE 1X para atingir a concentração final de 400 ng em 5µL. Estas diluições foram aquecidas a 98°C e resfriadas a 25°C, em seguida foi adicionada a mistura de SALSA *probe mix* e tampão em cada um dos tubos. Após homogeneização foram incubadas a 95°C por 1 min e 16 horas a 60°C no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Figura 18 itens a e b).



**Figura 18** - A) Oligonucleotídeos sintéticos que compõem o kit P018-D1 SHOX e DNA genômico; B) Hibridização adjacente dos pares de sondas de MLPA nas seqüências alvo; C) Reação de Ligação onde ocorre a união das sondas adjacentes com a enzima ligase; D) Reação de PCR Multiplex: amplificação com *primers* universais gerando 44 fragmentos de tamanhos diferentes, onde somente o *primer* direto é marcado com o corante FAM; E) Separação por eletroforese Capilar dos fragmentos únicos amplificados. Adaptado de BARBARO, M.<sup>(86)</sup>

#### 4.2.6.2 Reação de Ligação

A temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C, quando foram acrescentados a cada amostra 32 µL de *Mix Ligase*, com posterior ressuspensão. O *Mix Ligase* foi preparado misturando 3 µL de Ligase *tampão* A, 3 µL Ligase-65 *tampão* B, 25 µL de H<sub>2</sub>O e 1 µL Ligase-65. Em seguida, as amostras

permaneceram incubadas a uma temperatura de 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos.

#### **4.2.6.3 Reação da PCR Multiplex**

Em novos tubos foram colocados 10 µL da reação de ligação de MLPA, 4 µL 10X SALSA PCR *tampão*, 26 µL de H<sub>2</sub>O, que foram mantidos em termociclador a 60°C. Em seguida, 10 µL de *Mix Polymerase* foram acrescentados a cada tubo, para assim inicializar a reação de PCR, segundo o protocolo de 30 segundos a 95°C; 30 segundos 60°C; 60 segundos 72°C, por 35 ciclos. Por fim, as amostras foram incubadas a 72°C, durante 20 minutos.

Para o *Mix Polymerase* foram necessários 2 µL de SALSA PCR-*primers*, 2 µL SALSA *Enzyme Dilution tampão*, 5,5 µL de H<sub>2</sub>O e 0,5 µL de SALSA *Polymerase*.

#### **4.2.6.4 Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar**

Os produtos de PCR foram identificados utilizando-se o equipamento *ABI PRISM 310 DNA Analyser* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos), com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo desenvolvido por *MRC Holland b. v2; 1-6-2007: Salsa 6-FAM PCR primer-dNTP mix*.

Posteriormente à reação de PCR foram misturados às amostras 0,75 µL da reação de PCR, 0,75 µL de água, 0,5 µL de 500 ROX, 13,5 µL Formamida Hi-Di, em seguida, desnaturados a 94 °C por 2 minutos e resfriados em gelo. A leitura foi realizada no equipamento de eletroforese capilar *ABI-Prism 310 Genetic Analyzer* (1 capilar) com as seguintes configurações:

- Padrão Interno: conjunto de filtros D - 500ROX\* (ABI nr. 401734)
- Comprimento do capilar: 47 cm (ABI nr. 402839);
- Polímero: POP-4
- Tempo de corrida: 30 min;
- Voltagem de corrida: 15 kV;
- Temperatura de corrida: 60 °C;
- Volume de preenchimento do capilar: 184 vezes;
- Voltagem de pré-corrida: 15 kV;
- Tempo de pré-corrida: 180 s;
- Voltagem de injeção: 3.0 kV;



- Tempo de injeção: 10-30 s;
- Tempo de espera: 1 s.

Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados utilizando o *Software GeneScan* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos).

#### **4.2.6.5 Análise dos dados obtidos por MLPA**

Foi utilizado o *software Coffalyser MLPA DAT e MegaBACE Fragment Profiler Version 1.2*, desenvolvidos e recomendados pelo fabricante especialmente para a análise de várias amostras. Estes softwares são baseados no programa Excel que podem ser usados com a versão 2003+ ou superior do *Microsoft Office version 2003+*. Em todos os passos para a normalização dos dados estão incluídas correções para efeitos característicos da maioria das misturas de sondas que é o decréscimo na altura/área do pico dependente da sonda. Este software é constantemente aprimorado e pode ser obtido gratuitamente no sitio WEB da empresa.

Tecnicamente, os dados foram normalizados dividindo-se a área do pico de cada sonda pela soma dos picos de todas as sondas na amostra. A seguir, esse valor normalizado foi dividido pela área do pico da sonda correspondente, obtida a partir do DNA controle. Quando houve presença de deleções e duplicações em

heterozigose, os valores foram, respectivamente, de 0,5 e 1,5, se comparados com o valor normal de 1,0.

## *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por análise de microssatélite, hibridização e sequenciamento são apresentados a seguir, com o heredograma de cada família estudada.

### 5.1 PESQUISA DE MICRODELEÇÕES POR MEIO DA ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES

A região de repetições CA, denominada de *CA-repeat*, está localizada dentro da região 5' não transcrita do gene *SHOX* e se constitui em um microssatélite intragênico polimórfico com um grau de heterozigosidade de cerca de 92% independente do grupo de indivíduos analisados<sup>(27,87)</sup>. Como está dentro da seqüência gênica e seus alelos variam entre 136 e 156 pb, este microssatélite é sempre o primeiro a ser investigado em análises de perda de heterozigosidade. O microssatélite DXYS233, geralmente o segundo a ser estudado, está a 800 pb “downstream” do gene *SHOX*<sup>(27)</sup> e seus alelos variam de 271 a 291 pb.

Com o passar dos anos, com as indicações sobre a existência de regiões controladoras localizadas dentro e em torno do gene, novos

microssatélites foram propostos, entre eles os utilizados neste estudo: (a) DXYS10092 (localizado entre o microssatélite *CA-repeat* e o início do gene), que apresenta heterozigosidade de 96%, possuindo 18 alelos que variam de 317 a 369 pb; (b) a região DXYS10093, que se localiza entre os éxons 6a e 6b, possui 14 alelos que variam de 233 a 259 pb e heterozigosidade em torno de 69%; (c) a região DXYS10091, cerca de 650 kb “downstream” ao gene, sua heterozigosidade está em torno de 60% e seus alelos vão de 202 pb a 222 pb; e (d) a região DXYS10083, cerca de 660 kb “downstream” ao gene, com heterozigosidade de 82% e alelos variando de 150 e 172 pb<sup>(26)</sup>.

Em nosso estudo, utilizamos os *primers* descritos por SHEARS *et al.*<sup>(14)</sup>, CORMIER-DAIRE *et al.*<sup>(75)</sup>, BINDER *et al.*<sup>(18)</sup> e BENITO-SANZ *et al.*<sup>(26)</sup> para a amplificação das regiões variáveis *CA-repeat*, DXYS10092, DXYS10093, DXYS10091, DXYS10083 e DXYS100233.

Neste trabalho, os fragmentos de microssatélites produzidos durante a PCR foram inicialmente separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em seguida submetidos à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 7% com coloração em prata. Devido à existência de alguns resultados insatisfatórios, como método alternativo, realizou-se, então, a PCR utilizando  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP para marcação radioativa dos fragmentos, que foram posteriormente separados em géis de poliacrilamida 7%; secados, expostos em filmes de raios-X por períodos variáveis e, posteriormente, revelados.

### 5.1.1 Resultados

Dos onze pacientes com características clínicas compatíveis com DLW ou DML, dois apresentaram deleção de um dos alelos – envolvendo o próprio gene *SHOX* (caso 3 e 9) ou regiões “downstream” a este, sinalizado na Tabela 6 como hemizigose (HEMI) do respectivo microssatélite. O paciente com DML (caso 8) apresentou deleção de ambos os alelos (NULO). Cinco pacientes apresentaram apenas uma marca de alelo em algum microssatélite (casos 1, 4, 5, 6 e 7), revelando uma probabilidade de hemizigose, embora não se possa descartar a hipótese de homozigose (assinalada na Tabela 6 como HOM/HEMI) porque, nesses três casos, não houve condição de pesquisar ambos os genitores, tornando o estudo não informativo. Com relação a paciente 2 estas análises foram não informativas.

Outros dois pacientes apresentaram possíveis hemizigoses da região DXYS10091 (casos 10 e 11), também indicado como HOM/HEMI na Tabela 6.

**Tabela 6** - Resultados da análise dos polimorfismos das regiões *CA-repeat*, DXYS10092, DXYS10093, DXYS10091, DXYS10083 e DXYS233 obtidos em pacientes com mesomelia e (ou) deformidade de Madelung associada ou não à baixa estatura.

<b>P</b>	<b>CA repeat</b>	<b>DXYS10092</b>	<b>DXYS10093</b>	<b>DXYS10091</b>	<b>DXYS10083</b>	<b>DXYS233</b>
<b>1</b>	HET	HET	HOM/HEMI	HOM/HEMI	HOM/HEMI	HET
<b>2</b>	HET	Nd	Nd	Nd	Nd	HET
<b>3</b>	HEMI	HEMI	HEMI	NI	HEMI	HET
<b>4</b>	HOM/HEMI	HET	HET	HOM/HEMI	nd	HOM/HEMI
<b>5</b>	HET	HOM/HEM	HOM/HEM	HOM/HEMI	HET	HET
<b>6</b>	HET	HET	Nd	HOM/HEMI	HET	HET
<b>7</b>	HOM/HEMI	HOM/HEMI	HOM/HEMI	HOM/HEMI	HOM/HEMI	HOM
<b>8</b>	nulo	nulo	nulo	HOM	HET	HET
<b>9</b>	HET	HEMI	HEMI	NI	HEMI	HET
<b>10</b>	HET	HET	HET	HOM/HEMI	HET	HET
<b>11</b>	HET	HET	HET	HOM/HEMI	HET	HET

NI = não informativa

Nd = não determinado

## 5.1.2 Discussão dos casos

### 5.1.2.1 Nulizigose

A paciente 8 foi inicialmente diagnosticada como portadora de DLW e posteriormente confirmada como portadora de DML, com presença de geno valgo, mesomelia acentuada e displasia óssea. Apresentou, assim como no estudo realizado por BERTORELLI *et al.*<sup>(88)</sup>, deleção completa dos dois alelos do gene *SHOX*. Seus pais são primos em primeiro grau; seu pai tem baixa estatura e sua mãe, baixa estatura (escore z de -5,98) e deformidade de Madelung. Em ambos, há ausência de um dos alelos do gene *SHOX* (Figura 19). Essa deleção envolve duas regiões que antecedem o gene *SHOX* (*CA-repeat* e *DXYS10092*) e uma que se situa dentro do gene (*DXYS10093*).

A literatura aponta outros casos semelhantes (Tabela 7) com deleções e mutações em ambos os alelos do gene *SHOX*, alguns, inclusive, em heterozigose composta (BELIN *et al.*<sup>(13)</sup>; ROBERTSON *et al.*<sup>(88)</sup>; THOMAS *et al.*<sup>(65)</sup>; CAMPOS BARROS *et al.*<sup>(66)</sup>).



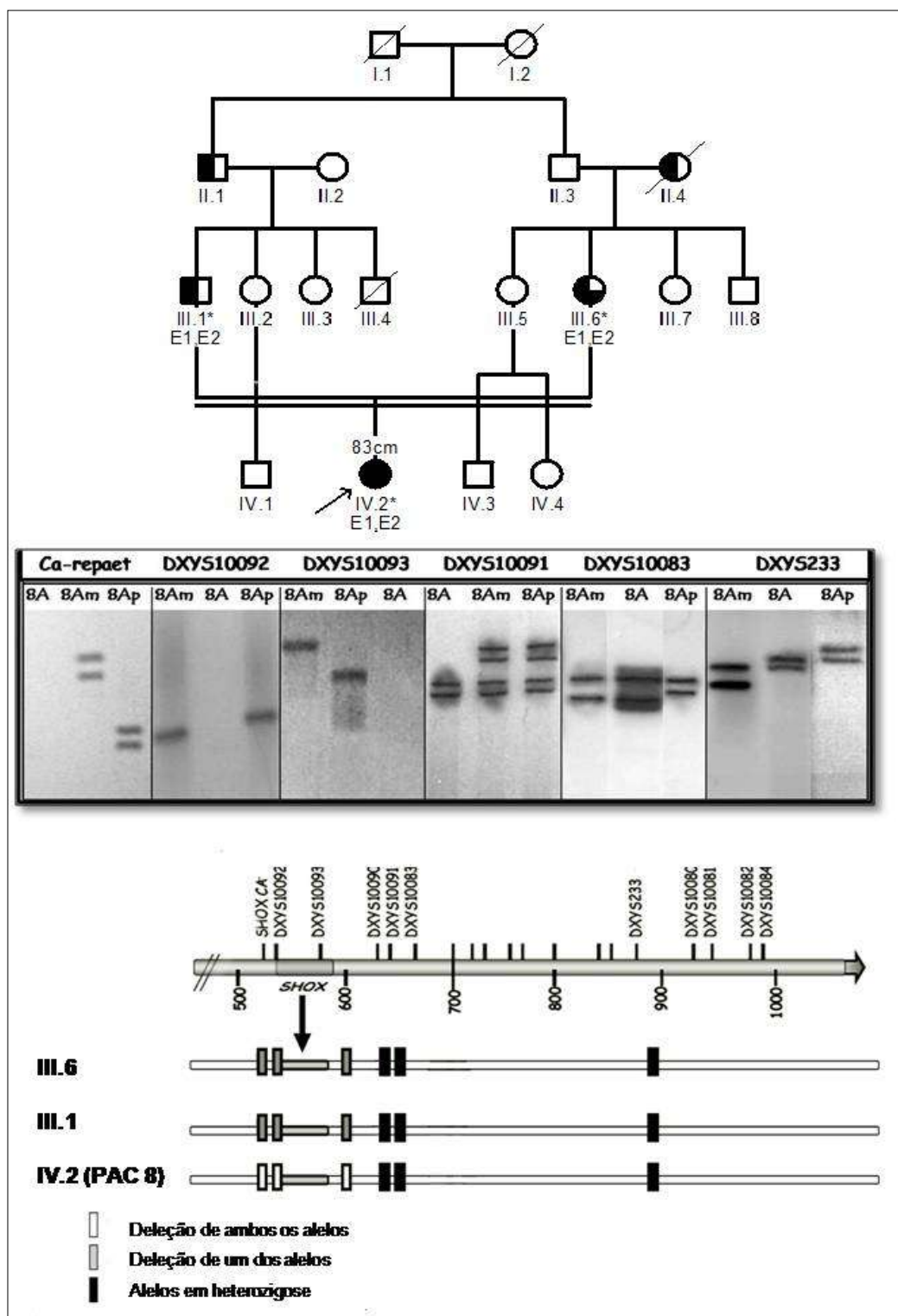


Figura 19- Heredograma da família 8 e gel correspondente aos resultados do indivíduo IV.2 (caso-índice) e seus pais. \* 8A<sub>m</sub>=mãe; 8A<sub>p</sub>=Pai.

**Tabela 7** – Comparação dos tipos de deleção entre o caso de DML descrito neste trabalho e casos encontrados na literatura

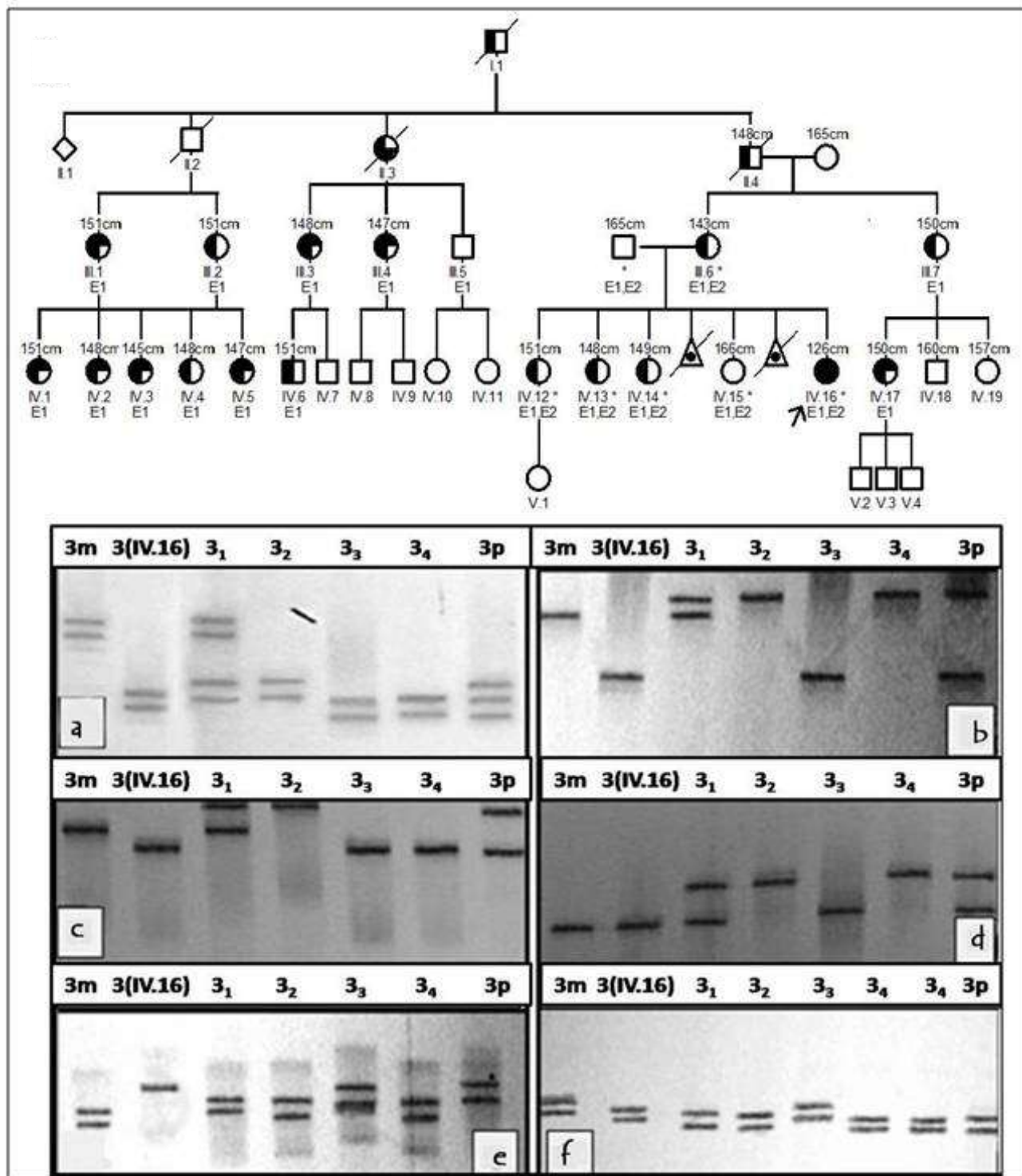
AUTORES	ALTERAÇÕES ENCONTRADAS	
	Alelo1	Alelo 2
<i>Presente trabalho</i>	<b>Deleção:</b> CA-repeat, DXYS10092 e DXYS10093	<b>Deleção</b> CA-repeat, DXYS10092, DXYS10093
Bertorelli et al., 2007 <sup>(88)</sup>	<b>Deleção</b> DXYS10092 e DXYS10093	<b>Deleção</b> DXYS10092 e DXYS10093
Campos-Barros et al., 2007 <sup>(66)</sup>	<b>Deleção</b> CA-repeat, DXYS10092, DXYS10093	<b>Deleção</b> PAR1 “downstream” do gene
Bieganski et al., 2005 <sup>(63)</sup>	<b>Deleção</b> CA-repeat, DXYS10092, DXYS10093	Presença dos alelos, provável mutação
Thomas et al., 2004 <sup>(65)</sup>	<b>Deleção</b> CA-repeat, DXYS201, DXYS290	<b>Deleção</b> CA-repeat, DXYS201, DXYS290, DXYS233, DXYS1053

### 5.1.2.2 Hemizigose

A deleção de um dos alelos do gene *SHOX* vem sendo objeto de vários estudos em pacientes com DLW e indivíduos com baixa estatura idiopática. SOBHERWAL *et al.*<sup>(90)</sup>, em pesquisa realizada com 122 pacientes, encontraram deleções do gene em 47 casos (38,5%). Resultados semelhantes foram apresentados por BENITO-SANZ *et al.*<sup>(62)</sup>, que, ao analisarem indivíduos de origem hispânica, mostraram que em 15% deles o gene *SHOX* estava ausente; além disso, 38% do total dos pacientes apresentaram deleções “downstream” do gene.

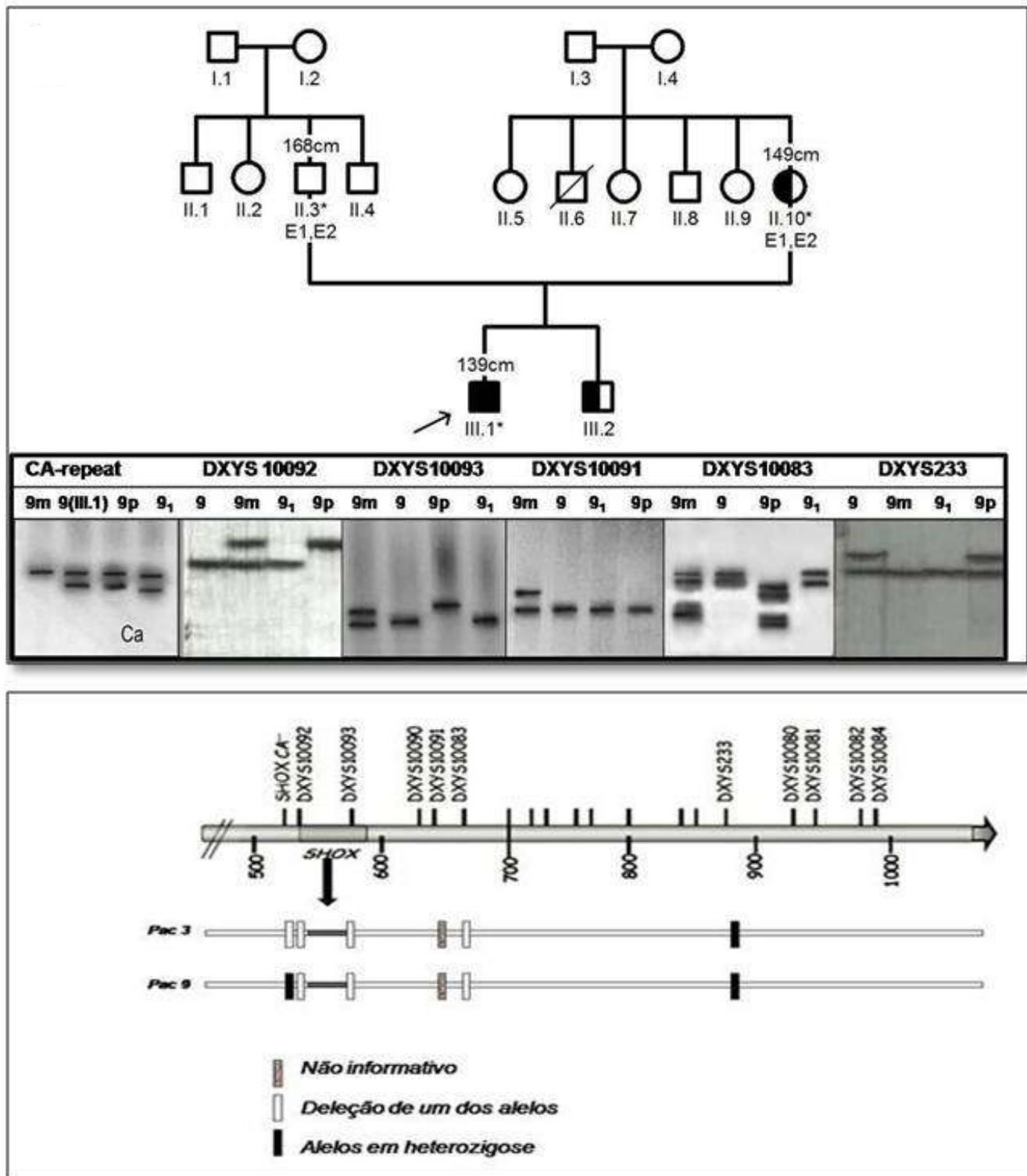
No presente estudo, nos pacientes 3 e 9 (15,4%), as análises confirmaram a ausência de um dos alelos do gene *SHOX* (Figura 20 e 21). Não foi possível ratificar em nenhum dos pacientes deleções apenas de regiões fora do gene, como descrito por SOBERWAL *et al.*<sup>(90)</sup>, BENITO-SANZ *et al.*<sup>(62,26)</sup> e SCHNEIDER *et al.*<sup>(38)</sup>. Embora esses autores tenham descrito a existência de regiões “downstream” do gene *SHOX* consideradas “pontos quentes” de deleção, motivo pelo qual essas regiões passaram a ser candidatas a apresentarem *enhancers* do gene, autores como ZINN *et al.* (2006)<sup>19</sup> demonstraram grande diversidade entre os pontos de deleção “downstream” do gene em pacientes com DLW, explicada pelas diferentes etnias dos indivíduos pesquisados.

O exame da família da paciente 3 (Figura 20) incluiu pai, mãe e quatro irmãs da propósita. A mãe da paciente apresentava baixa estatura associada à deformidade de Madelung e três das quatro irmãs manifestavam baixa estatura. A mãe relatava ainda que seu pai e seu avô paterno mostravam baixa estatura, havendo assim a possibilidade de que a deleção encontrada, incluindo as regiões *CA-repeat*, DXYS10092, DXYS10093 e DXYS10083, tenha se originado há várias gerações. A análise do gel mostrou alta permuta, com diferença entre os alelos paternos passados para as filhas (dados publicados – Anexo 2).



**Figura 20** - Heredograma da família3 e géis correspondentes aos resultados. Gel a) região Ca-repeat, b) DXYS10092, c) DXYS10093, d) DXYS10091, e) DXYS10083 e f) DXY233. \*3m=mãe, 3p=pai, 3<sub>1,2,3,4</sub>=irmãs da paciente.

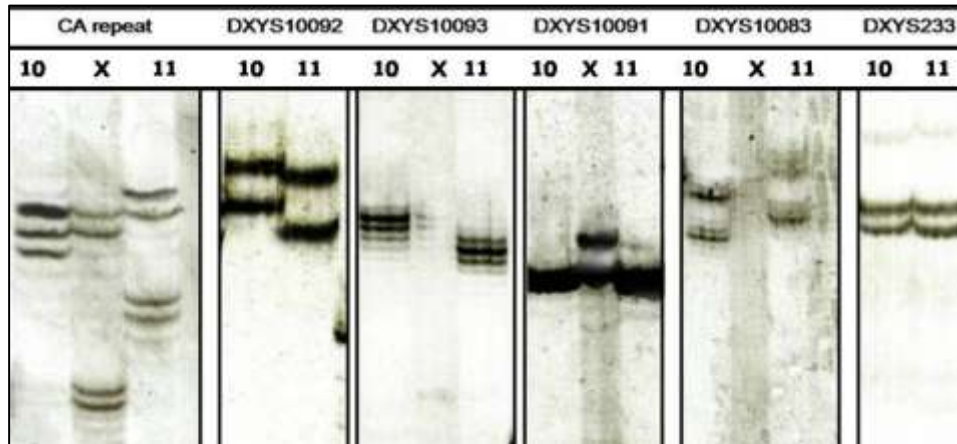
Na família 9, o paciente III.1 com diagnóstico clínico de DLW (escore z: -2,24), possui a mãe e irmão com diagnóstico clínico de baixa estatura. A análise molecular revelou hemizigose das regiões DXYS10092, DXYS10093 (dentro do gene) e DXYS10083, estando a região DXYS10091 provavelmente em hemizigose. No entanto, devido ao fato dos microssatélites materno e paterno serem semelhantes isto não pôde ser confirmado. O irmão (9<sub>1</sub>) mostrava deleção das regiões DXYS10092, DXYS10093 (dentro do gene) e DXYS10083 (região “downstream” do gene *SHOX*), observando-se situação semelhante em relação à região DXYS10091, a região DXYS233 não foi informativa (Figura 21).



**Figura 21** - Heredograma da família e géis correspondentes aos resultados família 9.

\* 9m=mãe; 9p=pai; 9<sub>1</sub>=irmão do paciente

Os pacientes 10 e 11 apresentaram-se heterozigotos para as regiões CA-repeat, DXYS10092, DXYS10093 e DXYS10083 (Figura 22). Não foi possível confirmar deleção (hemizigose) da região DXYS10091 nestes pacientes (Figura 22).



**Figura 22** – Esquema mostrando o resultado em gel de poliacrilamida dos pacientes 10 e 11.

### 5.1.2.3 Hemizigose não confirmada ou não detectada

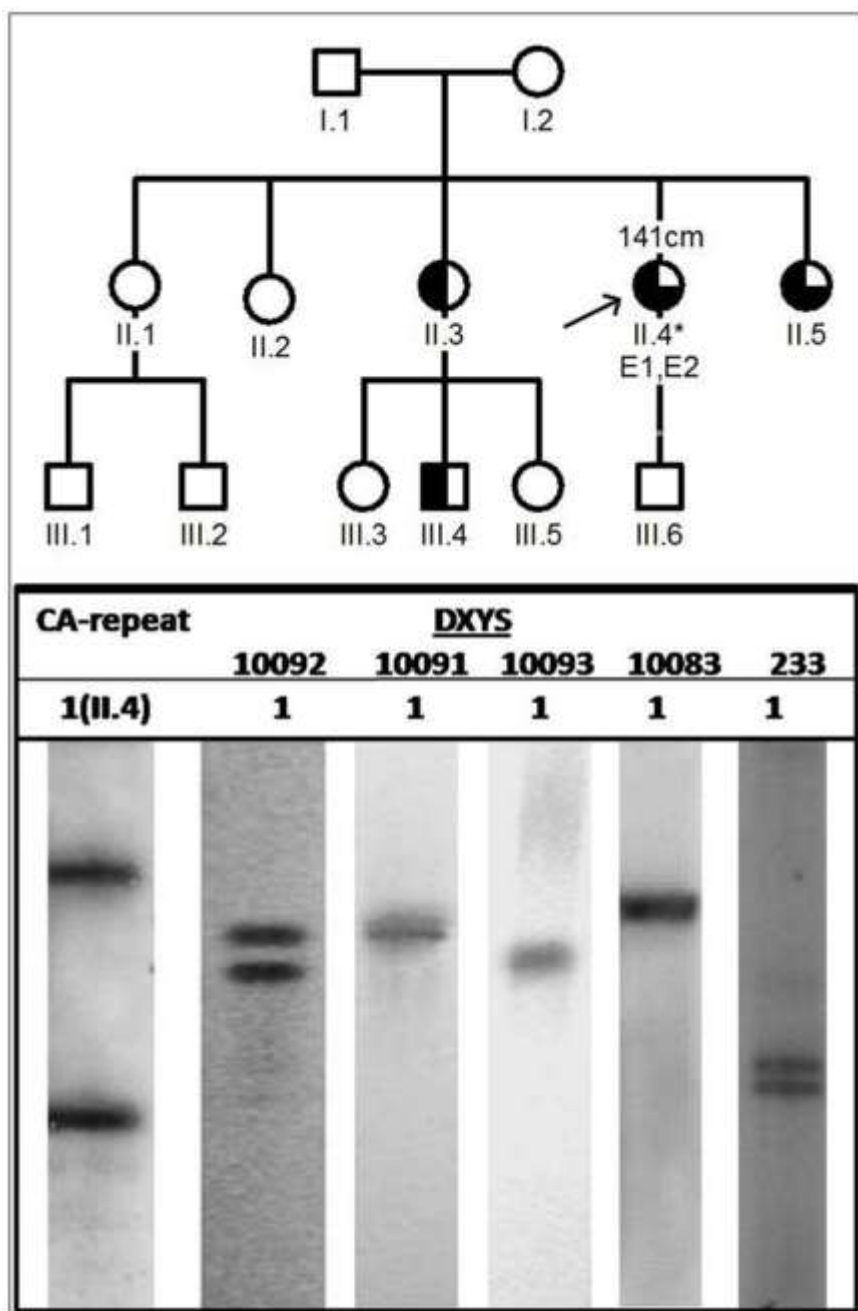
Em nosso estudo de microssatélite, não tiveram deleção de algumas das regiões detectada ou confirmada 8 pacientes (72,7%): 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11, merecendo destaque os pacientes 1, 5 e 7.

As análises moleculares da paciente 1 indicaram heterozigose dos microssatélites CA-repeat e DXYS10092, localizados na região 5`-UTR, bem

como do DXYS233 na região “downstream” do gene. No entanto, para os marcadores DXYS10093, localizado dentro da região 3`-UTR, e DXYS10091 e DXYS10083, “downstream” do gene, foi observado apenas um fragmento, sugerindo homo ou hemizigose. Como os genitores não foram analisados, não foi possível a confirmação da perda alélica neste caso.

Clinicamente a paciente apresentou baixa estatura e deformidade de Madelung (II.4), quadro este sugestivo de DLW. Seus pais tinham estatura dentro da normalidade, havendo uma irmã (II.3) com baixa estatura e outra irmã (II.5) com as mesmas características clínicas que a paciente (Figura 23).

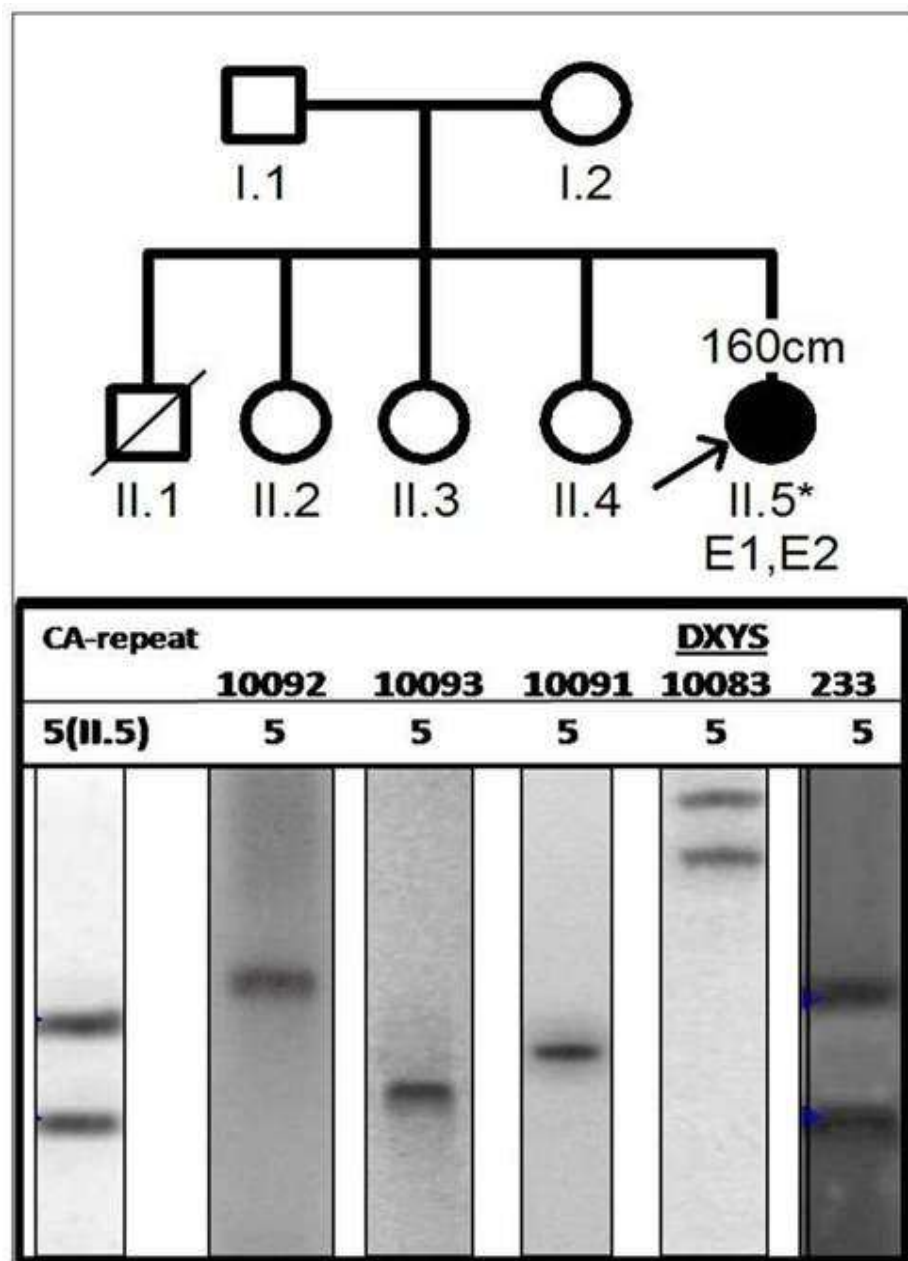




**Figura 23** - Heredograma da família 1 e análise em gel da paciente caso 1 (II.4)

A paciente 5 apresentou a região *Ca-repeat* em heterozigose, porém, nas regiões DXYS10092, DXYS10093 e DXYS10091, com perda de

heterozigossidade, o que pode indicar deleção integral do gene (Figura 24). A paciente foi a única na família a apresentar baixa estatura, deformidade de Madelung, cúbito valgo leve, palato alto e retrognatismo, sendo clinicamente diagnosticada como DLW.

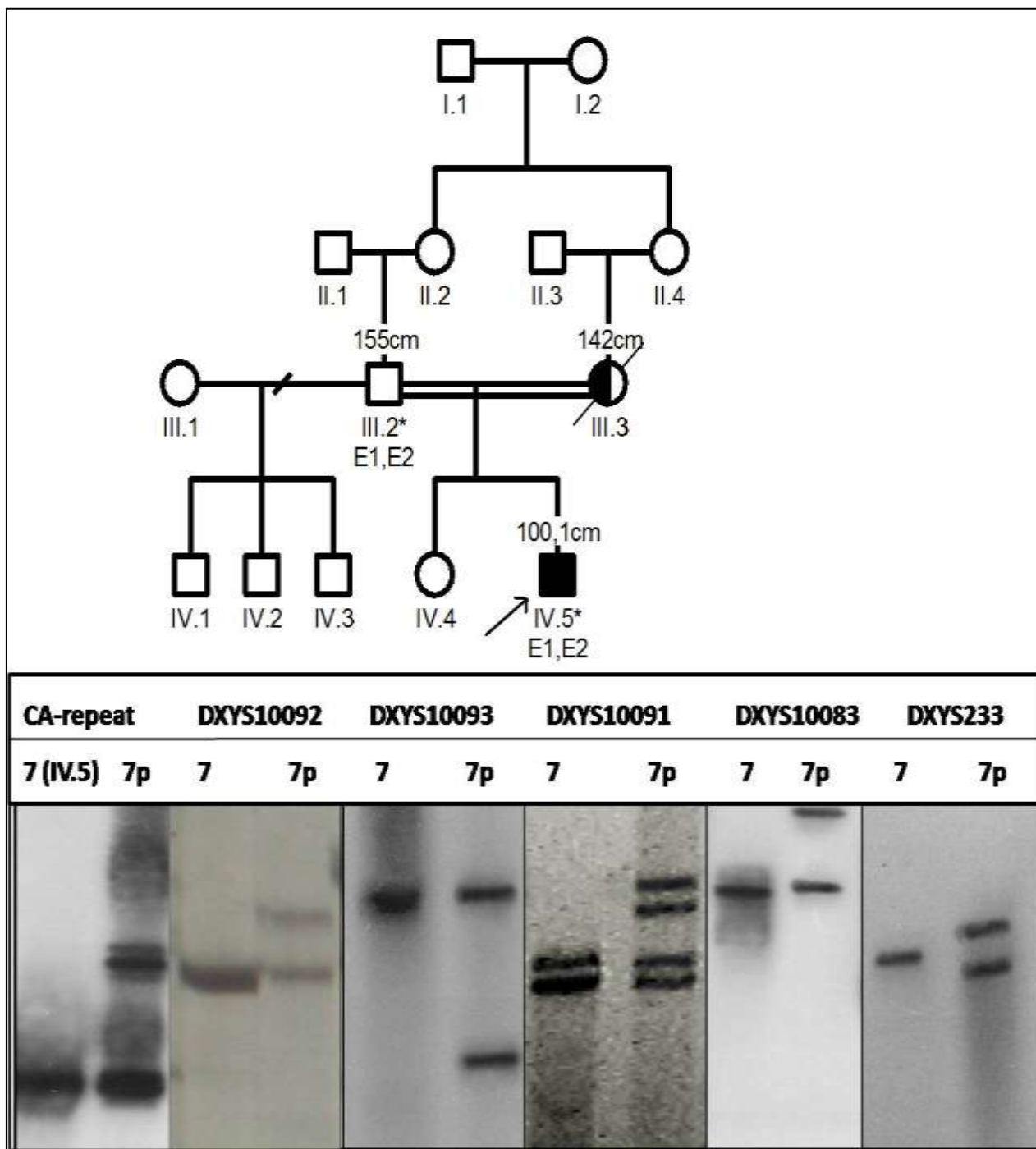


**Figura 24** – Heredograma e análise em gel de poliacrilamida da família da paciente 5.

O paciente 7 apresentou perda de heterozigosidade das regiões CA-repeat, DXYS10092, DXYS10093, DXYS10091, DXYS10083 e DXYS233. Filho de casal consanguíneo, esse paciente tinha baixa estatura (escore z -4,95), mesomelia e deformidade de Madelung, sendo clinicamente diagnosticado como portador de DLW. Embora com perda de heterozigosidade em várias regiões examinadas, a ausência de estudos moleculares sobre a mãe, já falecida, impossibilitou a confirmação de hemizigose (Figura 25). Este paciente foi analisado utilizando-se PCR em tempo real, sendo a região DXYS10091 quantificada como região com 2 alelos homozigotos.

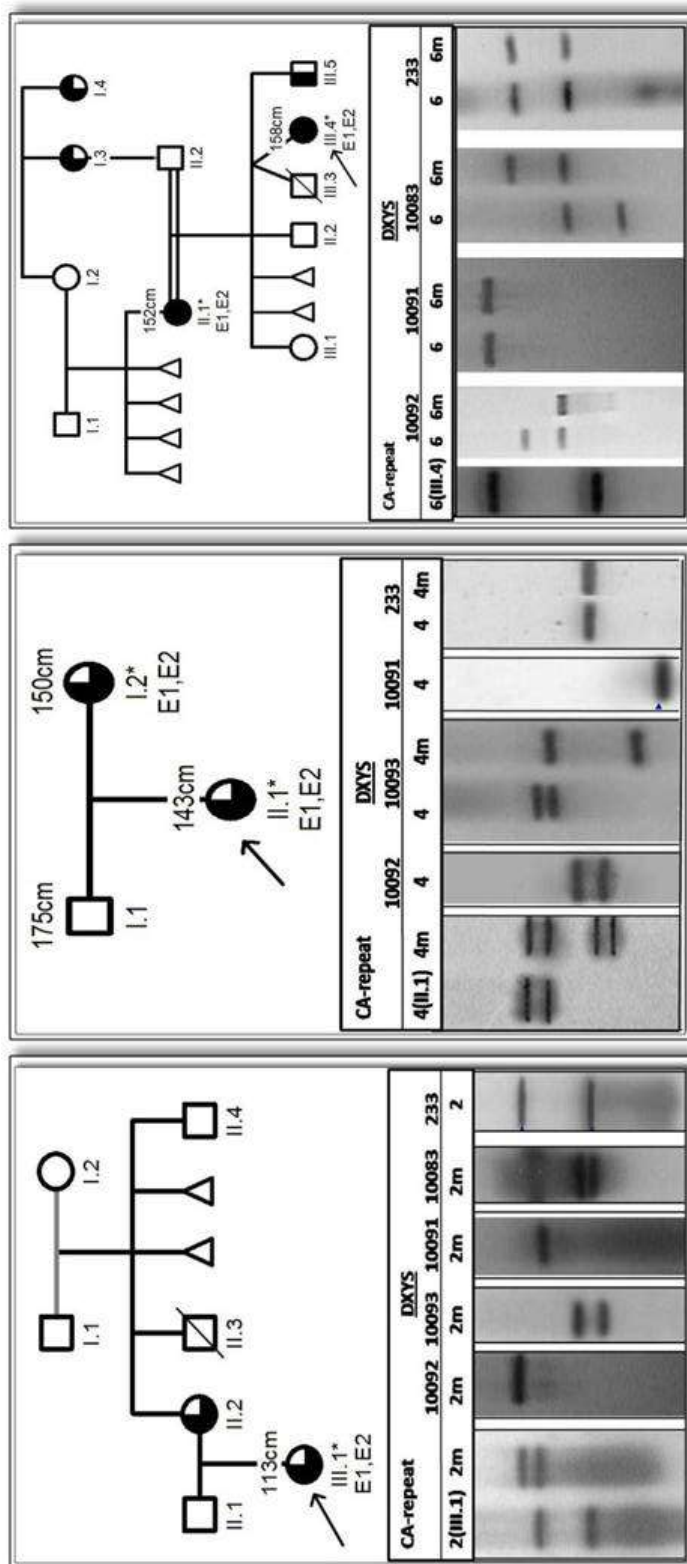
A probabilidade de homozigose de quatro das regiões em sequência (DXYS10092, DXYS10093, DXYS10091 e DXYS10083) é baixa ( $0,04 \times 0,31 \times 0,4 \times 0,18 \times 0,5 \times 0,5$  ou  $0,0002$ ), sugerindo que a deleção do gene *SHOX* possa ser a responsável pelo quadro clínico. Devido à consanguinidade entre os pais, o estudo de microssatélites não permite descartar, entretanto, que se trate

de uma genocópia da DLW de herança autossômica recessiva.



**Figura 25** – Heredograma e análise em gel de poliacrilamida da família do paciente 7.  
\*7p=pai.

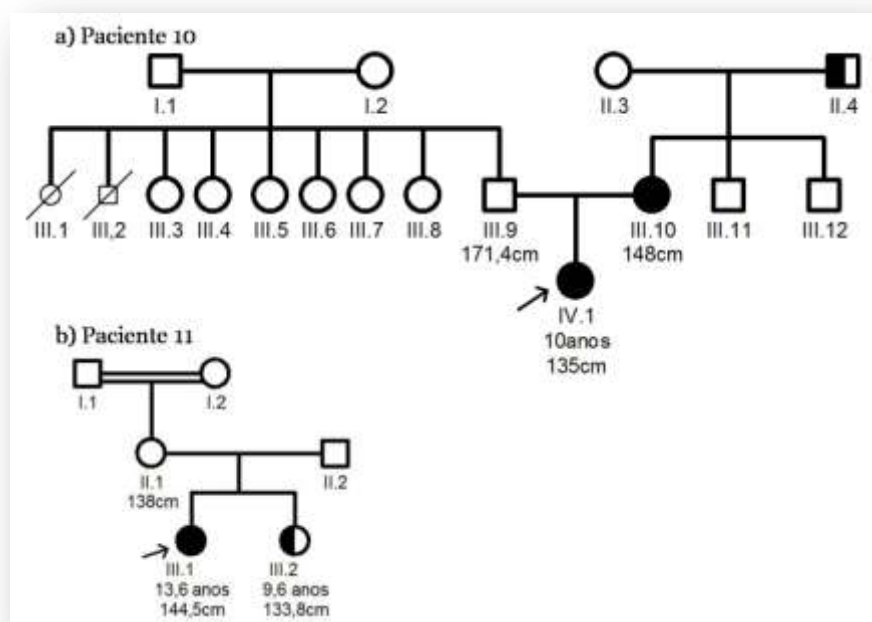
Não foi possível confirmar a hemizigose de algumas regiões nos demais pacientes, estando estes classificados como HOMO/HEMI. No caso do paciente 2, apenas as regiões *CA-repeat* e DXYS233 puderam ser estudadas, sendo detectada heterozigose em ambas. As demais regiões foram analisada na mãe da paciente que apresentou homozigose na região DXYS10091. A paciente 4 apresentou heterozigose nas regiões *Ca-repeat*, DXYS10092 e DXYS10093, sendo Homo ou Hemizigota para as demais regiões. A paciente 6 apresentou heterozigose nas regiões *Ca-repeat*, DXYS10083 e DXYS233, sendo Homo ou Hemizigota nas demais regiões. A Figura 26 mostra os heredogramas e os géis referentes aos pacientes 2, 4 e 6.



**Figura 26** – Heredograma e resultado das análises em gel das famílias 2, 4 e 6.  
 \* 2m=mãe paciente 2; 4m=mãe paciente 4; 6m=mãe paciente 6

A mãe da paciente 10 (Figura 27) apresenta as mesmas características que a paciente. Apresenta deformidade de Madelung, mesomelia, cubitus Valgus, hipoplasia de ambos os IV e V metacarpos, um retrognatismo discreto e palato ogival.

A paciente 11 é neta de casal de primos em 1º grau, sua mãe apresenta baixa estatura sem características clínicas de Síndrome de Leri-Weill e sua irmã mais nova também tem baixa estatura com sinais de Madelung (Figura 27).

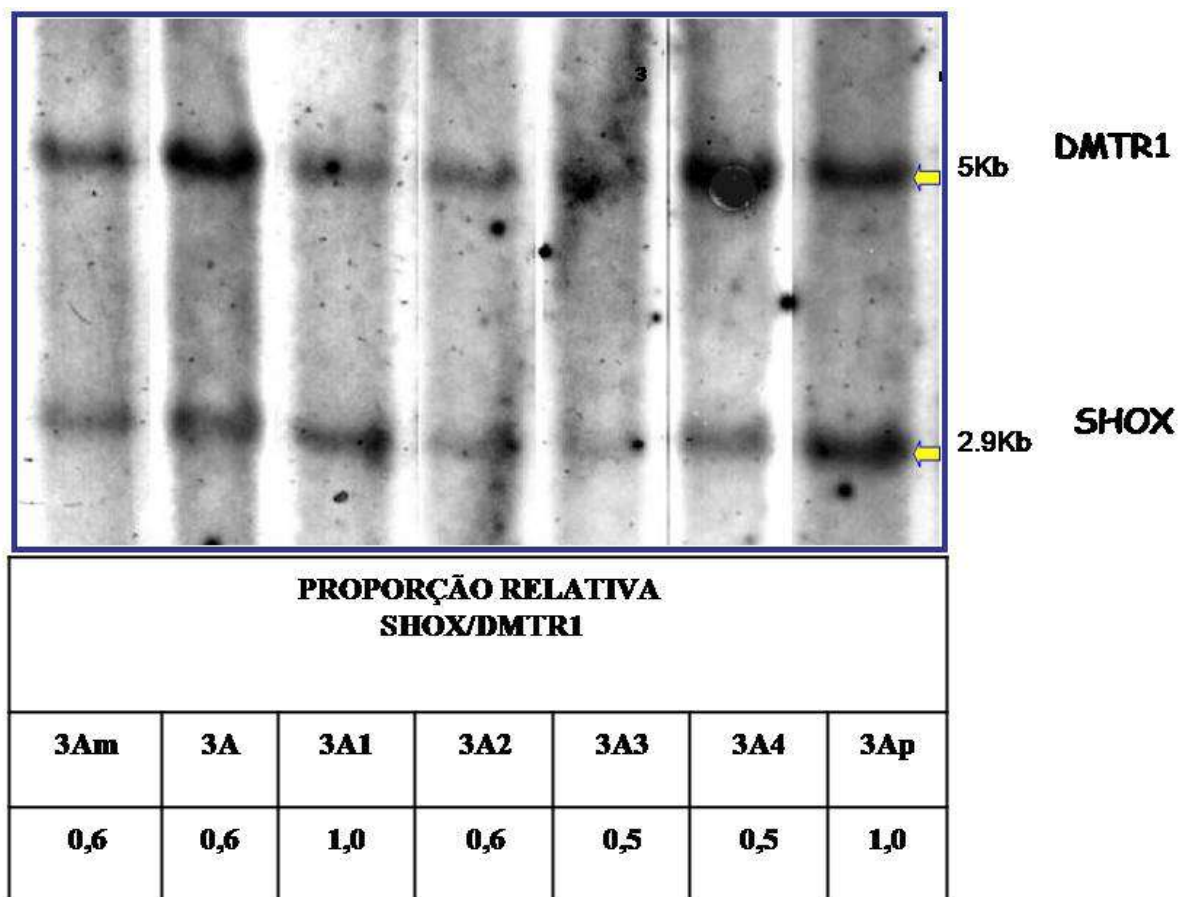


**Figura 27** – Heredograma da família da paciente 10 e 11.

Em todos os casos sem deleção confirmada do gene ou de alguma das regiões próximas a ele, foi realizado sequenciamento para verificação de possível mutação e também a quantificação da região por análise de PCR em tempo real.

## 5.2 ANÁLISE SOUTHERN BLOT

A família 3 também foi analisada utilizando-se a técnica de *Southern-Blot* para confirmação da deleção. Os resultados mostraram que a paciente 3, sua mãe (3<sub>Am</sub>) e as irmãs 3<sub>A2</sub>, 3<sub>A3</sub> e 3<sub>A4</sub> possuíam um dos genes *SHOX* deletado, o que não foi observado no pai e na irmã 3<sub>A1</sub> (Figura 28).



**Figura 28** – Análise de *Southern* utilizando sondas do éxon 4,5 do gene *SHOX* e *DMTR1* da família 3. Abaixo os índices. \* 3<sub>Am</sub>=mãe da paciente; 3<sub>Ap</sub>=pai da paciente; 3<sub>A1</sub>; 3<sub>A2</sub>; 3<sub>A3</sub>; 3<sub>A4</sub>=irmãs da paciente.



### 5.3 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO

Mutações no gene *SHOX* foram descritas em pacientes com DLW e em casos de baixa estatura idiopática acompanhada de mesomelia desde os primeiros estudos deste gene<sup>(12,13,14)</sup>. As diversas alterações encontradas muitas vezes levaram à formação de *stop codons* prematuros na proteína ou a substituições de aminoácidos causadores de alteração da função protéica. Os estudos mostraram que o fenótipo apresentado pelos indivíduos possuidores de mutação no gene não difere daquele no qual ocorre a deleção de um dos alelos. Logo, a variação fenotípica não pode ser explicada devido ao tipo de dano genético (deleção ou mutação), reforçando a ideia da haploinsuficiência, pois, em ambos os casos, ocorre a redução de 50% da função protéica.

Em estudo realizado em 18 pacientes com DLW, GRIGELIONIENE *et al.*<sup>(91)</sup>, encontraram três novas mutações de ponto, sendo uma delas uma deleção levando à formação de um *stop codon* prematuro que antecede ao homeodomínio e as outras duas substituições, também localizadas na região de homeodomínio. Outras alterações foram descritas por vários pesquisadores, entre elas, deleções e substituições na região de homeodominio e fora desta<sup>(3,6,21,37,43)</sup>.

Outro ponto importante se refere ao controle da tradução do gene, que pode definir uma maior ou menor produção de proteína. BLASCHKE *et al.*<sup>(34)</sup>, por meio de estudos por transfecção transiente, determinaram a existência de

uma região promotora dentro do éxon 2 do gene *SHOX* (a qual BLASCHKE denominou de P2), que apresentou diferenças significativas na eficiência de tradução do RNAm transcrito *in vitro*, utilizando-se diferentes linhagens celulares. Embora a transcrição a partir do promotor intragênico P2 seja tão eficiente quanto a transcrição originada do promotor localizado *upstream* (éxon 1 - P1), seu trânsito exibe uma tradução que sofre efeitos inibitórios dos sete códons AUG antecedentes do quadro aberto de leitura (ORF).

Neste trabalho, dos 11 pacientes analisados, três (27,2%) apresentavam mutação de ponto (pacientes 1, 2 e 6) levando à alteração protéica, como formação de *stop codon* e troca de aminoácidos. As alterações observadas (Tabela 8) foram encontradas na região intrônica (íntron 3) e nos éxons 3 e 4 (Figura 29). As quatro mutações são novas, embora mutações no códon 147 já tenham sido registradas com trocas de nucleotídeos e aminoácidos diferentes.

A paciente 1 apresentou uma substituição no íntron 3, mutação IVS3+21G>A (Figura 30). Esta transição ainda não foi descrita, sequer como polimorfismo, porém pode-se supor que leve à alteração do *splicing* acarretando alteração protéica. Clinicamente a paciente apresentava deformidade de Madelung e mesomelia, sendo o escore z da estatura -2,05, com ocorrência de quadro semelhante em uma das irmãs (análise molecular não realizada).

**Tabela 8** – Mutações encontradas neste estudo de acordo com o paciente

Paciente	Mutação	Conseqüência
1	IVS3+21G>A	? (suposta Interferência no <i>splicing</i> )
2	c.523delC	Gln175Lisfs44x219
6	c.439C>A	Arg147Ser

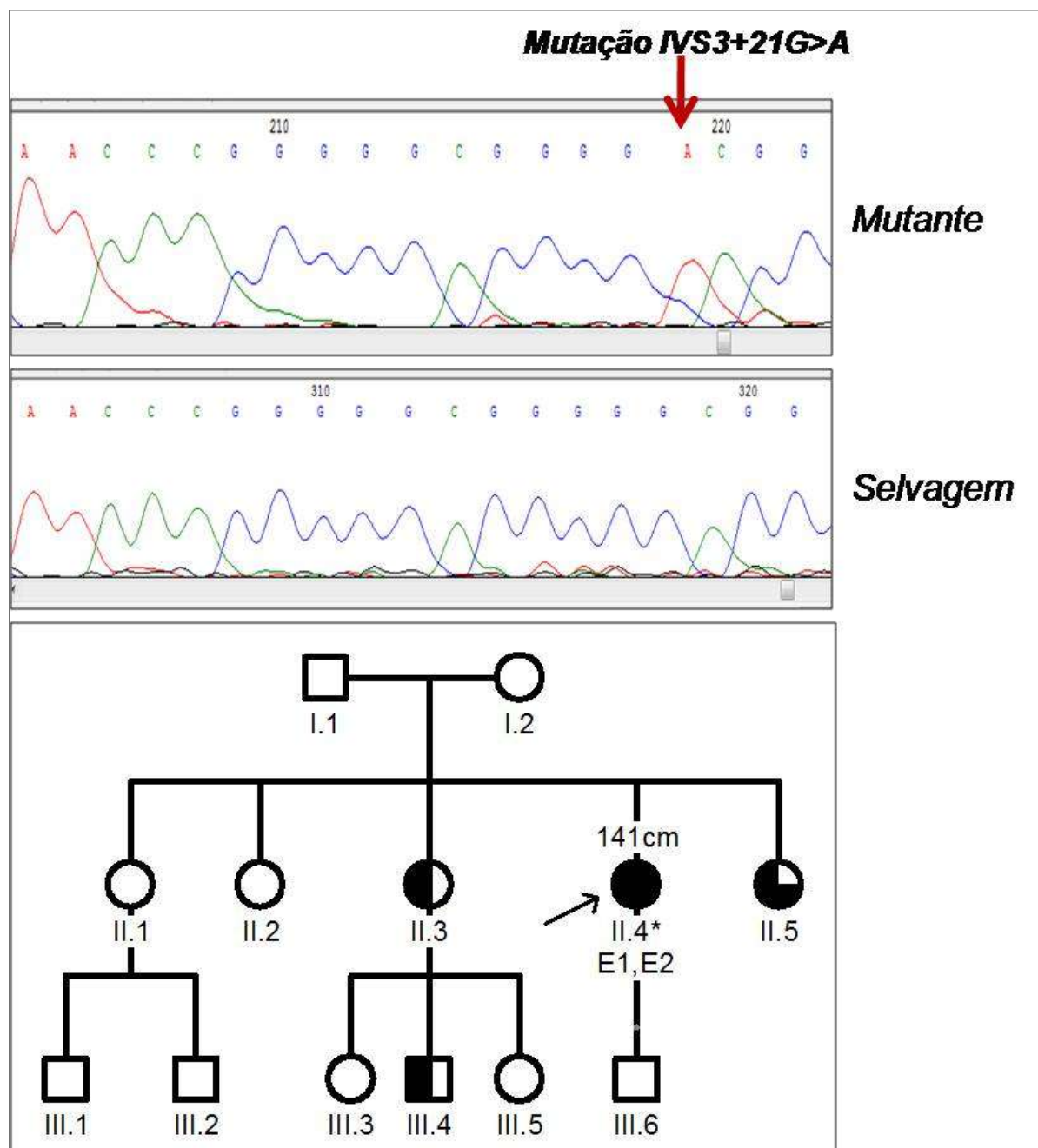
**fs** - *frame shift*,  
**x**- formação de *stop códon*



**Figura 29** – Alterações encontradas em éxons. A posição 147 já foi descrita em outros estudos, porém com substituições de resíduos diferentes. Em preto, alterações descritas até o momento na literatura. Os números dentro do retângulo indicam os pares de base correspondentes à cada éxon.

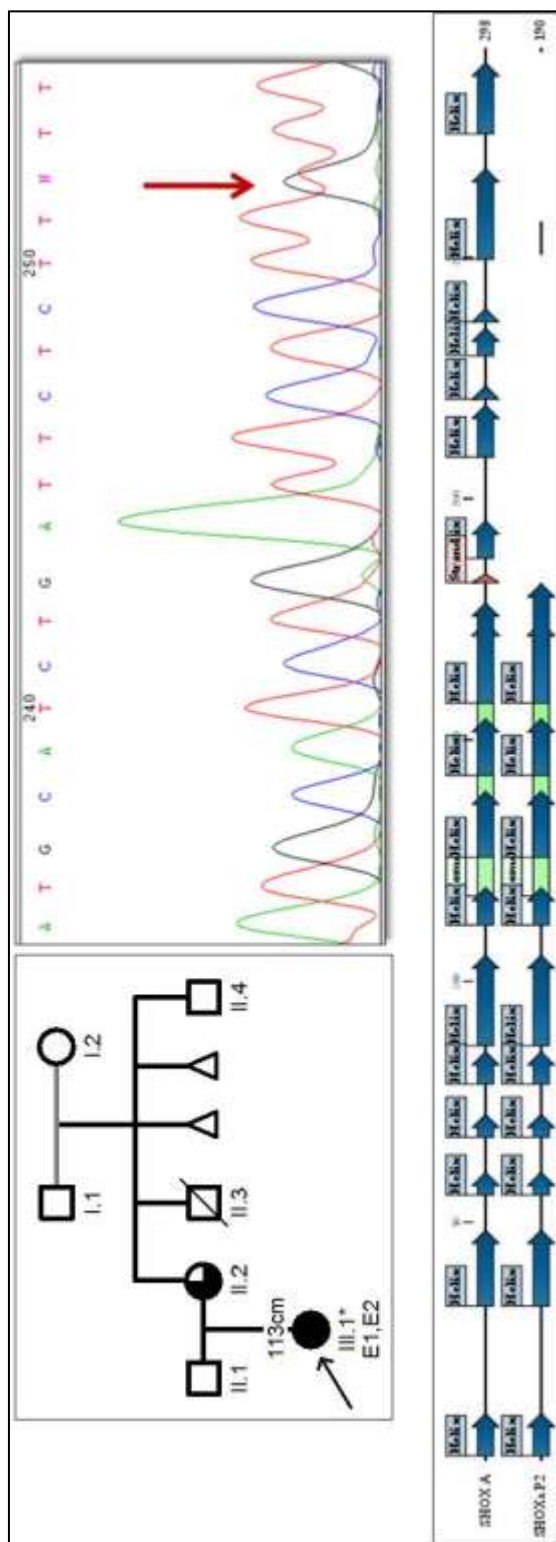
Poucas são as descrições de mutações em regiões intrônicas do gene *SHOX*, sendo estas principalmente observadas no íntron 3 (*SHOX* database). FLANAGAN *et al.*<sup>(37)</sup> descreveram a mutação IVS2-1G>A, a qual aboliu o sítio acceptor de *splicing* no limite entre o íntron 2 e o éxon 3. A alteração encontrada na paciente 1 pode interferir na edição do mRNA, levando a consequente alteração protéica; não há, entretanto, comprovação experimental até o

momento. Alterações envolvendo microdeleções de regiões de íntrons também foram descritas quando se iniciaram estudos utilizando *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA)<sup>(92,93)</sup>.



**Figura 30** – Mutação IVS3+21G>A. Acima painel da sequência de DNA, considerando a região que mostra a alteração de G por A. Abaixo o heredograma da família.

A paciente 2 apresentou deleção de uma citosina (C) no éxon 4 em heterozigose, o que leva à alteração da matriz de leitura, causando alterações na síntese de proteína a partir do resíduo 175, com formação precoce de um *stop codon* na posição 219 na formação da proteína SHOXa e 191 na proteína SHOXb (Figura 31). As deleções de ponto descritas até o momento não são muito frequentes, representando 11,7% do total de alterações encontradas no gene *SHOX* (*SHOX* database).



**Figura 31** – O painel mostra parte do sequenciamento da paciente 2 na região da deleção em heterozigose. Abaixo a representação da proteína SHOXa selvagem e a proteína putativa da paciente.

Análise realizada considerando a proteína *SHOX* em diferentes espécies estudadas mostrou a grande similaridade da proteína entre elas (Figura 32). A comparação entre as sequências das proteínas de diferentes espécies manifestou a existência de regiões que possuem resíduos muito conservados, indicando que devem ter importância fundamental para a forma protéica final, que determina a função desta. Se há grande conservação, simples substituições podem levar a danos protéicos – no caso da paciente 2, existe uma região extensa deletada, comprometendo ainda mais a função da proteína.

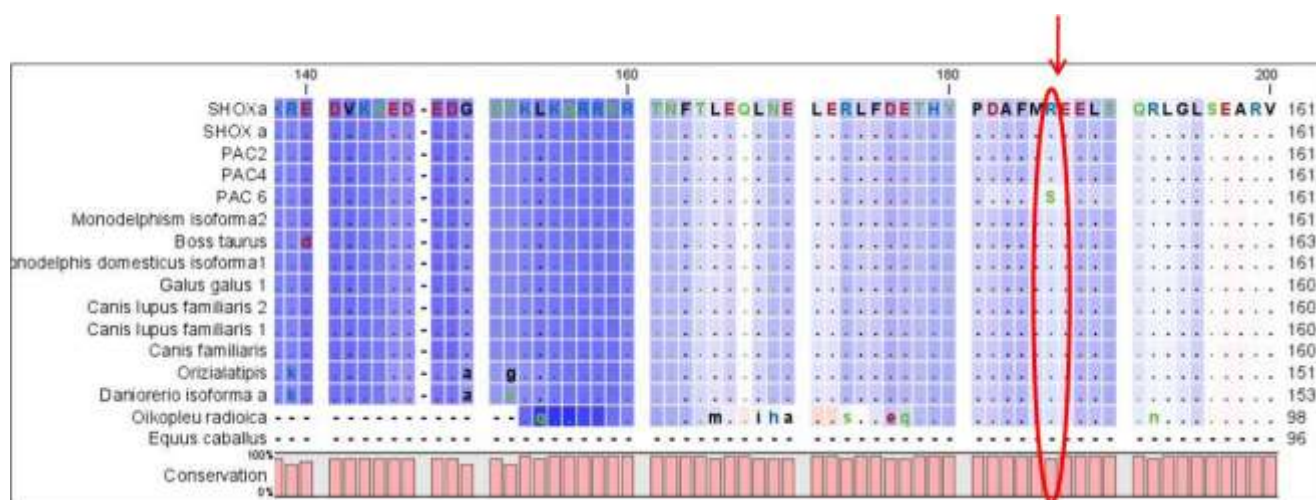
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Monodelphis isoforma2		93,89	90,03	90,03	87,14	88,42	88,42	88,75	85,94	81,03	81,47	64,54	59,54	47,51	26,90	23,40
Monodelphis domesticus isoforma1			95,89	95,89	92,81	94,18	94,18	94,52	91,50	86,30	86,73	68,71	58,72	50,31	26,61	24,91
Galus galus isoforma 1		90,03	95,89		100,00	94,16	94,16	94,50	91,50	84,59	85,03	67,01	58,89	50,00	26,39	24,91
Galus galus isoforma 2		90,03	95,89	100,00		94,16	94,16	94,50	91,50	84,59	85,03	67,01	58,89	50,00	26,39	24,91
SHOX a		87,14	92,81	93,15		95,21	95,21	95,55	92,86	84,25	84,01	65,99	59,01	49,38	26,02	29,01
Canis lupus familiaris 1		88,42	94,18	94,16	94,16		100,00	99,66	92,86	85,27	84,35	66,33	59,18	49,07	26,39	27,65
Canis lupus familiaris 2		88,42	94,18	94,16	94,16	95,21	100,00		92,86	85,27	84,35	66,33	59,18	49,07	26,39	27,65
Canis familiaris		88,75	94,52	94,50	94,50	95,55	99,66		93,20	85,62	84,69	66,67	59,48	49,38	26,69	27,65
Bos taurus		85,94	91,50	91,50	91,50	92,86	92,86	93,20		83,67	84,80	66,89	59,54	49,38	26,45	25,76
Orizialatpis		81,03	86,30	84,59	84,59	85,27	85,27	85,62	83,67		90,53	72,28	59,52	49,68	28,01	20,14
Danicoreno a		81,47	86,73	85,03	85,03	84,35	84,35	84,69	84,80	90,53		80,70	59,23	49,52	26,95	19,39
Danicoreno b		64,54	68,71	67,01	67,01	66,33	66,33	66,67	66,89	72,28	80,70		45,54	41,75	22,96	21,35
Mus musculus shox2		59,54	58,72	58,89	58,89	59,18	59,18	59,48	59,54	59,52	59,23	45,54		41,99	23,98	12,21
Branquiosoma floridae		47,51	50,31	50,00	50,00	49,07	49,07	49,38	49,38	49,68	49,52	41,75	41,99		24,26	9,36
olkopleu radioca		26,90	26,61	26,39	26,39	26,02	26,39	26,69	26,45	28,01	26,95	22,96	23,98	24,26		2,03
equus caballus		23,40	24,91	24,91	24,91	27,65	27,65	27,65	25,76	20,14	19,39	21,35	12,21	9,36	2,03	

Figura 32- Similaridade apresentada entre a proteína SHOX de diversas espécies de animais.



A paciente 6 apresentou uma transversão c.439C>A ocasionando a substituição Arg147Ser na proteína. O levantamento clínico mostrou estatura normal (escore z -0,72) associada a mesomelia e deformidade de Madelung; era filha de casal consanguíneo e sua mãe apresentava quadro semelhante.

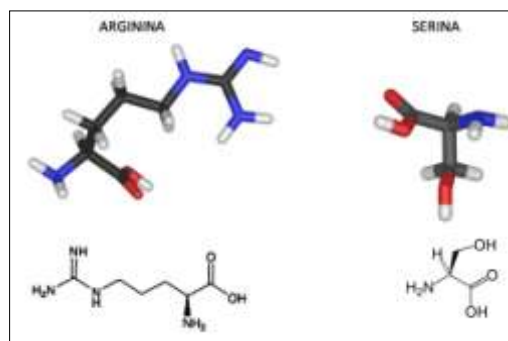
A região 147 se manteve conservada nas diferentes espécies, indicando ser importante a manutenção da estrutura terciária da proteína (Figura 33).



**Figura 33** – Detalhe da região da mutação R147S, na qual podemos verificar que o aminoácido se mantém conservado.

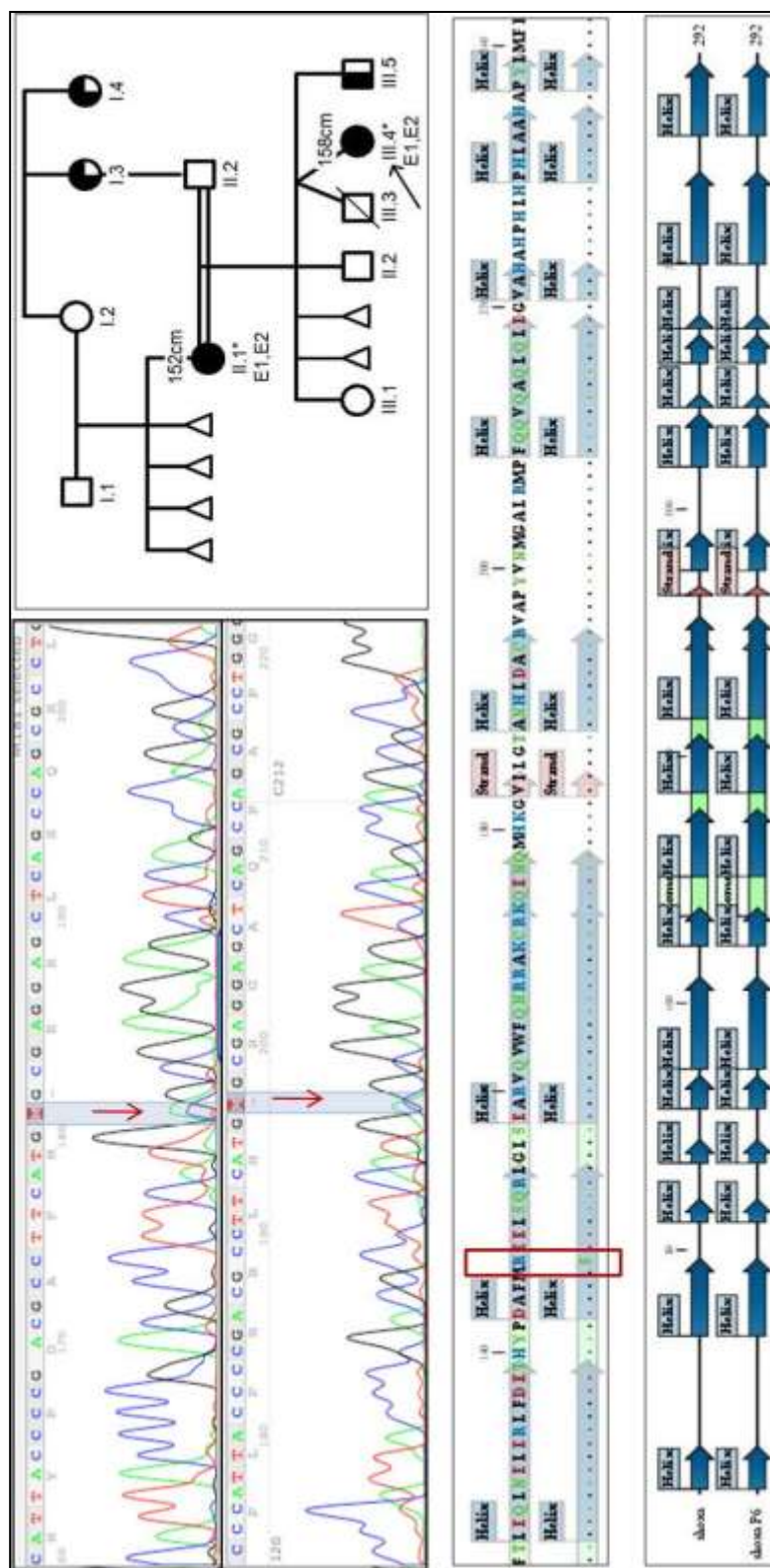
Alterações no resíduo 147 já foram descritas anteriormente, porém as substituições se referiam a outros aminoácidos<sup>(3,95)</sup>.

Os aminoácidos arginina e serina possuem propriedades diferentes (Figura 34). A arginina é um aminoácido polar positivo, enquanto a serina é um aminoácido polar neutro. Outro aspecto é a hidrofobicidade, que também difere nos dois aminoácidos. Logo, se considerarmos que a interação entre os aminoácidos é importante para a manutenção da estrutura terciária e consequentemente para sua função, a substituição pode levar a um dano protéico.



**Figura 34** – Estrutura dos aminoácidos arginina e serina.

A alteração do códon 147 apresentada neste trabalho resultou de uma transversoão ocorrida no nucleotídeo 439, c.439**C>A** (éxon 3) (Figura 35).



**Figura 35**– Detecção da mutação c.439C>A. Acima a região da mutação encontrada na paciente 6; ao lado, heredograma da família; na parte inferior, a sequência protéica indicando o resíduo alterado e a predição da estrutura secundária.

Com base nas mutações nesse códon descritas até o momento na literatura, foram comparadas as predições de alterações na proteína para cada uma delas. Essa comparação pode ser observada na Figura 36, onde foram consideradas a carga dos aminoácidos, hidrofobicidade e predição de formação de estrutura secundária.



**Figura 36** – Predição das alterações protéicas geradas pelas mutações descritas até o momento na literatura para o códon 147 da proteína SHOXa.

A substituição da arginina por prolina modifica a hélice da estrutura secundária, mas isto não ocorre com as outras alterações. No caso da substituição R147L, há alteração da hidrofobicidade. Já a alteração descrita neste trabalho, assim como no caso da mutação R147H, não prediz nenhuma destas alterações.

Outro aspecto a ser considerado é que, de acordo com MARCHINI *et al.*<sup>(45)</sup>, foram realizadas predições com relação aos sítios de fosforilação na proteína *SHOX*, sendo os principais sítios de SH3 nos aminoácidos Ser106 e Ser151. O sítio 151 envolve a sequência de aminoácidos **REELSQRLG**, com o aminoácido **R** na posição 147, que, no paciente 6, apresenta uma substituição, **R147S**. Logo, a substituição por uma serina poderia alterar o sítio de fosforilação desta. Como a proteína *SHOX* é ativada por fosforilação, podemos suspeitar que esta mutação poderia levar à síntese de uma proteína inativa.

Além das mutações de ponto descritas acima, foram também encontradas alterações localizadas nas regiões não traduzidas dos éxons 1 e 2, sendo que aquelas no éxon 1 ainda não estão descritas na literatura (Tabela 9).

**Tabela 9** – Alterações encontradas no éxon 1 e na região, não traduzida do éxon 2 em alguns pacientes deste estudo.

P	Éxon 1				Éxon 2	
	(-) 6844 C>T	(-) 6768 G>A	(-)6599 G>C <i>IRES</i>	(-) 6520 G>A <i>splicing</i>	CTC <sub>4</sub> ACACT <sub>14</sub> GT <sub>4</sub> GT <sub>4</sub> AT <sub>3</sub> CGT <sub>3</sub> rs55872554 <u>Del T</u> Rs2239401 Já descrita	
2	C/T	G/G	G/G	G/G	CT <sub>12</sub> G <sub>3</sub> T <sub>3</sub> NT <sub>4</sub> NT <sub>3</sub> CT <sub>12</sub> G <sub>2</sub> T <sub>4</sub> GT <sub>4</sub> AT <sub>3</sub>	G/A
4	C/C	G/G	G/G	G/G	NT <sub>15</sub> G <sub>2</sub> T <sub>4</sub> GT <sub>4</sub> AT <sub>3</sub>	G/A
5	C/C	G/G	C/C	G/G	CT <sub>10</sub> NNG <sub>6</sub> CT <sub>14</sub> G <sub>2</sub> T <sub>4</sub> GT <sub>4</sub> AT <sub>3</sub>	G/G
6*	C/C	G/A	G/G	G/G	CT <sub>3</sub> GT <sub>11</sub> NG <sub>2</sub> T <sub>4</sub> GT <sub>4</sub> AT <sub>3</sub> CT <sub>3</sub> GNT <sub>11</sub> G <sub>2</sub> T <sub>4</sub> GT <sub>4</sub> AT <sub>3</sub>	G/A
9	C/C	G/G	G/G	G/A	CT <sub>11</sub> NG <sub>2</sub> NT <sub>2</sub> NGT <sub>3</sub> N <sub>2</sub> T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> GT <sub>2</sub>	A/A
11	C/C	G/G	G/G	G/A	T <sub>12</sub> G <sub>2</sub> N <sub>4</sub> T <sub>4</sub> NT <sub>3</sub> N <sub>2</sub> T <sub>3</sub> N <sub>2</sub> T <sub>12</sub> G <sub>2</sub> T <sub>4</sub> GT <sub>4</sub> AT <sub>3</sub> CG <sub>2</sub> T <sub>3</sub>	G/A

\*Alteração também encontrada na mãe que apresenta sinais clínicos semelhantes.

Mutações na região transcrita que antecede o códon de início da tradução do gene podem levar a alterações na conformação da 5'-UTR (*untranslated region*) existente, o que, conseqüentemente, pode conferir uma mudança na estrutura secundária gerando um comportamento modificado na eficiência de tradução, uma vez que na 5'UTR está localizado o sítio interno de entrada do ribossomo (*IRES - Internal Ribosome Entry Site*)<sup>(95,96)</sup>.

A iniciação da tradução mediada por IRES é estritamente dependente da integridade estrutural desta região, o que faz com que pequenas deleções ou

inserções, e mesmo a substituição de nucleotídeo único nos elementos IRES, sejam capazes de reduzir ou aumentar a sua atividade<sup>(97-102)</sup>

As alterações encontradas neste estudo não estão exatamente nos códons AUG que antecedem o *start codon*, mas encontram-se na região 5'UTRs (Figura 37); estas novas mutações podem levar a alterações conformacionais na região, interferindo nas estruturas secundária e terciária desta, podendo causar uma interferência na tradução.

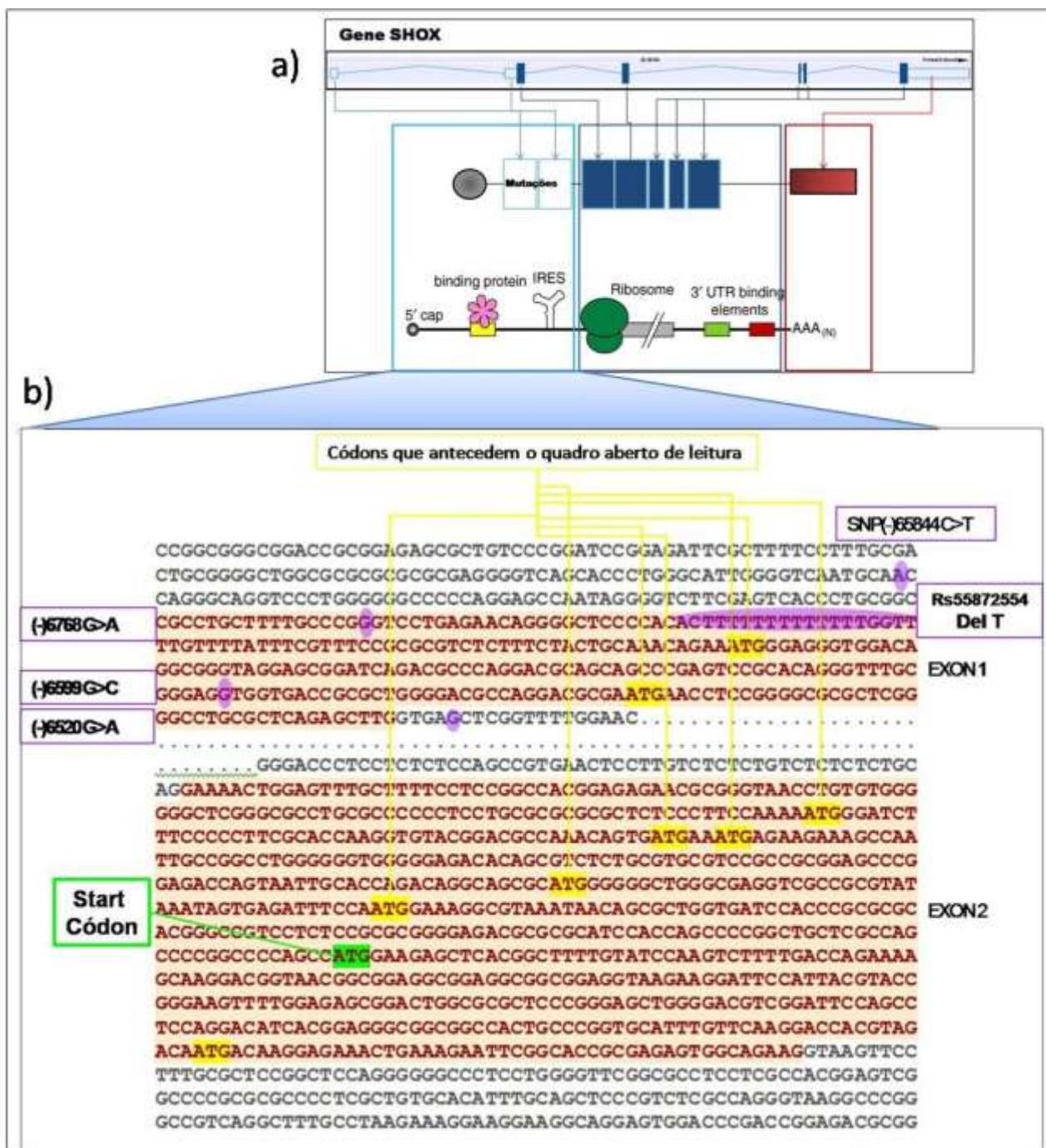
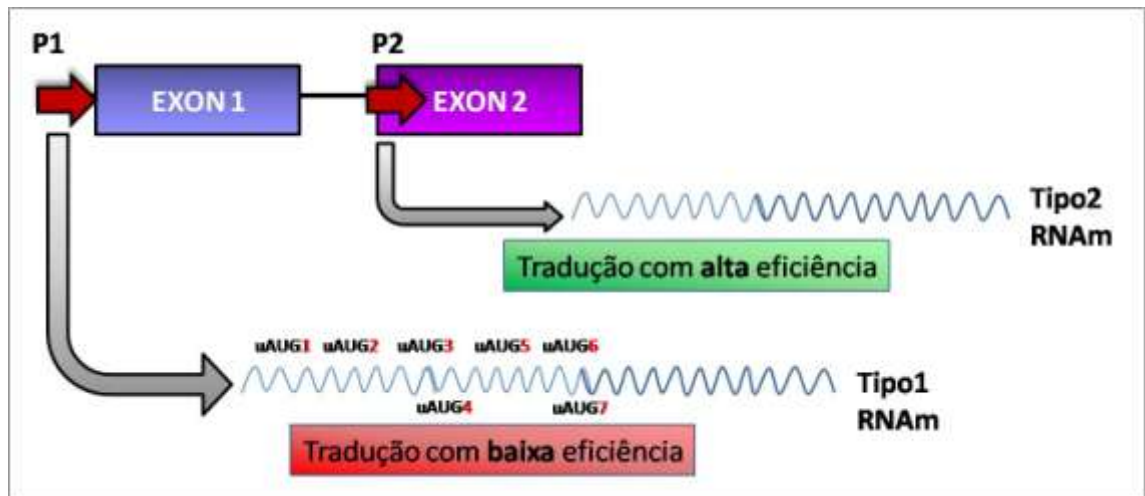


Figura 37 – Em (a), esquema mostrando os éxons do gene *SHOX* e sua correspondência ao RNAm e região de 5'UTR. Em (b,) esquema mostrando: em verde, o códon de iniciação do gene, localizado no éxon 2; em amarelo, os códonos ATG que antecedem ao códon de início (éxons 1 e 2); e, em violeta, os locais de mutações novas encontradas no éxon 1.



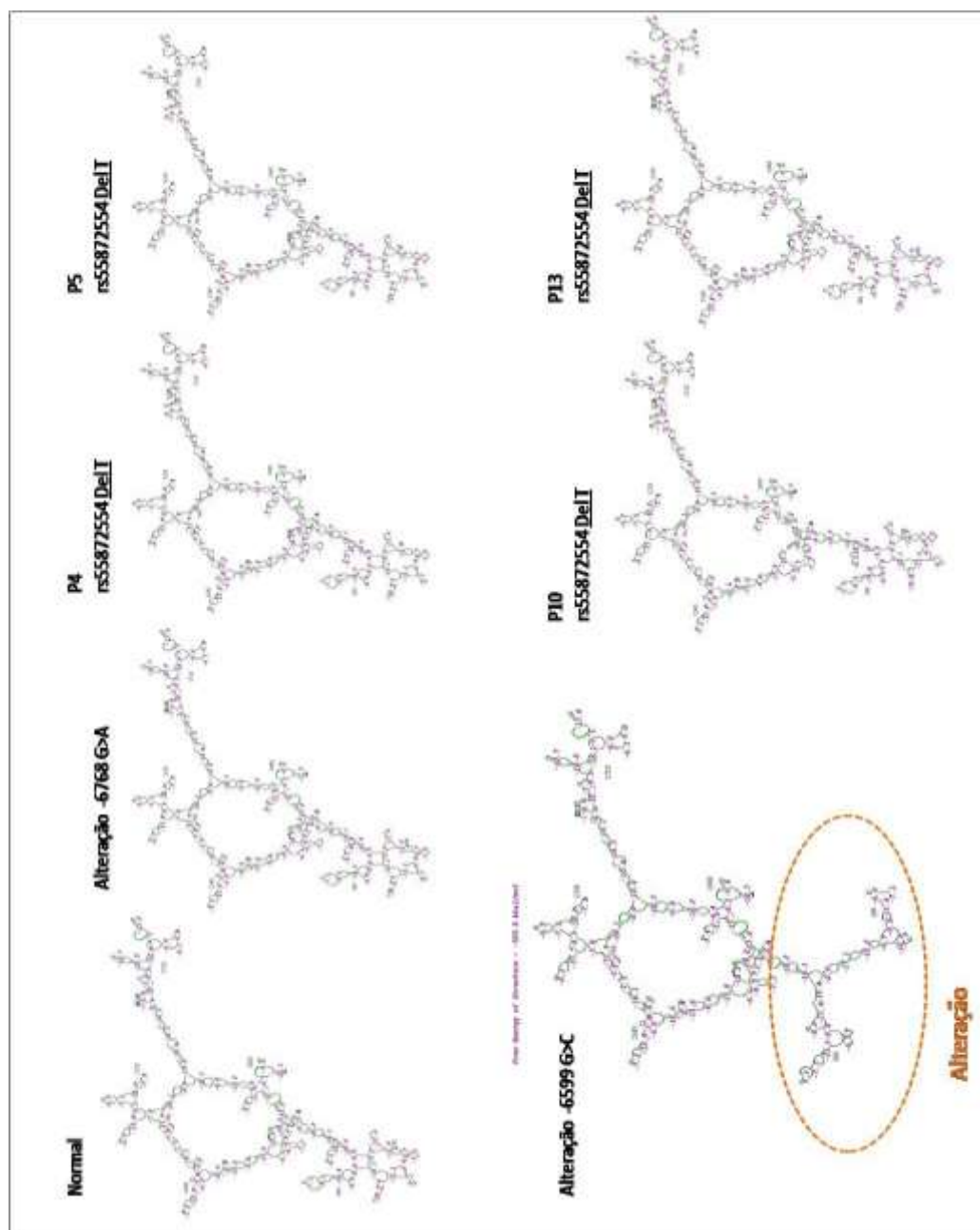
Segundo BLASCHKE *et al.*<sup>(34)</sup>, o gene *SHOX* tem pelo menos dois promotores alternativos; sendo que os RNA<sub>m</sub> variam apenas quanto à região de 5'UTR, situação que sugere existir uma regulação da tradução. Os distintos RNA<sub>ms</sub> originados foram estudados e mostraram possuir eficiência de tradução diferenciada e codificação idêntica, o que parece ser uma possível explicação para a heterogeneidade fenotípica encontrada entre os indivíduos, do mesmo modo que alterações mais graves como as apresentadas pelos indivíduos deste estudo (Figura 38).



**Figura 38** – Esquema do modelo de regulação da transcrição do gene *SHOX* por dois promotores alternativos. Os dois transcritos possuem codificação idêntica, porém distintas regiões de 5'UTR, fato que leva à distinta eficiência de tradução. Modificado de BLASCHKE *et al.* (2003):

Na tentativa de realizar uma investigação mais detalhada, as sequências alteradas dos pacientes foram submetidas ao programa livre na internet (RNA *secondary structure prediction*), para a simulação de estrutura secundária do RNA<sub>m</sub> (Figura 39). Ficou demonstrado claramente que existem alterações na

estrutura secundária predita com base na sequência que carrega a mutação - 6599 (G>C) antecedente ao *start codon*.



**Figura 39** – Esquema mostrando as simulações realizadas para estrutura secundária do RNAm a partir da sequência normal e com as sequências com as alterações encontradas nos pacientes deste trabalho. A mutação -6599 G>C apresentou forma secundária diferente das demais. [http://www.genebee.msu.su/services/rna2\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html)

#### **5.4 ANÁLISES POR PCR EM TEMPO REAL**

O método de PCR em tempo real tem se mostrado uma ferramenta poderosa em análises quantitativas de DNA para a verificação de alterações no número de cópias de alelos<sup>(103,104)</sup>. Deste modo, utilizou-se a PCR em tempo real para verificar possíveis deleções de regiões próximas ao gene *SHOX* nos pacientes nos quais não havia sido possível confirmar a hemizigose por microssatélites.

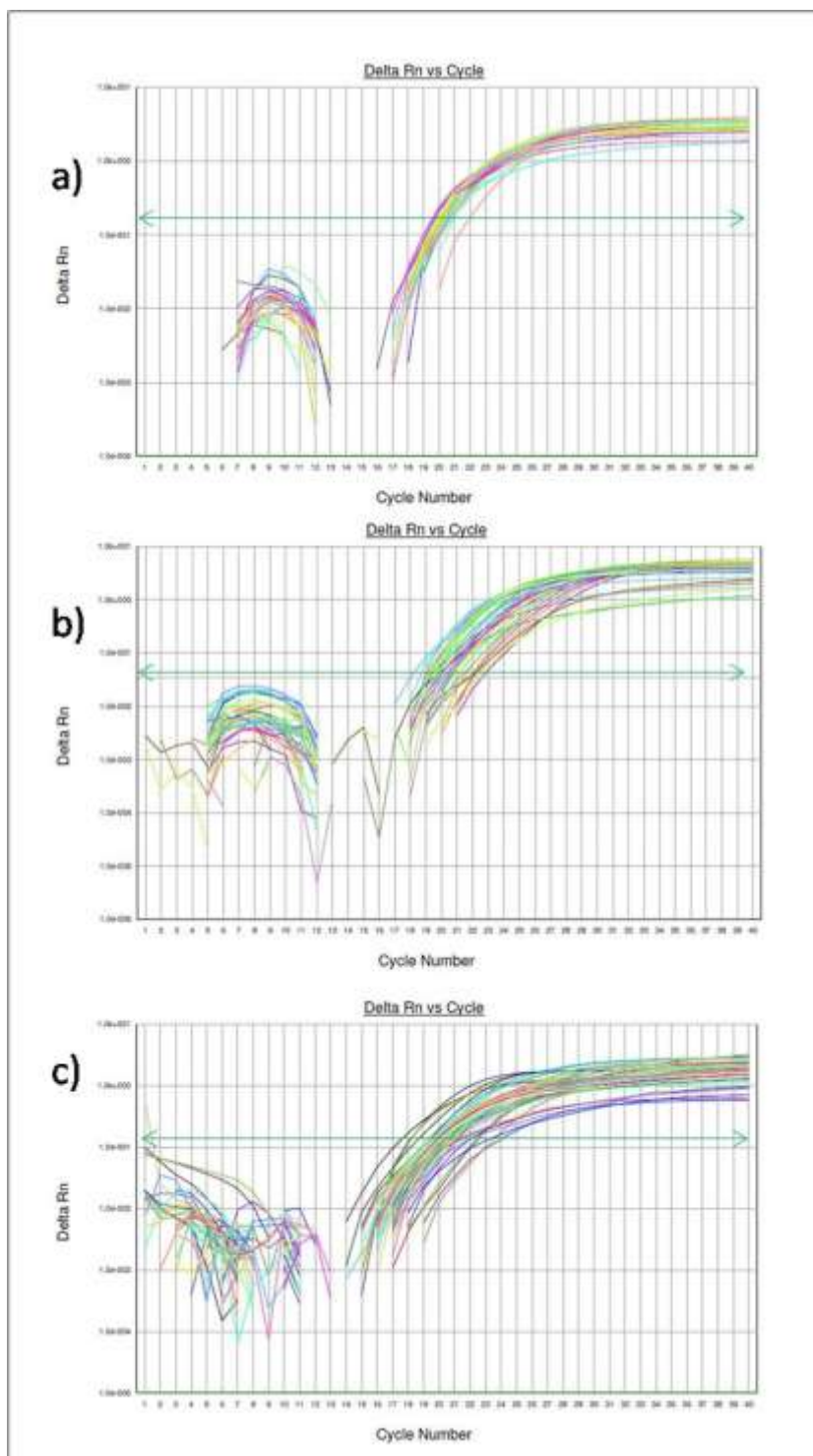
A técnica PCR em tempo real foi efetuada com os 11 pacientes, entretanto não foi possível a amplificação de todos com boa reprodutibilidade. Algumas amostras apresentaram uma curva de amplificação com comportamento diferenciado do normal para se estabelecer uma quantificação exata com segurança; logo, não serão apresentados todos os resultados dos pacientes do estudo.

Feita uma avaliação dos dados obtidos até aquele momento e diante dos problemas que apresentaram algumas amplificações, decidiu-se que a região DXYS10091 seria prioritária, pois, além de estar envolvida em um número maior de pacientes sem resultados conclusivos, apresenta também um tamanho em número de pares de bases (entre 202 e 220 pb) próximo ao do gene de referência (220 pb).

Inicialmente todas as amostras foram diluídas e ajustadas para a concentração de 100 ng/μL. Para cada reação, obtiveram-se gráficos de amplificação similares ao da Figura 13, onde pode ser observado o posicionamento do limiar (*threshold* - linha horizontal verde) logo no início da fase geométrica de progressão da PCR (Figura 40). As informações dadas pelo *software* (ABI PRISM 7300) são baseadas nos CTs, considerando as triplicatas, aceitas apenas quando os valores dos desvios foram inferiores a 0,5.

#### **5.4.1. Análise em PCR em tempo real da Região DXYS10091**

Os valores de Cts apresentados pela região DXYS10091 de interesse, assim como pelo gene endógeno (fator V de *Leiden*) de cada uma das amostras, foram utilizados para calcular as quantidades relativas de material amplificado na PCR para cada paciente. Em todas as corridas válidas, os cálculos estatísticos empregados foram efetuados com base nos métodos  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e  $\Delta KCt$ , descritos anteriormente.

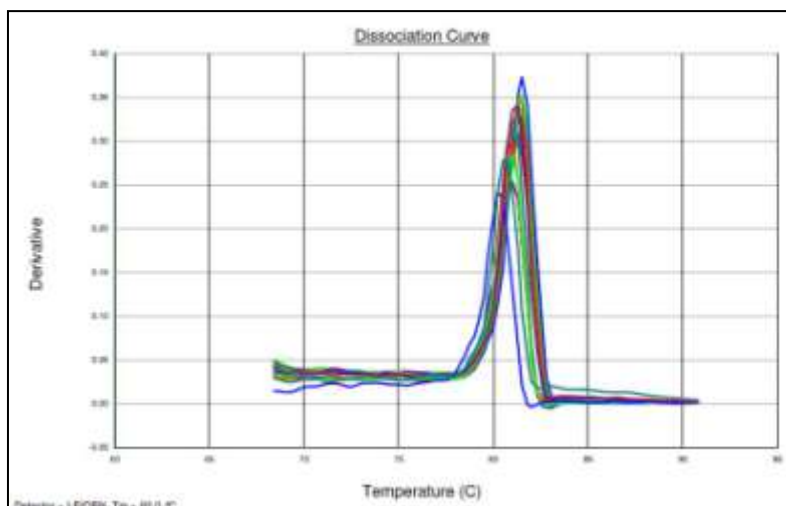


**Figura 40** – Gráfico exibido pelo programa referente aos Cts dos dados capturados nas corridas da região DXYS10091, sendo a linha verde o *threshold* de cada reação. Em (a,) corrida Time3; em (b), corrida Time8; e, em (c), corrida Time9.

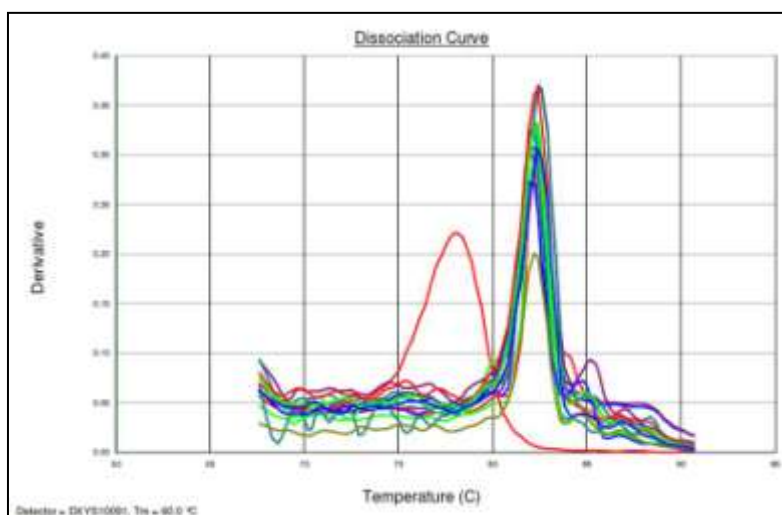
Por ser um sistema de detecção não específico, muitas vezes o *SYBR Green* pode ligar-se a dímeros de *oligos* iniciadores ou a outros produtos inespecíficos.

Para verificar se este problema está ocorrendo, é realizada, a cada fim de reação, uma curva de dissociação ou *melting*, a qual indica se há um ou mais produtos de PCR inespecíficos presentes nas reações. Isto é possível devido à diferença de temperatura de *melting* ( $T_m$ ) entre eles, caracterizada pelo número e composição de bases de cada um. Essa curva resulta de um aumento gradual da temperatura de 60° C para 95°; à medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento de temperatura, cai o sinal fluorescente do *SYBR Green* (Figuras 41 e 42).

Podemos observar que a curva de *melting* do gene referência se apresenta mais compacta quando comparada ao padrão da região DXYS10091. Isto se deve ao fato de a região DXYS10091 se tratar de uma região de repetição, existindo, portanto, uma variação entre cada um dos indivíduos do estudo, embora esta não ultrapasse 10 pb nos pacientes em questão.



**Figura 41** – Curvas de dissociação do gene Fator V de coagulação de *Leiden*; Tm aproximadamente 81°C.



**Figura 42** - Curvas de dissociação do gene Fator V de coagulação de *Leiden*; Tm aproximadamente 83°C. Os picos menores ou com diferentes Tms correspondem aos controles negativos.

Os resultados obtidos por meio da reação em PCR em tempo real da região DXYS10091 foram organizados e são apresentados tendo-se em conta o número da corrida em questão e o paciente (Tabela 10). Os valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

próximos de 0,5 são considerados valores de deleção, e os valores de  $\Delta K Ct$  representando deleção são os que estão entre -0,65 e -1,35.

**Tabela 10** - Resultados das análises da região DXYS10091 baseadas nas corridas realizadas em PCR em tempo real e as médias dos Cts de cada indivíduo.

P	TIME3				TIME8				TIME9			
	MD $\pm$ dsv Lenden	MD $\pm$ dsv DXYS10091	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta K Ct$	MD $\pm$ dsv Lenden	MD $\pm$ dsv DXYS10091	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta K Ct$	MD $\pm$ dsv Lenden	MD $\pm$ dsv DXYS10091	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta K Ct$
7	18,6 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,1	<b>0,72</b>	-0,5	18,9 $\pm$ 0,2	19,3 $\pm$ 0,3	1,4	0,33	19,1 $\pm$ 0,1	21,3 $\pm$ 0,2	0,8	-0,5
9	19,0 $\pm$ 0,0	20,4 $\pm$ 0,4	<b>0,38*</b>	<b>-1,4*</b>	19,1 $\pm$ 0,5	21,6 $\pm$ 0,4	<b>0,34*</b>	<b>-1,8*</b>	18,5 $\pm$ 0,1	18,63 $\pm$ 0,2	<b>0,41*</b>	<b>-1,2*</b>
10	18,8 $\pm$ 0,1	19,1 $\pm$ 0,2	<b>0,76</b>	-0,4					-	-	-	
11	19,3 $\pm$ 0,2	19,3 $\pm$ 0,2	1,0	0,0	18,8 $\pm$ 0,7	19,1 $\pm$ 0,06	1,6	0,53	-	-	-	

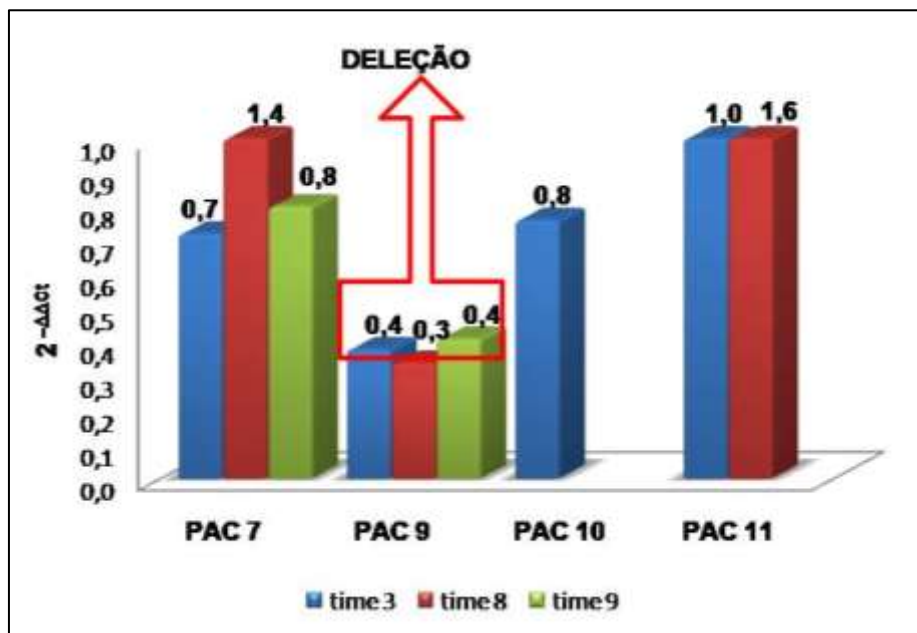
**P** = pacientes **MD** = média, **dsv** = desvio padrão,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  = resultados dos cálculos utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$ ,  **$\Delta K Ct$**  = valores utilizando os cálculos de  $K Ct$ .

\* Valores que indicam a deleção da região.

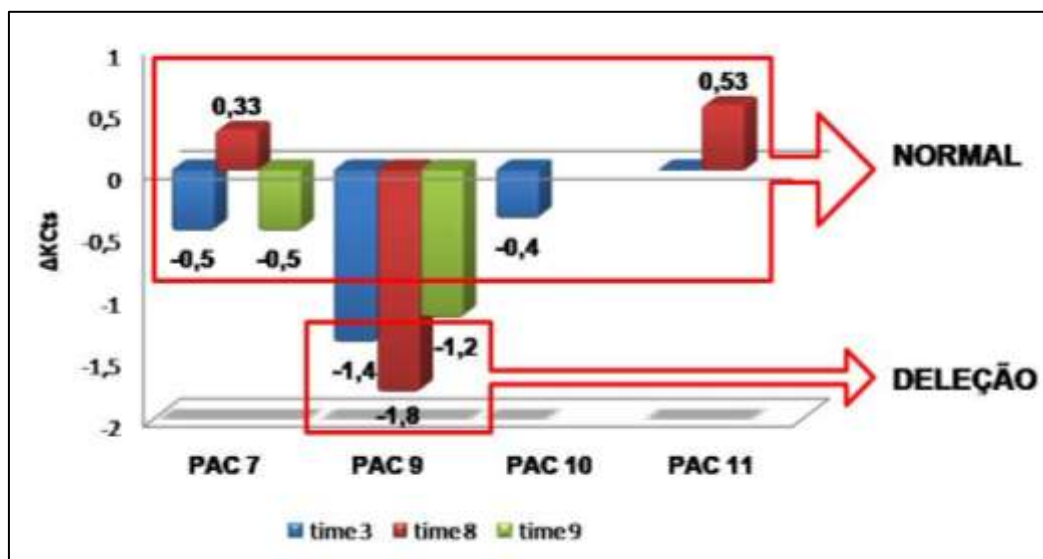
Com base, na tabela, pode-se observar que apenas o paciente 9 apresenta resultados que sugerem deleção da região para ambos os cálculos adotados, como já havia sido concluído pela análise de microssatélites.

Para o paciente 10 foram obtidos valores limítrofes (Figuras 43 e 44), existindo necessidade de análise mais detalhada; no entanto, outras repetições foram realizadas e não produziram o sucesso esperado, ocorrendo o mesmo problema que na análise aqui mostrada.





**Figura 43** – Figura representando o gráfico dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  por paciente em cada uma das corridas realizadas. O paciente 9 apresenta deleção na região estudada.



**Figura 44** – Figura representado o gráfico dos valores obtidos pelo cálculo de  $\Delta KCts$  de cada paciente por corrida realizada. Paciente 9 confirmando a deleção e o paciente 10 com resultado limite para deleção.

Deste modo, as análises de PCR em tempo real auxiliaram na análise da condição alélica de alguns pacientes que apresentavam resultados antes indefinidos devido à limitação da metodologia de microssatélite utilizada. Além da confirmação da deleção da região DXYS10091 do paciente 9, foi possível detectar a presença dos dois alelos nos pacientes 7, 10 e 11 (Tabela 10).

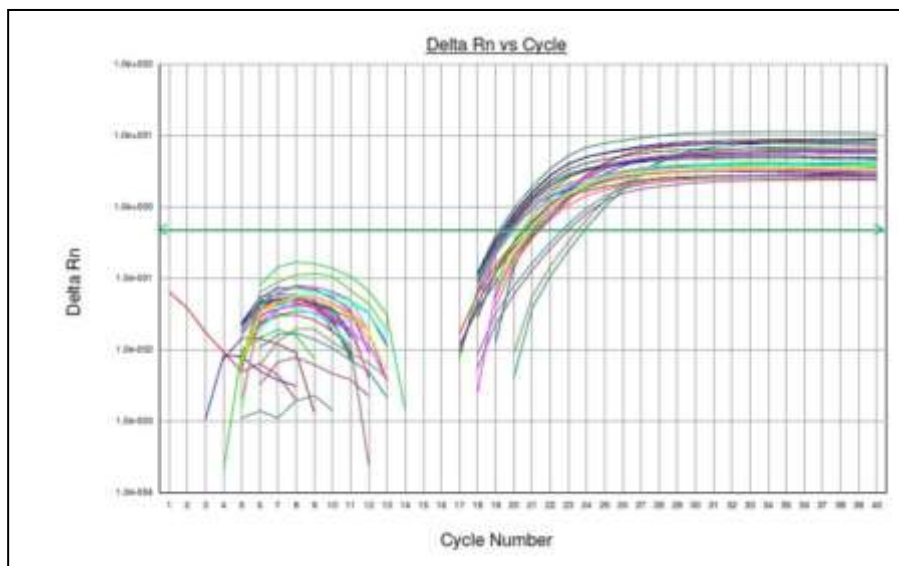
O paciente 10 mostrou resultados limítrofes na análise, quando utilizado o cálculo  $\Delta\Delta Ct$ , o que dificulta a interpretação. Os mesmos dados foram submetidos à análise, usando-se a metodologia de  $\Delta K Ct$ , pela qual o paciente 10 manifestou indicativo de normalidade. Desta maneira, novas análises foram realizadas, mas os resultados não apresentaram uma confiabilidade dentro dos padrões empregados para este trabalho.

#### **5.4.1. Análise em PCR em tempo real da Região CA-repeat**

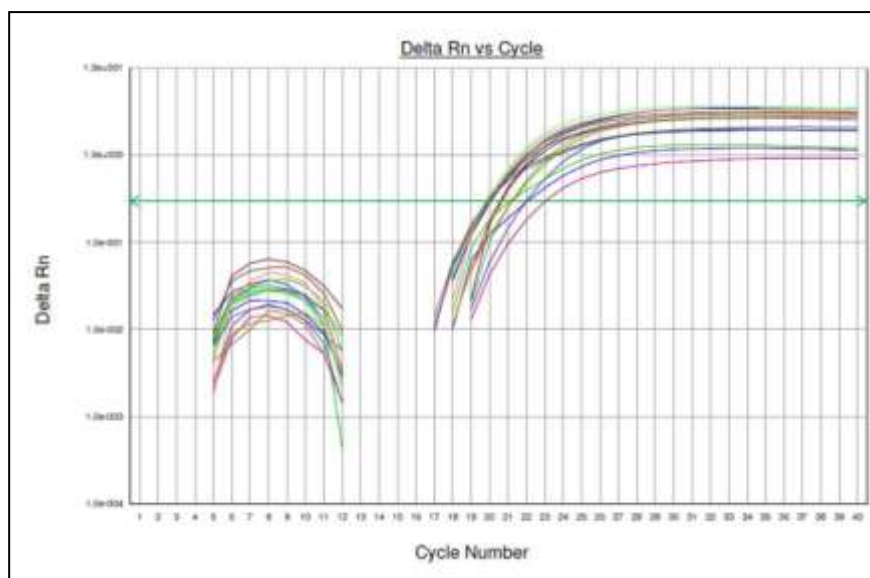
Realizou-se a análise da região CA-repeat com todos os pacientes, porém a amplificação foi considerada com qualidade apenas nos pacientes 6, 7, 9, 11. Provavelmente a maior dificuldade de obtenção de resultados

confiáveis se verifica devido à maior heterozigose alélica (86%) pelos indivíduos nesta região.

Os gráficos dos Cts apresentados pelos indivíduos nas duas corridas consideradas são mostrados nas Figuras 45 e 46.

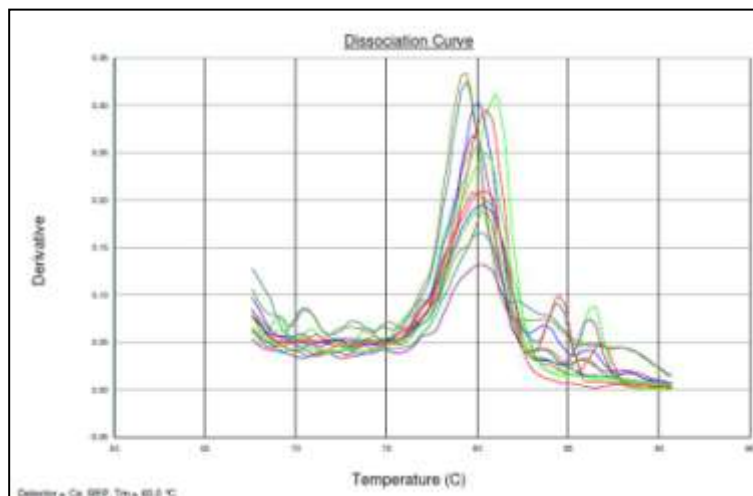


**Figura 45** - Gráfico exibido pelo programa referente aos dados DXYS10091 dos Cts da corrida Time1.

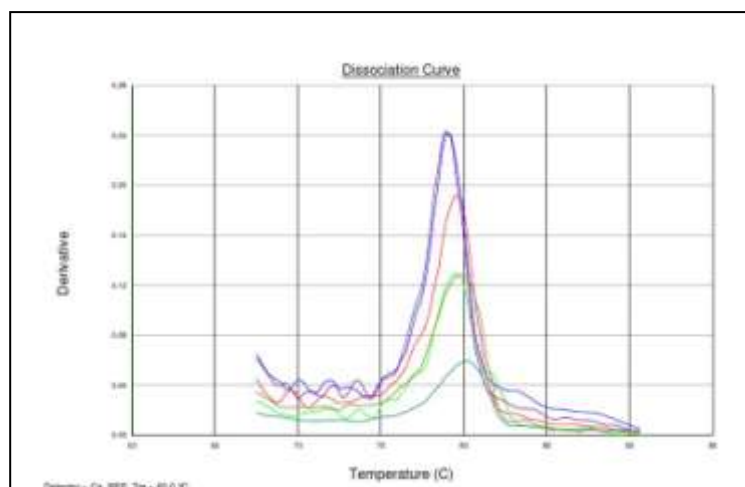


**Figura 46** - Gráfico exibido pelo programa referente aos dados DXYS10091 dos Cts da corrida Time2.

As curvas de *melting* para cada corrida mostraram-se dentro do padrão, embora não tão compactas como a do gene de referência (Figuras 47 e 48).



**Figura 47** – Curvas de dissociação da região CA-repeat do Time 1; T<sub>m</sub> aproximadamente 60°C. Os picos menores ou com diferentes T<sub>m</sub>s correspondem aos controles negativos.



**Figura 48** - Curvas de dissociação da região CA-repeat do Time 2; T<sub>m</sub> aproximadamente 60°C. Os picos menores ou com diferentes T<sub>m</sub>s correspondem aos controles negativos.

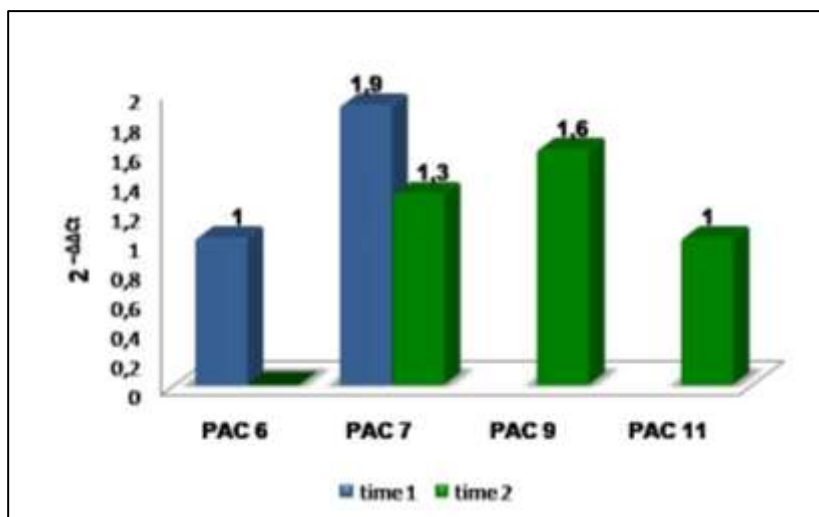
Os resultados obtidos para a região *CA-repeat* nas corridas Time1 e Time2 são indicados na Tabela 11. Os resultados de microssatélites já haviam mostrado a existência de dois alelos na região para os pacientes 6, 9 e 11; logo, estas PCRs em tempo real serviram para confirmar resultados, contribuindo para testar a confiabilidade dos dados apresentados.

Com relação ao paciente 7, no qual não foi possível a confirmação de deleção por microssatélites, as análises em PCR em tempo real mostraram, em duas corridas realizadas, que este paciente apresenta dois alelos em ambas, sendo homozigoto. A Figura 49 ilustra por meio de gráfico a condição dos pacientes.

**Tabela 11** - Resultados das análises da região *CA-repeat* baseados nas corridas realizadas em PCR em tempo real e as médias dos Cts de cada indivíduo.

P	Time1			Time2		
	Média $\pm$ dsv Leiden	Média $\pm$ dsv CA-repeat	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Média $\pm$ dsv Leiden	Média $\pm$ dsv CA-repeat	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
6	19,9 $\pm$ 0,7	21,5 $\pm$ 0,5	1,0	-	-	-
7	20,2 $\pm$ 0,2	20,8 $\pm$ 0,1	1,9	19,1 $\pm$ 0,1	20,3 $\pm$ 0,5	1,3
9	-	-	-	21,8 $\pm$ 0,3	22,9 $\pm$ 0,3	1,6
11	-	-	-	18,7 $\pm$ 0,6	20,4 $\pm$ 0,2	1,0

**P** = pacientes **MD** = média, **dsv** = desvio padrão,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  = resultados dos cálculos utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$ ,



**Figura 49** - Figura representando o gráfico dos valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  por paciente em cada uma das corridas realizadas para a região CA-repeat.

Embora a técnica de PCR empregada necessite de um rigoroso controle com relação à qualidade de reação, a qual pode ser influenciada por diversos fatores, com a utilização desta técnica em PCR em tempo real, podemos observar que foi possível a confirmação de quatro situações que poderiam gerar dúvidas quando se considera apenas o teste de microssatélites.

## 5.5 ANÁLISES DE MLPA

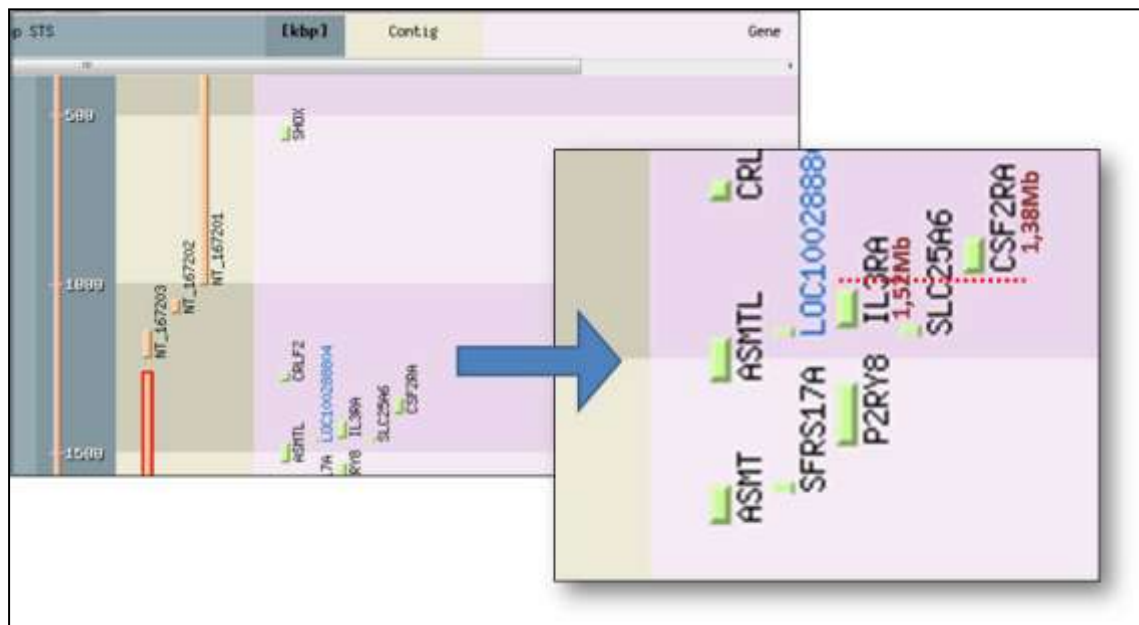
As análises por MLPA foram realizadas em todos os pacientes, como complemento das demais, porque isto proporcionou a investigação de regiões ainda não estudadas. A técnica também permite a análise de várias regiões simultaneamente, pois uma das possibilidades para as diferenças clínicas apresentadas pelos pacientes é a existência de pequenas deleções que não podem ser determinadas por técnicas clássicas.

Os dados brutos obtidos da técnica de MLPA normalizados em planilhas *Excel* geraram gráficos onde podem ser observadas as regiões de interesse. Os gráficos apresentados a seguir relacionam os resultados da análise para 21 sondas (7 nomeadas como éxon de 1 a 7; 12 como Xp22.32 de 01 a 12, uma nomeada como 5'UTR SHOX 4 kb before e uma como 1.4 spl. SHOX) e os valores das áreas relativas integradas dos picos.

Nos gráficos dos resultados, as alturas das barras correspondem proporcionalmente ao número de cópias das sequências das sondas encontradas no genoma. Alturas entre 0,7 e 1,3 equivalem a duas cópias, alturas superiores a 1,3 e alturas inferiores a 0,7 indicam aumento e redução ou ausência de cópias, respectivamente.

A seguir será apresentada a discussão referente aos resultados dos pacientes, utilizando-se as técnicas de MLPA. Com relação aos genes

*CSF2RA* e *IL3RA*, deve-se observar que estão muito próximos entre si, e a 750 kb de distância do gene *SHOX* (Figura 50). Um destes genes, ou ambos, algumas vezes, apresentam-se com medidas inferiores às esperadas em pacientes que acreditamos não possuem deleção da região do gene *SHOX*. Este fato pode estar ligado à presença de polimorfismos ainda não descritos, o que dificultaria o anelamento da sonda/primer do MLPA.



**Figura 50** – Esquema mostrando a proximidade do gene *SHOX* com a região dos genes *CSF2RA* e *IL3RA*. <http://howdy.ist.go.jp/HOWDYCL/CM/topCM.pl>

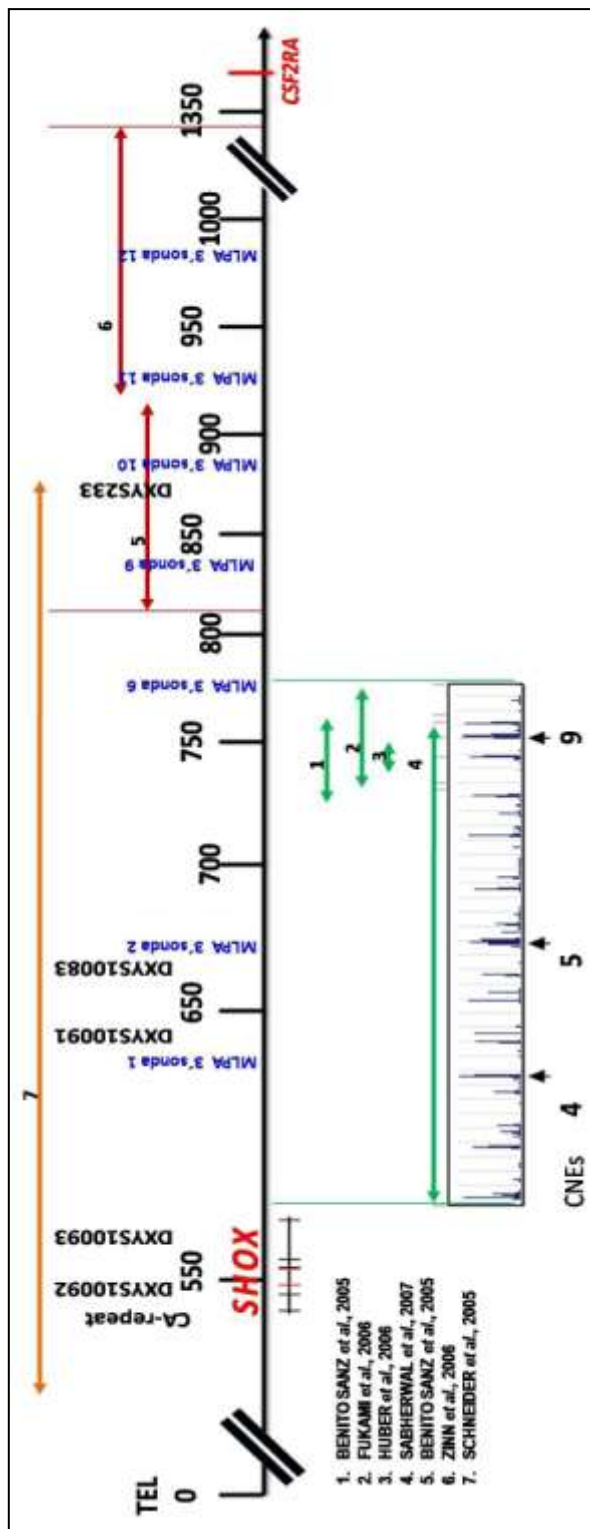
De acordo com GATTA *et al.*<sup>(105)</sup>, com o MLPA foi possível identificar duas regiões de deleções, uma delas mapeada entre o gene *SHOX* e o *CSF2RA*, já descrito anteriormente por SCHNEIDER *et al.*<sup>(38)</sup>, e um segundo ponto entre o gene *ASMT* e *OA1*, região indicada por ZINN *et al.*<sup>(28)</sup>. Estes resultados levariam a se pensar em uma possível deleção para a região nos



pacientes deste estudo, porém GATTA *et al.*<sup>(105)</sup> descreveu existir a deleção destas regiões acompanhadas da deleção do gene *SHOX*, diferente dos resultados aqui apresentados.

Em 2007, SABHERWAL *et al.*<sup>(90)</sup> publicaram estudo sobre pacientes com manifestação clínica de DLW, em que identificaram três regiões de elementos não codificadores altamente conservados evolutivamente (CNEs), os quais mostraram possuir atividade regulatória com relação ao gene *SHOX* no desenvolvimento dos membros. Logo, estes elementos conservados provavelmente possuem um papel de regulação tecido específico da expressão do gene *SHOX*, atuando como *enhancer*, o que explicaria a grande heterogeneidade fenotípica encontrada nos pacientes dos estudos até o momento.

Um resumo das descrições de regiões “downstream” ao gene, descritas como deletadas em pacientes com baixa estatura e/ou DLW, assim como a localização das sondas de MLPA e regiões de microssatélites são mostradas na Figura 51.



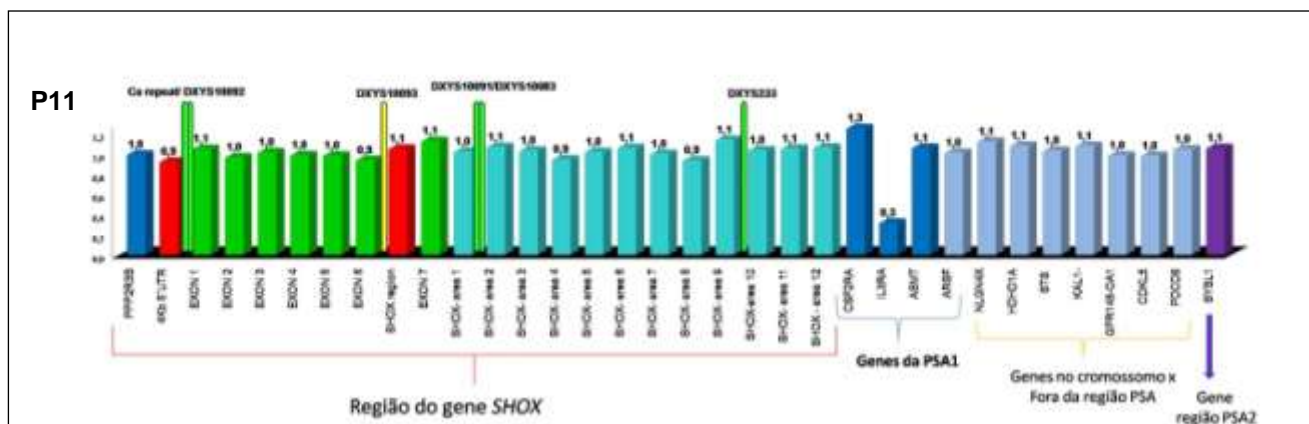
**Figura 51** - Esquema mostrando alguns locais das regiões investigadas neste estudo e os locais de deleção descritos até o momento de acordo com os autores indicados. Adaptado de SABHERWAL *et al.*<sup>(90)</sup>.

### 5.5.1 RESULTADOS DOS PACIENTES DESTE ESTUDO

A paciente 11 apresentou resultados com valores superiores a 0.7 para todas as regiões próximas ao gene, sugerindo a presença de ambos os alelos, tanto do gene *SHOX* como em regiões próximas a este (Figura 52).

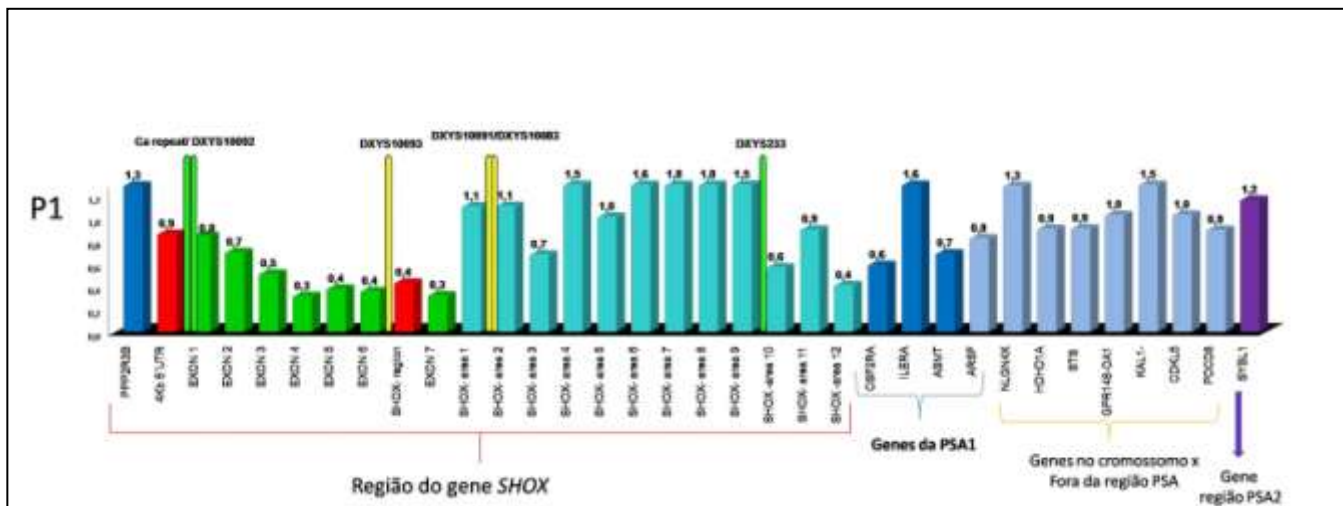
Foi observado um valor inferior a 0.7 no gene *IL3RA*, o que será posteriormente investigado para verificação de possível polimorfismo. Estes resultados confirmam as análises anteriores realizadas com microssatélites, assim como as análises em PCR em tempo real.

O paciente 11 apresentou uma mutação em heterozigose no éxon 1 localizada a 6520 pb antes do *start codon* (-6520G>A), na região 5'UTR. Em simulação *in silico* esta alteração parece não afetar a estrutura secundária do RNAm, entretanto estudos mais detalhados com relação a expressão devem ser realizados para verificação de interferência na produção da proteína.



**Figura 52** - Resultados da análise de MLPA dos pacientes 11. Os gráficos mostram não haver deleção do gene *SHOX* e da região próxima a este. A hemizigose do gene *ILERA* é observada. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela homozigose ou hemizigose não confirmada, e a vermelha, resultados de hemizigose confirmada.

A paciente 1 apresentou resultados de MLPA que sugerem a deleção parcial do gene *SHOX* e de parte da região “downstream” a este. Nas análises de microssatélite, a paciente apresentou heterozigose para a região *CA-repeat* e *DXYS10092* e *DXYS233*, e provável hemizigose que não pode ser confirmada na região *DXYS10093* por não ser possível uma comparação destas regiões com as dos pais; portanto, estas foram apresentadas como homo/hemizigose (Figura 53).

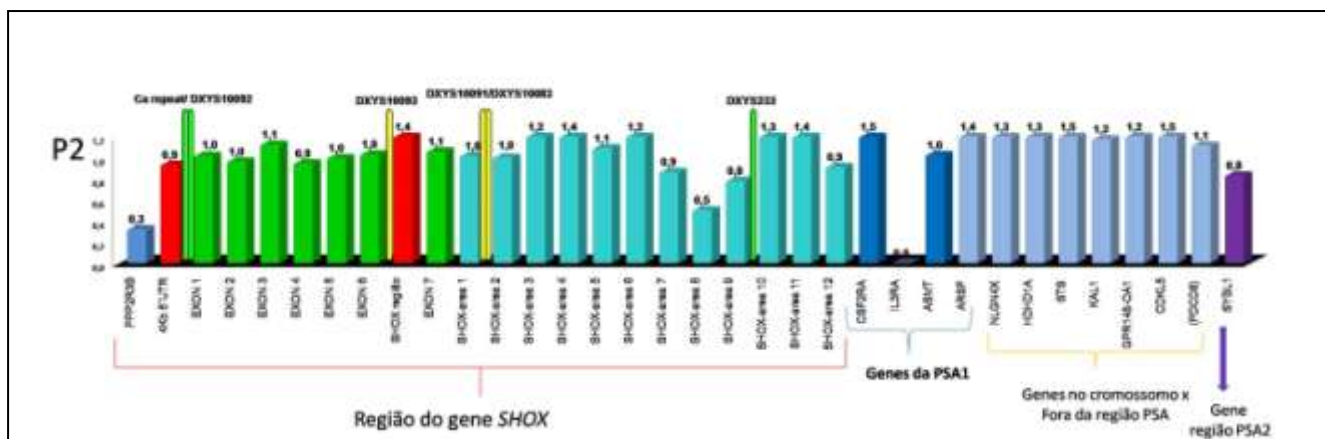


**Figura 53** - Resultado da análise de MLPA da paciente 1. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.

Esta paciente ainda apresentou a mutação IVS3+21G>A, em homo/hemizigose, o que reforça a ideia de deleção de um dos alelos do gene *SHOX*. A região “downstream” ao gene também mostrou valores inferiores a 0.7 para as sondas das regiões 10, 12 e do gene *CSF2RA*. Devido ao fato de o microssatélite DXYS233 estar em heterozigose, acredita-se que a região 10, por estar no limiar do valor e ser seguida de região 11 com valor superior a 0.7, deve conter duas cópias. As regiões que correspondem à sonda número 12 e ao gene *CSF2RA* são considerados pontos quentes de deleção por alguns autores<sup>(28,106)</sup>.

Os resultados de MLPA da paciente 2 não mostraram deleção do gene *SHOX* (Figura 54), o que confirma uma homozigose dos microssatélites apresentados anteriormente. Os genes *IL3RA* e *PPP2R3B* apresentaram valores inferiores a 0.7, sendo a região do gene *IL3RA* representada pelo valor zero. Como já mencionado, esta região pode apresentar um polimorfismo no paciente, o que será investigado posteriormente. A deleção das regiões dos gene *PPP2R3B* e *IL3RA* foi descrita previamente, porém estas apresentavam-se deletadas com o gene *SHOX*<sup>(106)</sup>. De acordo com os resultados de MLPA, a região que antecede o gene *SHOX* (sonda 5'UTR) não esta deletada.

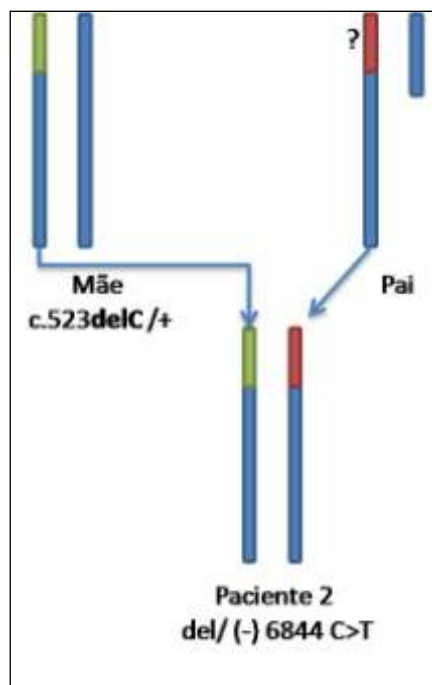
A região correspondente à sonda 8 também apresentou valor inferior a 0.7. Esta região se encontra próxima ao microssatélite DXYS10096, região de SNP *rs5946526*, proposta por BENITO-SANZ *et al.*<sup>(26)</sup> como região de deleção associada à DLW.



**Figura 54** – Resultado da análise de MLPA da paciente 2. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada

A paciente em questão também apresentou deleção de uma base no éxon 4 (c.523delC), o que leva à troca de um aminoácido Gln175Lisfs44x219 e formação precoce de um *stop codon*, sendo a proteína sintetizada parcialmente. Esta deleção também se manifestou na mãe da paciente que tem baixa estatura com alterações ósseas em menor proporção.

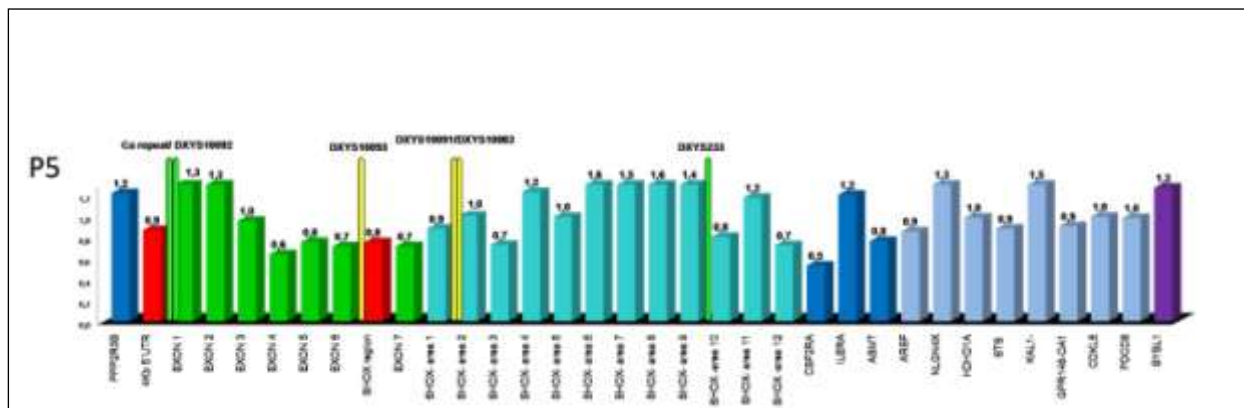
Encontramos também uma mutação no éxon 1 (-6844 C>T/ CT), a qual não foi investigada na mãe. A tentativa de se explicar um fenótipo diferenciado entre mãe e filha seria a presença de mutação *frameshift* em um dos alelos (alelo herdado da mãe) e deleção da região da sonda 8 e alteração no éxon 1 no alelo do outro cromossomo (Figura 55).



**Figura 55** - Esquema de segregação que pode ter ocorrido na paciente 2.

A paciente 5, em análise de MLPA, apresentou a região do gene *CSF2RA* com valor que sugere a deleção de um dos alelos. O gene *CSF2RA* localiza-se próximo à sonda 12, região descrita anteriormente como região de ponto quente de mutação, onde provavelmente existam *enhancers* que podem alterar o nível de expressão do gene. A região da sonda 12 não apresentou valor que indique deleção, porém o material utilizado para análise desta paciente não mostrou excelente qualidade, sendo possível a deleção desta região (Figura 56).

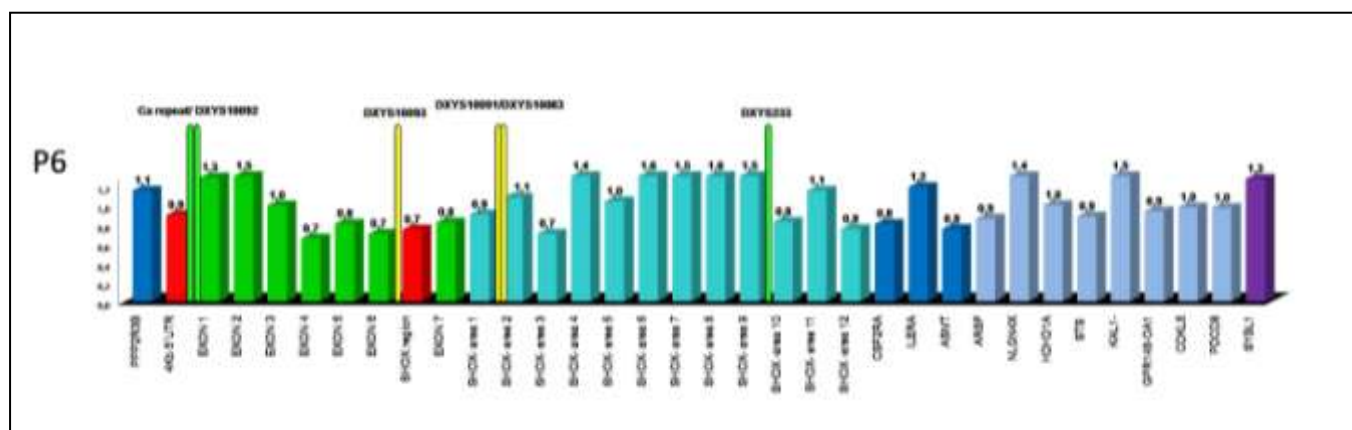
Este paciente também apresentou uma mutação que antecede o *start codon*, na região 5'UTR, podendo levar a uma alteração na estrutura secundária da IRES (conforme mostra predição da Figura 39), e provavelmente alterando a tradução da proteína.



**Figura 56** - Resultado da análise de MLPA da paciente 5. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas indicam os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.



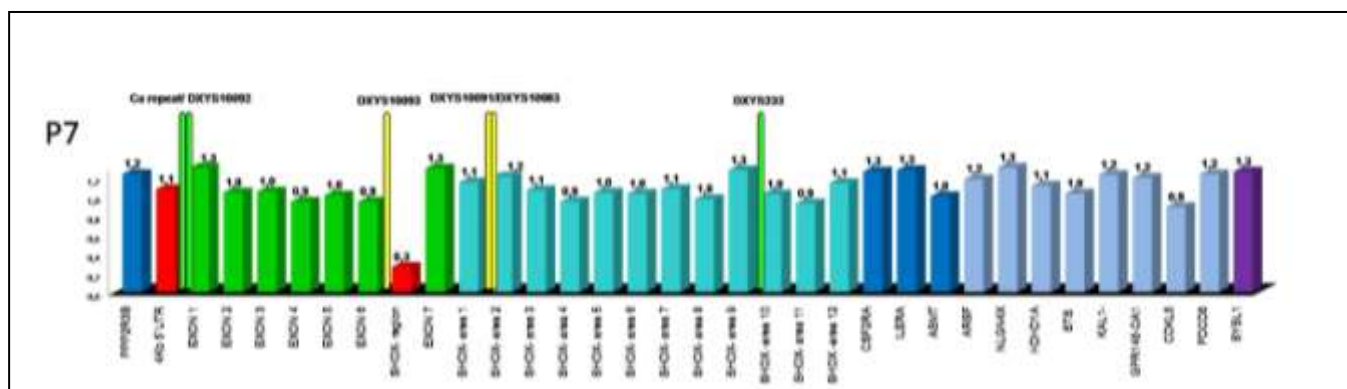
A paciente 6 não apresentou deleção do gene *SHOX* ou das regiões próximas a este (Figura 57). Nossos resultados indicam que as alterações encontradas foram as mutações nos éxons 1 e 3, (-) 6768 G>A/(GA) e c.439C>A Arg147Ser respectivamente, todas confirmadas na mãe da paciente, com características clínicas semelhantes às da filha.



**Figura 57** - Resultado da análise de MLPA da paciente 6. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.

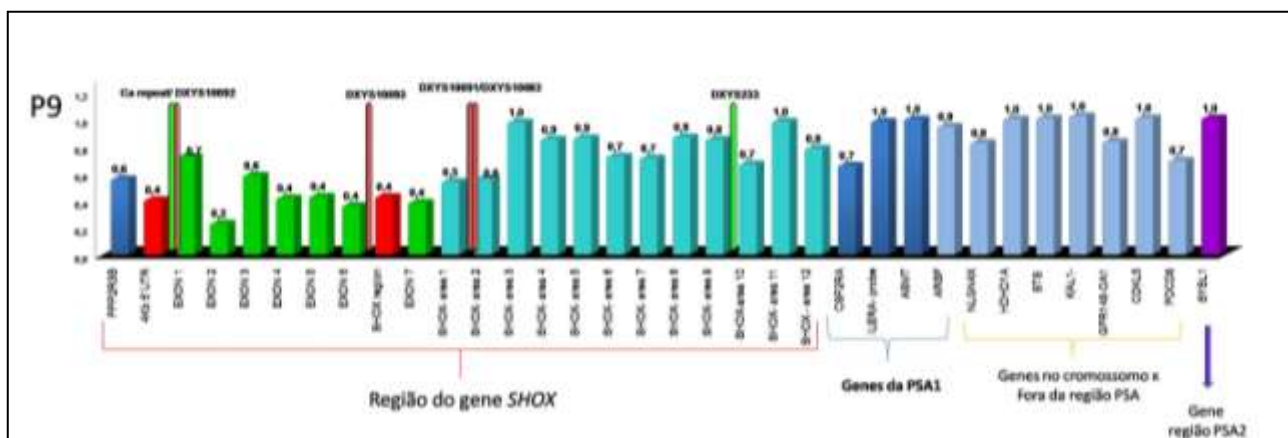
O paciente 7 apresentou resultados de MLPA indicando a deleção da região da sonda *SHOX* localizada entre os éxons 6 e 7 (Figura 58). Não foi encontrada nenhuma outra alteração no material estudado, concluindo-se que provavelmente a alteração é responsável pela característica clínica manifestada

O MLPA neste caso foi de grande utilidade, uma vez que não foi possível a análise de microssatélite da família por ser a mãe do paciente falecida.



**Figura 58** - Resultado da análise de MLPA da paciente 7. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.

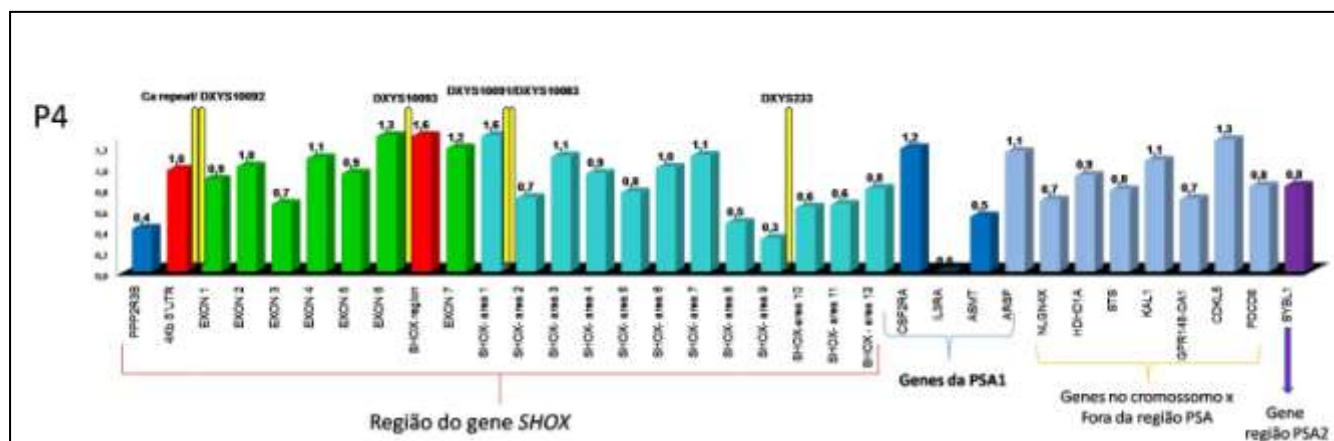
O paciente 9 apresentou deleção de um dos alelos do gene *SHOX* confirmados pelas análises de microssatélite, PCR em tempo real e de MLPA (Figura 59). O paciente também mostrou mutação no éxon 1 na região - 6520 G>A (AA) antecedente ao *start codon*, ainda não descrita na literatura, e que ocorre em homo/hemizigose, reforçando a ideia de hemizigose encontrada nas demais análises.



**Figura 59** - Resultado da análise de MLPA da paciente 9. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada, e o vermelho, regiões com hemizigose confirmada.

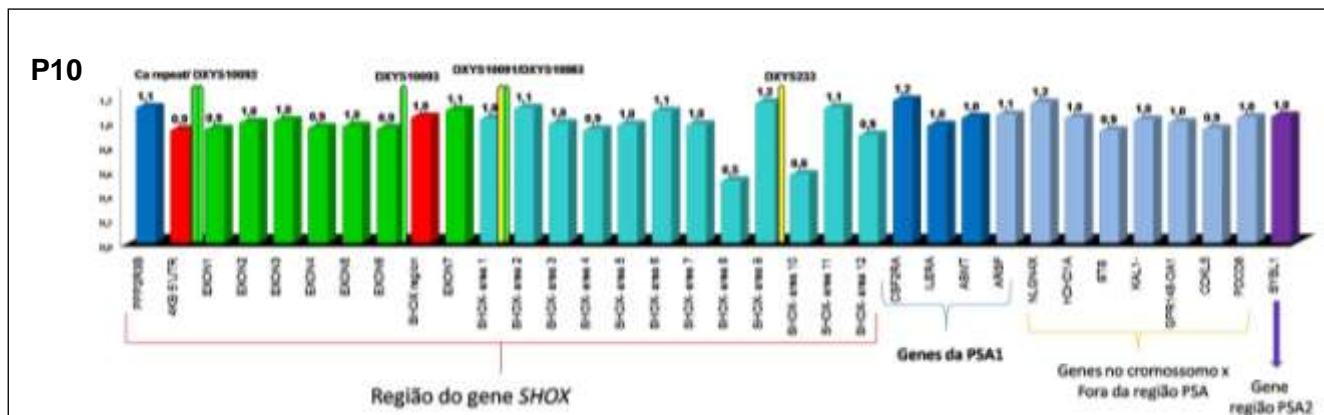
A paciente 4 apresentou um padrão de MLPA indicando a deleção das regiões do gene *PPP2R2B*, o que pode ocorrer devido a um polimorfismo como descrito anteriormente, e a deleção das regiões das sondas *SHOX* 8, 9, 10 e 11 de um dos alelos (Figura 60). Em análise de microssatélite, a paciente apresentou homo/hemizigose para todas as regiões estudadas. As análises de sequenciamento mostram que não foram encontradas mutações nos éxons estudados.

A deleção da região está de acordo com os estudos realizados por BENITO SANZ *et al.*<sup>(26)</sup> e ZINN *et al.*<sup>(28)</sup> que sugerem uma segunda região de ponto quente de deleção “downstream” ao gene.



**Figura 60** - Resultado da análise de MLPA da paciente 4. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.

Os resultados de MLPA da paciente 10 mostraram possível deleção das regiões das sondas 8 e 10, porém a sonda 9 não possui valor que determine deleção (Figura 61). Em busca realizada em sequências depositadas no *GeneBank* não foi encontrado nenhum polimorfismo descrito, o que poderia alterar a hibridização das sondas. Entretanto, devido à proximidade das regiões, supõe-se possível que o paciente apresente polimorfismo não descrito causador da não hibridização. O material do paciente será sequenciado para verificação desta suposição.



**Figura 61** - Resultado da análise de MLPA da paciente 10. Regiões com valores inferiores a 0.7 indicam deleção. As barras mais altas mostram os resultados das análises de microssatélites, sendo a cor verde correspondente a resultados de heterozigose, a amarela, homozigose ou hemizigose não confirmada.

*CAPITULO FINAL*

---

## 6 CAPITULO FINAL

Os resultados das análises moleculares deste trabalho permitiram a definição da etiologia genética de sete dos 11 pacientes. Dentre eles, quatro apresentavam deleção – de ambos os alelos (caso 8), de um dos alelos (casos 3 e 9) e da região *downstream* do gene (caso 4).

No caso de DML (8), a paciente é filha de casal consangüíneo, tendo ambos os pais baixa estatura. A paciente 4 apresentou deleção na região *downstream* do gene, achado este que vai ao encontro do que vem sendo descrito na literatura em relação à existência de região considerada “ponto quente” de deleção.

Outra paciente (caso 1) apresentou, além de deleção parcial do gene (éxons 3, 4, 5, 6 e 7), a mutação IVS3+21G>A, localizada numa região importante para o processo de *splicing*, sem que fosse possível definir se em homozigose ou hemizigose. Considerando que se trata de mutação nova e não há história de consanguinidade entre os pais, tudo indica tratar-se de hemizigose, com deleção parcial de um dos alelos do gene *SHOX*.

Mutações de ponto foram observadas em dois outros casos (2 e 6). Na paciente 2 a mutação de ponto é a deleção de uma citosina (c523delC), que leva à formação de um *stop codon* precoce, alterando a sequência e a estrutura da proteína. Nessa paciente, foram encontradas outras alterações: a deleção da região da sonda 8 detectada por meio do MLPA (800 kb), e

mutação de ponto na região não traduzida do éxon 1 (-6844C>T), que poderia alterar a eficiência da tradução. Na paciente 6, por sua vez, a mutação c439C>A leva a uma alteração da proteína na região de sítio de fosforilação potencialmente patogênica. Essa paciente apresenta também uma mutação na região do éxon 1 (-6768G>A), havendo sido ambas as mutações confirmadas na mãe do paciente, cujo quadro clínico é semelhante.

Outros quatro casos ainda permanecem indefinidos, sendo dois deles (7 e 10) com dúvidas em relação a deleção e outros dois (5 e 11) com relação a mutação da região 5'UTR.

O paciente 7 apresentou deleção da região da sonda *SHOX reg.* (entre os éxons 6 e 7) e a paciente 10 apresentou resultados compatíveis com a deleção das regiões referentes às sondas 8, 10 e 12. Essa última deleção, porém, precisaria ser confirmada, uma vez que as regiões subjacentes não se mostraram deletadas.

No que se refere às alterações observadas na região 5'UTR, a mutação -6599G>C (paciente 5), em homozigose ou hemizigose, localiza-se na região do éxon 1 que antecede o *start codon*. Considerando ser esta uma região de IRES, é possível que essa deleção leve à alteração da tradução do mRNA; existe relato de quadro clínico semelhante na família. O paciente 11, por sua vez, apresenta mutação -6520G>A em heterozigose no éxon 1, região também de IRES.



Na Tabela 13 estão resumidamente expostos todos os resultados obtidos neste trabalho.

**Tabela 13 – Resumo dos resultados apresentados neste trabalho. Em amarelo estão assinaladas as evidências de patogenicidade.**

P	Éxon 1		Outros Exons	Deleções
	MUT.	rs55872554 <u>Del T</u>		Microssatélites e MLPAs
1			IVS3+21G>A Int. splicing	Hemizigose DXYS10093, Éxon 3, 4, 5, 6 e 7 e SHOX-reg
2	(-)6844	CT12G3T3NT4NT3 CT12G2T4GT4AT3	c.523delC Gln175Lisfs44x219	Hemizigose SHOX área 8
3				Hemizigose Ca-repeat, DXYS10092, DXYS10093, DXYS10091, DXYS10083
4		NT15G2T4GT4AT3		Hemizigose SHOX área 8, 9, 10 e 11
5	(-)6599	CT10NNG6 CT14G2T4GT4AT3		
6*	(-) 6768	CT3GT11NG2T4GT4AT3 CT3GNT11G2T4GT4AT3	c.439C>A Arg147Ser	
7				Hemizigose SHOX reg.
8				Nulizigose Ca-repeat, DXYS10092, DXYS10093
9	(-) 6520	CT11NG2NT2NGT3N2T2N2G T2		Hemizigose DXYS10092, 10093, 10083 e 10091
10				Hemizigose SHOX área 8, 10 e 12
11	(-) 6520	T12G2N4T4NT3N2T3 N2T12G2T4GT4AT3CG2T3		

\*MES = mesomelia; MAD = madelung

Baseado nos resultados obtidos propõe-se que a investigação genética deva ser minuciosa tanto para as análises de detecção de deleção do gene e da região “downstream” e “upstream” ao mesmo, como também que seja realizado o seqüenciamento do gene e de sua região 5´UTR.

A proposta de um protocolo possível realização para investigação do gene *SHOX* é que as análises tenham inicio com a verificação de deleções, através da técnica de MLPA, devido à grande porcentagem de deleções descritas na literatura e devido à abrangência das regiões possíveis de serem analisadas com esta técnica, e prossigam com o seqüenciamento do gene e da região 5´UTR.

## *CONCLUSÕES*

---

## 7 CONCLUSÕES

A investigação do gene *SHOX* de 10 pacientes com DLW e um paciente com DML por meio de análises de microssatélites, PCR em tempo real, análise de MLPA e sequenciamento direto permitiu confirmar a etiologia genética do quadro apresentado por sete pacientes.

Quatro dos sete pacientes com resultados confirmados apresentavam deleção total ou parcial de um ou ambos os alelos e outros três apresentavam mutações de ponto ainda não descritas na literatura.

Outros quatro pacientes apresentaram alterações de patogenicidade ainda indefinida.

Os resultados mostram a grande heterogeneidade genética associada à DLW e indicam a necessidade de que a realização da investigação molecular nesses casos seja ampla, permitindo um diagnóstico molecular mais preciso.

*REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA*

---

- 1 KANT SG, WIT JM, BREUNING MH. Genetic analysis of short stature. *Horm Res.* 2003, 60:157-165.
- 2 MARMO DB, MORCILLO AM. Baixa estatura: Aspectos gerais, avaliação diagnóstica e terapêutica. *Cadernos do CIPED.* 1999, 1:1-8.
- 3 JORGE AA, SOUZA SC, NISHI MY, BILLERBECK AE, LIBÓRIO DC, KIM CA, et al. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007, 66(1):130-135.
- 4 JORGE AA, NISHI MY, FUNARI MF, SOUZA SC, ARNHOLD IJ, MENDONÇA BB. Short stature caused by SHOX gene haploinsufficiency: from diagnosis to treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008, 52(5):765-773.
- 5 MARCHINI A, HÄCKER B, MARTTILA T, HESSE V, EMONS J, WEISS S, et al. BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet.* 2007, 15(24):3081-3087.
- 6 RAPPOLD G, BLUM WF, SHAVRIKOVA EP, CROWE BJ, ROETH R, QUIGLEY CA, et al. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet.* 2007, 44(5):306-313.
- 7 ROUYER F. A gradient of sex-linkage in the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Nature.* 1986, 319:291-295.
- 8 MOHANDAS TK, SPEED RM, PASSAGE MB, YEN PH, CHANDLEY AC, SHAPIRO LJ. Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *Am J Hum Genet.* 1992, 51(3):526-533.

- 9 ROSS MT, GRAFHAM DV, COFFEY AJ, SCHERER S, MCLAY K, MUZNY D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 2005, 434:325-337.
- 10 ELLISON JW, WADAK Z, YONG MF, ROBEY PG, LAIG-WEBSTER M, CHIONG W. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet*. 1997, 6(8):1341-1347.
- 11 RAO E, WEISS B, FUKAMI M, MERTZ A, MEDER J, OGATA T, et al. FISH-deletion mapping defines a 270-kb short stature critical interval in the pseudoautosomal region PAR1 on human Sex chromosomes. *Hum Genet*. 1997, 100:236-239.
- 12 RAO E, WEISS B, FUKAMI M, RUMP A, NIESLER B, MERTZ A, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet*. 1997, 16:54-63.
- 13 ROUBICEK M, ARRIAZU MC, ISAAC G. SHOX Deficiency Phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88(8):4001–4004.
- 14 SHEARS DJ, VASSAL HJ, GOODMAN FR, PALMER RW, REARDON W, SUPERTI-FURGA A, et al. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat. Genet*. 1998, 19:70-72.
- 15 RAPPOLD GA, FUKAMI M, NIESLER B, SCHILLER S, ZUMKELLER W, BETTENDORF M, et al. Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002, 87(3):1402-1406.



- 16 BINDER G, RANKE MB, MARTIN DD. Auxology is a valuable instrument for the clinical diagnosis of SHOX haploinsufficiency in school-age children with unexplained short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88(10):4891-4896.
- 17 JONES KL. Langer Mesomelic Dysplasia. In: \_\_\_\_\_. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation.* 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1997b, p. 442-443.
- 18 BINDER G, SCHWARZ CP, RANKE MB. Identification of short stature caused by SHOX defects and therapeutic effect of recombinant human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85(1):245-249.
- 19 HUBER C, CUSIN V, LE MERRER M, MATHIEU M, SULMONT V, DAGNOEAU M, et al. SHOX point mutations in dyschondrosteosis. *J Mol Genet.* 2001, 38:323.
- 20 CORMIER-DAIRE V, HUBER C, MUNNICH A. Allelic and nonallelic heterogeneity in Dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Am J Med Genet.* 2001, 106:272-274.
- 21 GRIGELIONIENE G, SCHOUMANS J, NEUMEYER L, IVARSSON A, EKLOF O, ENKVIST O, et al. Analysis of short stature homeobox-containing gene (SHOX) and auxological phenotype in dyschondrosteosis and isolated Madelung deformity. *Hum Genet.* 2001, 109(5):551-558.
- 22 ROSS JL, SCOTT JR C, MARTTILA P, KOWALL K, NASS A, PAPPENHAUSEN P, et al. Phenotypes associated with SHOX deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86:5674-5680.
- 23 ZINN AR, WEI F, ZHANG L, ELDER FF, SCOTT CI Jr, MARTTILA P, et al. Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet.* 2002, 110(2):158-163.

- 24 MORIZIO E, STUPPIA L, GATTA V, FANTASIA D, GUANCIALI FP, SCARANO, GRMM, et al. Deletion of the SHOX gene in patients with short stature of unknown cause. *Am J Med Genet A*. 2003, 119(3):293-296.
- 25 MUNNS CF, GLASS IA, LABROM R, HAYES M, FLANAGAN S, BERRY M, HYLAND VJ, BATCH JA, PHILIPS GE, VICKERS D. Histopathological analysis of Leri-Weill dyschondrosteosis: disordered growth plate. *Hand Surg*. 2001 Jul;6(1):13-23.
- 26 BENITO-SANZ S, THOMAS ST, HUBER C, GORBENKO del BLANCO D, AZA-CARMONA M, CROLLA JA, et al. A Novel Class of Pseudoautosomal Region1 Deletions Downstream of Shox Is Associated with Léri-Weill Dyscondrosteosis. *Am J Hum Genet*. 2005, 77:533-544.
- 27 FUKAMI M, KATO F, TAJIMA T, YOKOYA S, OGATA T. Transactivation Functional of an~800pb Evolutionarily Conserved Sequence at the SHOX 3'Region: Implication for the Downstream Enhancer. *Am J Hum Genet*. 2006, 78:167–170.
- 28 ZINN AR, RAMOS P, ROSS J. A Second Recombination Hotspot Associated with SHOX Deletions. *Am J Hum Genet*. 2006, 78:523-525.
- 29 RAO E, BLASCHKE RJ, MARCHINI A, NIESLER B, BURNETT M, RAPPOLD GA. The Léri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet*. 2001, 10:3083-3091.
- 30 CLEMENT-JONES M, SCHILLER S, RAO E, BLASCHKE RJ, ZUNIGA Z R, ROBSON SC, et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet*. 2000, 9(5):695-702.

- 31 MARCHINI A, MARTTLA T, WINTER A, CALDEIRA A, MALANCHI I, BLASCHKE RJ, et al. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *Am Society Biochemistry and molecular Biology*. 2004, 279(35):37103-37114.
- 32 MUNNS CJF, HAASE HR, CROWTHER LM, HAYES MT, BLASCHKE R, RAPPOLD G, et al. Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J. Clinical Endocrinology*. 2004, 89(8):4130-4135.
- 33 ROSENFELD RG. A SHOX to the system. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, 86:5672-5673.
- 34 BLASCHKE RJ, TOPFER C, MARCHINI A, STEINBEISSER H, JANSSEN JW, RAPPOLD GA. Transcriptional and translational regulation of the Léri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J Biol Chem*. 2003, 278:47820-47826.
- 35 SCHILLER S, SPRANGER S, SCHECHINGER B, FUKAMI M, MERKER S, DROP SL, et al. Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Leri-Weill syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2000, 8:54-62.
- 36 FALCINELLI C, LUGHETT L, PERCESEPE A. SHOX point mutations and deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Med Genet*. 2002, 39:E 33.
- 37 FLANAGAN SF, MUNNS CF, HAYES M, WILLIAMS B, BERRY M, VICKERS D, et al. Prevalence of mutations in the short stature homeobox containing gene (SHOX) in Madelung deformity of childhood. *J Med Genet*. 2002, 39(10):758-763.

- 38 SCHNEIDER KU, SABHERWAL N, JANTZ K, RÖTH R, MUNCKE N, CUTLER GBJR, et al. Identification of Major Recombinant Hotspot in Patients with Short Stature and SHOX Deficiency. *Am J Hum Genet.* 2005, 77:89-96.
- 39 BENITO-SANZ S, DEL BLANCO DG, AZA-CARMONA M, MAGANO LF, LAPUNZINA P, ARGENTE J, et al. PAR1 Deletion Downstream of SHOX Are the Most Frequent Defect in a Spanish of Léri-Weill Dyschondrosteosis (LWD) Probands. *Human Mutation Mutation in Brief.* 2006a, 927:1-6,
- 40 GEHRING WJ, QIAN YQ, BILLETER M, FURUKUBO-TOKUNAGA K, SCHIER AF, RESENDEZ-PEREZ D, et al. Homeodomain-DNA recognition. Review. *Cell.* 1994, 78(2):211-223.
- 41 BONCINELLI E. Homeobox genes and disease. Review. *Curr Opin Genet Dev.* 1997, 7 (3):331-337.
- 42 WILSON DS, GUENTHER B, DESPLAN C, KURIYAN J. High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA. *Cell.* 1995, 82(5):709-719.
- 43 SABHERWAL N, SCHNEIDER KU, BLASCHKE RJ, MARCHINI A, RAPPOLD G. Impairment of SHOX nuclear localization as cause for Léri-Weill syndrome. *J Cell Science.* 2004, 117:3041-3048.
- 44 SCHNEIDER KU, MARCHINI A, SABHERWAL N, RÖTH R, NIESLER B, MARTTILA T, BLASCHKE RJ, LAWSON M, DUMIC M, RAPPOLD G. Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Léri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mut.* 2005, 26(1):44-52.

- 45 MARCHINI A, DAEFFLER L, MARTTILA T, SCHNEIDER KU, BLASCHKE RJ, SCHNÖLZER M, et al. Phosphorylation on Ser106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein. *J Mol Biol.* 2006, 355(3):590-603.
- 46 BINDER G, RENZ A, MARTINEZ A, KESELMAN A, HESSE V, RIELD SW, et al. SHOX Haploinsufficiency and Leri-Weill Dyschondrosteosis: Prevalence and growth Failure in Relation to mutation, sex, and degree of wrist deformity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89(9):4403-4408.
- 47 BLASCHKE RJ, MONOGHAN AP, SCHILLER S, SCHECHINGER B, RAO E, PADILHA-NASH H, et al. SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1998, 95:2406-2411.
- 48 COBRINIK DA, WHYTE P, PEEPER DS, JACKS T, WEINBERG RA. Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev.* 1993, 7(12A):2392-2404.
- 49 JOHNSON DG. Regulation of E2F-1 gene expression by p130 (Rb2) and D-type cyclin kinase activity. *Oncogene.* 1995, 11(9):1685-1692.
- 50 WOLF DA, HERMEKING H, ALBERT T, HERZINGER T, KIND P, EICK D. A complex between E2F and the pRb-related protein p130 is specifically targeted by the simian virus 40 large T antigen during cell transformation. *Oncogene.* 1995, 10:2067-2078.
- 51 IKEDA MA, JAKOI L, NEVINS JR. A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93(8):3215-3220.

- 52 SMITH EJ, LEONE G, DEGREGORI J, JAKOI L, NEVINS JR. The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol Cell Biol.* 1996, 16(12):6965-6976.
- 53 GARRIDA J, LIMÓN A, MAYOL X, RANE SG, ALBRECHT JH, REDDY EP, et al. Diferencial regulation of the retinoblastoma family of proteins during cell proliferation and differentiation. *Biochem. J.* 1998, 333:645-654.
- 54 MARCHINI A, RAPPOLD G, SCHNEIDER KU. SHOX at a glance: from gene to protein. Review. *Arch Physiol Biochem.* 2007, 113(3):116-123.
- 55 RAPPOLD G. SHOX: a geneticist's view. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87(4):1911-1912.
- 56 OGATA T, MATSUO N, NISHIMURA G. SHOX haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status. *J Med Genet.* 2001, 38(1):1-6.
- 57 MAY CA, KALAYDJIEVA L, SAJANTILA A, JEFFREYS AJ. Crossover clustering and rapid decay of linkage disequilibrium in the Xp/Yp pseudoautosomal gene SHOX. *Nat Genet.* 2002, 31:272-275.
- 58 MÜSEBECK J, MOHNIKE K, BEYE P, TÖNNIES H, NEITZEL H, SCHNABEL D, et al. Short stature homeobox-containing gene deletion screening by fluorescence in situ hybridization in patients with short stature. *Eur J Pediatr.* 2001, 160:561-565.
- 59 FUKAMI M, OKUYAMA T, YAMAMORI S, NISHIMURA G, OGATA T. Microdeletion in the SHOX 30 region associated with skeletal phenotypes of langer mesomelic dysplasia in a 45,X/4,X,r(X) infant and Leri-Weill dyschondrosteosis in her 46,XX mother: implication for the SHOX enhancer. *American Journal of Medical Genetics.* 2005, 137A:72-76.

- 60 LÉRI A, WEILL J. Une affection congénitale et symétrique du développement osseux: la dyscondrosteose. Bull Mem Sc Med Hop. 1929, 53:1491.
- 61 JONES KL. Leri-Weill Dyschondrosteosis. In: \_\_\_\_\_. Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1997a, p. 440-441.
- 62 BENITO-SANZ S, DEL BLANCO DG, HUBER C, THOMAS S, AZA-CARMONA B D, MALONEY V, et al. Characterization of SHOX Deletions in Léri-Weill Dyschondrosteosis (LWD) Reveals Genetic Heterogeneity and No Recombination Hotspots. Am J Hum Genet. 2006b, 79:409-414.
- 63 BIEGANSKI T, CORMIER-DAIRE VBK, NOWICKI GH, KOZLOWSKI K. Severe, atypical form of dyschondrosteosis (report of two cases). Eur J Pediatr. 2005, 164:539-543.
- 64 OGATA T, MUROYA K, SASAKI G, NISHIMURA G, KITO H, HATTORI T. SHOX Nullizygosity and haploinsufficiency in a Japanese Family: Implication for the Development of Turner Skeletal Features. J Clin Endocrinol Metab. 2002, 87 (3):1390-1394.
- 65 THOMAS NS, MALONEY V, BASS P, MULIK V, WELLESLEY D, CASTLE B. SHOX mutations in a family and a fetus with Langer mesomelic dwarfism. Am J Med Genet A. 2004, 128(2):179-184.
- 66 CAMPOS-BARROS A, BENITO-SANZ S, ROSS JL, ZINN AR, HEATH K E. Compound heterozygosity of SHOX-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). American Journal of Medical Genetics Part A. 2007, 143A:933-938.

- 67 SAENGER P. Clinical Review 48: the current status of diagnosis and therapeutic intervention in Turner's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 77:297-301.
- 68 LIPPE B. Turner syndrome. In: SPERLING MA. (Ed). *Pediatric Endocrinology.* Filadélfia: W.B. Saunders Company. 1996, p. 387-422.
- 69 RANKE MB, PFLUGER H, ROSENDAHL W, STUBBE P, ENDERS H, BIERICH JR, et al. Turner syndrome: Spontaneous growth in 150 cases and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 1983, 141:81-88.
- 70 PAYNTER M. Madelung deformity. *Emerg Nurse.* 2005, 13(8):20-21.
- 71 FERGUSSON-SMITH MA. Genotype-phenotype correlations in the Turner syndrome. In: HIBI, I. & TAKANO, K. (Eds.) - *Basic and clinical approach to Turner syndrome,* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 1993, P.17-25.
- 72 ZINN AR, PAGE DC. Turner syndrome and the Y chromosome. In: HIBI I, TAKANO K. *Basic and clinical approach to Turner syndrome.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1993, p. 49-55.
- 73 OGATA T, MATSUO N. Sex chromosome aberrations and stature: deduction of the principal factors involved in the determination of adult height. *Hum Genet.* 1993, 91:551-62.
- 74 SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS TE. *Molecular cloning: laboratory manual.* 2ª ed. Nova York: Col Spring Harbor NY. 1998.
- 75 CORMIER-DAIRE V, BELIN V, CUSIN V, VIOT G, GIRLICH D, TOUTAN A, et al. SHOX gene mutations and deletions in dyschondrosteosis or Leri-Weill syndrome. *Acta Paediatr.* 1999, Suppl 433:55-59.



- 76 MORNET E, BOUE J, RAUX-DEMARY M, COUILLIN P, OURY JF, DUMEZ Y, et al. First trimester prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by linkage analysis to HLA-DNA probes and by 17-hydroxyprogesterone determination. *Hum Genet.* 1986, 73(4):358-364.
- 77 GINZINGER D. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology.* 2002, 30(6):503-512.
- 78 NOVAIS CM, PIRES-ALVES M, SILVA FF. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia & Desenvolvimento.* 2004, 1(33):10-13.
- 79 APPLIED BIOSYSTEMS. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. [on line] 2004 [Acesso em 10 de abr. de 2008]. Disponível em: URL <http://www3.appliedbiosystems.com/sup/gl/search.htm>
- 80 LARIONOV A, KRAUSE A, MILLER W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 2005, 6:62.
- 81 DORAK MT. Real-Time PCR (Advanced Methods Series). [on line]. Oxford: Taylor & Francis. 2006. [Acesso em 20 de dez. de 2007]. Disponível em: URL <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>
- 82 APPLIED BIOSYSTEMS. Applied Biosystems: quantifier kits. [on line]. São Paulo, 2006. [Acesso em 15 de dez. de 2008]. Disponível em: URL <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/7j2orxf7.pdf>
- 83 LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 2001, 25:402–408.

- 84 WEKSBERG R, HUGHES S, MOLDOVAN L, BASSETT AS, CHOW EW, SQUIRE JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics*. 2005, 6:180.
- 85 MOODY A, SELLERS S, BUMSTEAD N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR. *J Virol Methods*. 2000, 85:55–64.
- 86 BARBARO, M., Mechanisms in disorders of sex development. [tese de doutorado]Estocolmo: Centro de Medicina Molecular, Instituto Hospital Karolinska, 2008.
- 87 EZQUIETA B, CUEVA E, OLIVER A, GARCIA R. SHOX Intragenic Microsatellite Análisis in Patients with Short Stature. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. 2002, 15:139-148.
- 88 BERTORELLI R, CAPONE L, AMBROSETTI F, GARAVELLI L, VARRIALE L, MAZZA V, STANGHELLINI I, PERCESEPE A, FORABOSCO A. The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin Genet*. 2007,72(5):490-1.
- 89 ROBERTSON SP, SHEARS Dj, OEI P, WHINTER RM, SCAMBLER Pj, AFTIMOS S, et al. Homozygous deletion of SHOX in a mentally retarded male whith Langer mesomelic dysplasia. *J Med Genet*. 2000, 39:959-964.
- 90 SABHERWAL N, BANGS F, RÖTH R, WEISS B, JANTZ K, TIECKE E, HINKEL GK, SPAICH C, HAUFFA BP, VAN DER KAMP H, KAPPELLER J, TICKLE C, RAPPOLD G. Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet*. 2007 16(2):210-22.

- 91 GRIGELIONIENE G, EKLOF O, IVARSSON SA, WESTPHAL O, NEUMEYER L, KEDRA D, et al. Mutations in short stature homeobox containing gene (SHOX) in dyschondrosteosis but not in hypochondroplasia. *Hum Genet.* 2000, 107:145-149.
- 92 FUKAMI M, DATEKI S, KATO F, HASEGAWA Y, MOCHIZUKI H, HORIKAWA R, OGATA T. Identification and characterization of cryptic SHOX intragenic deletions in three Japanese patients with Léri-Weill dyschondrosteosis. *J Hum Genet.* 2008, 53(5):454-459.
- 93 FUNARI MF, JORGE AA, PINTO EM, ARNHOLD IJ, MENDONÇA BB, NISHI MY. Cryptic intragenic deletion of the SHOX gene in a family with Léri-Weill dyschondrosteosis detected by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008, 52(8):1382-1387.
- 94 ROSS JL, KOWAL K, QUIGLEY CA, BLUM WF, CUTLER GB JR, CROWE B, et al. The phenotype of short stature homeobox gene (SHOX) deficiency in childhood: contrasting children with Léri-Weill dyschondrosteosis and Turner syndrome. *J Pediatr.* 2005, 147(4):499-507.
- 95 HONDA M, RIJNBRAND R, ABELL G, KIM D, LEMON SM. Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol.* 1999, 73(6):4941-51
- 96 WEGRZYN JL, DRUDGE TM, VALAFAR F, HOOK V. Bioinformatic analyses of mammalian 5'-UTR sequence properties of mRNAs predicts alternative translation initiation sites. *BMC Bioinformatics.* 2008, 8(9):232.
- 97 FERNÁNDEZ-MIRAGALL O, MARTÍNEZ-SALAS E. Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA.* 2003, 9(11):1333-44.

- 98 JANG SK. Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis c virus. *Virus Res.* 2006,119(1):2-15.
- 99 MARTÍNEZ-SALAS E, LÓPEZ DE QUINTO S, RAMOS R, FERNÁNDEZ-MIRAGALL O IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie.* 2002, 84(8):755-63
- 100 MARTÍNEZ-SALAS E, SÁIZ JC, DÁVILA M, BELSHAM GJ, DOMINGO E. A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol.* 1993, 67(7):3748-55
- 101 PELLETIER J, FLYNN ME, KAPLAN G, RACANIELLO V, SONENBERG N. Mutational analysis of upstream AUG codons of poliovirus RNA. *J Virol.* 1988, 62(12):4486-92
- 102 ZHANG J, YAMADA O, ITO T, AKIYAMA M, HASHIMOTO Y, YOSHIDA H, MAKINO R, MASAGO A, A single nucleotide insertion in the 5'-untranslated region of hepatitis C virus leads to enhanced cap-independent translation. Uemura H, Araki H. *Virology.* 1999, 1;261(2):263-70
- 103 BIÈCHE I, OLIVI M, CHAMPÈME MH, VIDAUD D, LIDEREAU R, VIDAUD M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *Int J Cancer.* 1998, 78(5):661-6.
- 104 KÖNIGSHOFF M, WILHELM J, BOHLE RM, PINGOUD A, HAHN M. HER-2/neu gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. *Clin Chem.* 2003,49(2):219-29.

- 105 GATTA V, ANTONUCCI I, MORIZIO E, PALKA C, FISCHETTO R, MOKINI V, TUMINI S, CALABRESE G, STUPPIA L. Identification and characterization of different SHOX gene deletions in patients with Leri–Weill dyschondrosteosys by MLPA assay. J Hum Genet. 2006, DOI 10.1007/s10038-006-0074-5
- 106 CHEN J, WILDHARDT G, ZHONG Z, RÖTH R, WEISS B, STEINBERGER D, DECKER J, BLUM WF, RAPPOLD G. Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. J Med Genet. 2009, 46(12):834-9.

*ANEXOS*

---



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**PARECER Nº 939/2001**

**Registro CONEP = 2614** ( Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto )

**Protocolo CEP = 072/2001**

**Processo nº 25000.071666/2001-62**

**Projeto de Pesquisa:** "Análise do gene *shox* ( *Short stature homeobox-containing gene* ) em individuais com baixa estatura associada ou não a anomalias esqueléticas sugestivas da síndrome de Leri-Weill "

**Pesquisador Responsável:** Dra. Renata Lima Trematore

**Instituição:** UNICAMP

**Área Temática Especial :** Genética Humana

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

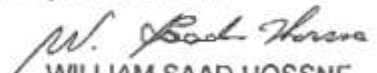
a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Situação :** Projeto aprovado.

Brasília, 23 de agosto de 2001.

  
WILLIAM SAAD HOSSNE  
Coordenador da CONEP-MS



Short Communication

## An illustrative case of Léri-Weill dyschondrosteosis

Renata de Lima<sup>1,2</sup>, Cristina Forti Iamada<sup>3</sup>, Luciana Oliveira Silva<sup>3</sup>, Maricilda Palandi de Mello<sup>1</sup>  
 and Andréa Trevas Maciel-Guerra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.*

<sup>2</sup>*Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.*

<sup>3</sup>*Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.*

### Abstract

We report on a girl presenting Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) due to deletion of the *SHOX* gene. Her family included individuals with short stature alone or with both short stature and mesomelia or Madelung's deformity. The deletion was demonstrated through detection of hemizygosity for microsatellite markers SHOX-CA repeat, DXYS10092, DXYS10093 and DXYS10091 localized around the *SHOX* gene, with retention of paternal alleles in the proband and three of her sisters who had short stature as the only clinical feature. Hemizygosity for these loci was also observed in their mother, who had short stature too. The deletion in the proband was however larger, including locus DXY10083. The proband's only sister with normal height did not carry the deletion. Family history suggests transmission of the deletion from the proband's maternal great-grandfather to her grandfather via the Y chromosome, and from the grandfather to the proband's mother via the X chromosome after crossing-over in the pseudoautosomal region proximal to the *SHOX* gene.

**Key words:** Léri-Weill dyschondrosteosis, Madelung's deformity, pseudoautosomal dominant inheritance, short stature, *SHOX* gene.

Received: August 10, 2007; Accepted: July 4, 2008.

Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD, MIM 127300) is a syndrome characterized by mesomelic dwarfism, Madelung deformity of the wrist, and other skeletal malformations. The Madelung deformity is an ulnar and dorsal curvature of the distal radius due to deficient growth of the volar and ulnar aspect of the distal radius physis, increased inclination of the distal radius joint surface, triangulation of the carpus with proximal and volar migration of the lunate, and a prominent dorsal subluxation of the ulnar head (Henry and Thorburn, 1967). Recently, Zebala *et al.* (2007) described two subgroups of individuals with Madelung's deformity, one with extreme short stature and mesomelia consistent with LWD, and the other with severe involvement of the entire radius, limited range of motion of the extremity, markedly bowed appearance to the forearm, and conspicuous radiographic deformity of the forearm and distal radius.

Haploinsufficiency of the *SHOX* gene, which maps to the pseudoautosomal regions Xp22 and Yp11.3, was originally reported to be responsible for the short stature pheno-

type in Turner syndrome and also for some cases of idiopathic growth retardation (Ellison *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997). An association between *SHOX* mutations and mesomelia, short stature and Madelung's deformity in LWS was demonstrated, broadening the phenotypic scope of *SHOX* mutations (Belin *et al.*, 1998; Shears *et al.*, 1998). The *SHOX* gene escapes X-inactivation, being expressed on both sex chromosomes of males and females (Rao *et al.*, 1997). In early human embryos, it is expressed in the developing limbs (particularly elbow, knee, distal ulna/radius and wrist) as well as in the first and second pharyngeal arches, and plays an important role in bone growth and development (Clement-Jones *et al.*, 2000).

The *SHOX* gene has six exons and is transcribed into two alternatively spliced mRNAs, SHOXa and SHOXb, which give rise to two proteins with different expression characteristics (Rao *et al.*, 1997). Complete gene deletions account for the majority of *SHOX* gene mutations (Rappold *et al.*, 2002), as a consequence of the presence of tandem or interspersed repeats in the pseudoautosomal region, PAR 1, which enhance the occurrence of unequal crossing-over between homologous chromosomes and intrachromosomal recombinations (Lien *et al.* 2000, Filatov and Gerrard

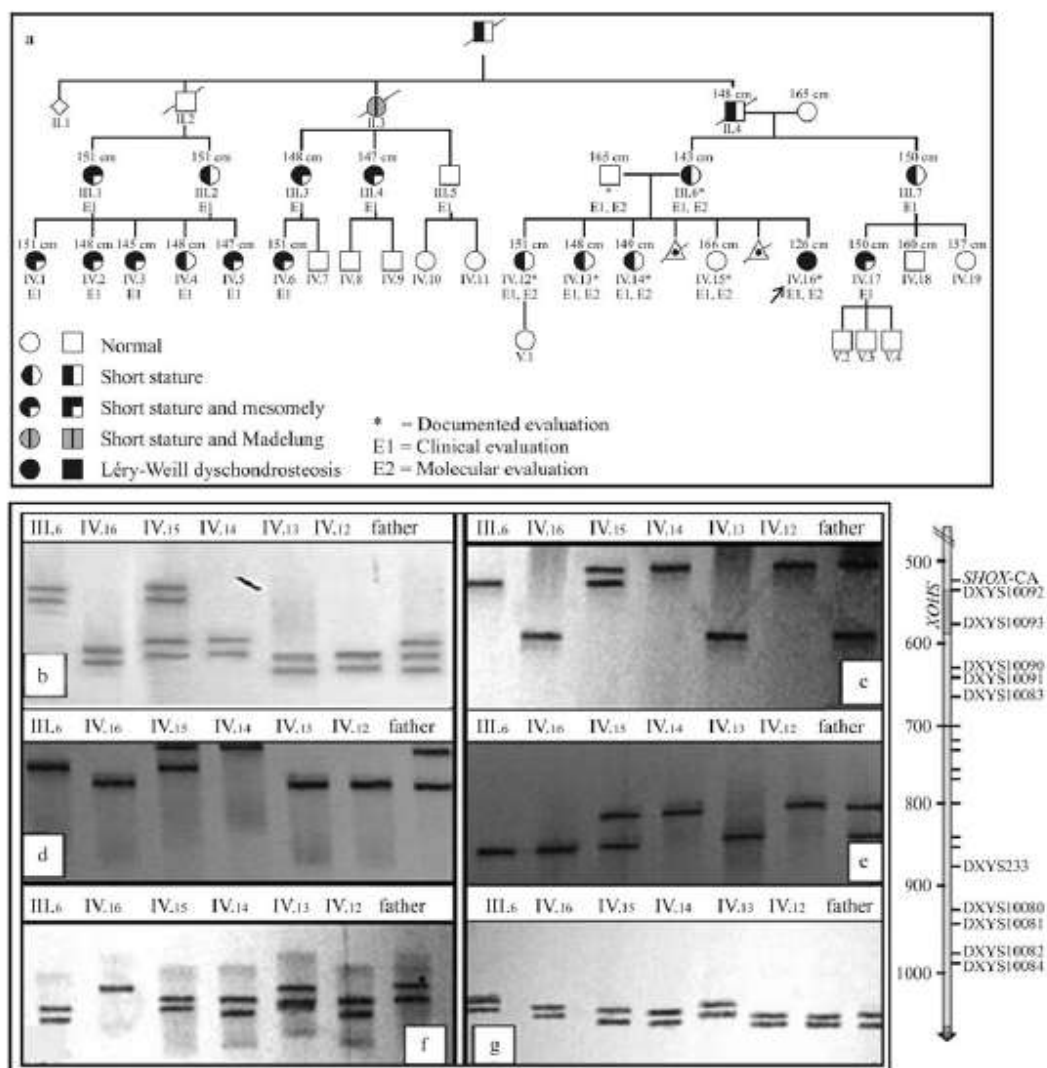
Send correspondence to Renata de Lima, Laboratório de Genética Humana, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6010, 3083-970 Campinas, SP, Brazil. E-mail: renata.lima@uniso.br.



2003). Two major recombination hotspots were described in cases of haploinsufficiency of the *SHOX* gene due to crossing-over in the proximal PAR1 during male meiosis (Schneider et al., 2005; Zimm et al., 2006), although Benito-Sanz et al. (2006b) detected a high level of genetic heterogeneity of *SHOX* deletions. LWD due to deletions that did not include the *SHOX* gene has been recently demonstrated (Benito-Sanz et al., 2005; 2006a). The finding of these pseudoautosomal region deletions mapping downstream of *SHOX* involved in the etiopathogenesis of LWD

suggests distal regulatory elements of *SHOX* transcription or another region/locus involved in skeletal development (Fukami et al., 2006).

We report here on a four-generation family, with 37 members, among whom 20 individuals presented with one or more clinical features of *SHOX* haploinsufficiency (Figure 1a). Ten individuals had short stature (I.1, II.4, III.2, III.6, III.7, IV.4, IV.6, IV.12, IV.13, IV.14), eight presented short stature and mesomelia of forearms (III.1, III.3, III.4, IV.1, IV.2, IV.3, IV.5, IV.17), one had short stature and



**Figure 1 -** (a) Genealogy of the proband; phenotypic features of members of the family not personally examined were informed by the proband's mother; (b-e) genotyping results of the *SHOX*-CA repeat (b), DXYS10092 (c), DXYS10093 (d) and DXYS10091 (e): the proband IV.16 and her sisters IV.12, IV.13 and IV.14 carry only the paternal allele in these loci; their mother (III.6) has one allele that is also present in her normal child IV.15; (f) locus DXYS10083i is deleted only in the proband IV.16; (g) locus DXYS233 is not deleted in the family.

Madelung's deformity (II.3), and the proposita (IV.16) had clinical characteristics compatible with LWD. Information regarding short stature in a relative was taken into account if body height was below the third percentile for chronological age. The study was approved by the institutional Ethics Committee (Process 81 n. 939/2001).

The proband, an 11-year-old girl, was referred to us due to short stature, mesomelia and Madelung's deformity. She was born at term by cesarean section, with a birth weight of 3,600 g and length of 45 cm. She was the youngest daughter in a sibship of five girls born to non-consanguineous parents; her mother had two miscarriages. Both the mother and three of the proband's sisters presented short stature (Figure 1a). According to the mother, the maternal great-grandfather and grandfather had severe short stature, and other members of her family had short stature and Madelung's deformity or mesomelia (recorded in the genealogy depicted on Figure 1a). The proband had a normal 46,XX karyotype.

We performed molecular analyses in the proband, her parents and her four sisters (Figure 1b-g). Genomic DNA was extracted from blood lymphocytes using standard techniques. The *SHOX-CA* repeat, a highly polymorphic microsatellite located immediately distal to *SHOX* (Fukami *et al.*, 2006), was amplified by PCR. We also genotyped DXYS10092 and DXYS10093, which map, respectively, to the 5' and 3' *SHOX* flanking regions, and the DXYS10091, DXYS10083 and DXYS233 microsatellites located 30-250 kb downstream of *SHOX*. All primer sequences and PCR conditions were those described by Benito-Sanz *et al.* (2005).

The proband and three of her sisters had only paternal alleles at the *SHOX-CA* repeat (Figure 1b), loci DXYS10093 (Figure 1c), DXYS10092 (Figure 1d) and DXYS10091 (Figure 1e); their mother also had a single allele in these loci, indicating deletion of one *SHOX* allele. The proband presented an additional deletion including the DXYS10083 locus (Figure 1f), which was not present in her mother or sisters. Heterozygosity for the microsatellite DXYS233 (Figure 1g) was observed in the proband, her mother and sisters. The proband's sister (IV.15) which did not have short stature or other clinical features did not carry the *SHOX* gene deletion.

In this family, the short stature, reported for the maternal great-grandfather and grandfather, is associated to the *SHOX* deletion in their descendents, thus suggesting the transmission of a deleted *SHOX* allele through four generations. The proband's maternal great-grandfather is assumed to have transmitted the deletion to her grandfather. The occurrence of an X-Y crossing-over proximal to *SHOX* would have transferred the *SHOX* deletion to the X-chromosome inherited by the proband's mother, who in turn transmitted it to four out of her five daughters. These features simulate an autosomal dominant pattern of inheritance, and, in fact,

LWD was until recently considered to have this mechanism of inheritance.

In the family reported here, the deletion of approximately 200 kb involving the *SHOX* gene is similar to those found in other patients with LWD (Rappold *et al.*, 2007; Jorge *et al.*, 2007). The proband, however, presented an additional deletion including the DXYS10083 locus, which was not present in her mother or sisters. Although the DXYS10083 deletion has been already described in European individuals with LWD (Benito-Sanz *et al.*, 2006b), in the context of the present family, the deletion of this locus may explain the more severe phenotype of the proband.

### Acknowledgments

This study was supported by FAPESP (01/06989-7). We thank Mrs. Maria Madalena Vasconcelos Rosa for technical support.

### References

- Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A and Cormier-Daire V (1998) *SHOX* mutations in dyschondrosteosis (Léri-Weill syndrome). *Nat Genet* 19:67-69.
- Benito-Sanz S, del Blanco DG, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, Argente J, Campos-Barros A and Heath KE (2006a) PAR1 deletions downstream of *SHOX* are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum Mutat* 27:1062.
- Benito-Sanz S, del Blanco DG, Huber C, Thomas NS, Aza-Carmona M, Bunyan B, Maloney V, Argente J, Cormier-Daire V, Campos-Barros A, *et al.* (2006b) Characterization of *SHOX* deletions in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet* 79:409-412.
- Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Rappold G, Argente J, Campos-Barros A, *et al.* (2005) A novel class of pseudoautosomal region 1 deletions downstream of *SHOX* is associated with Léri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 77:533-544.
- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, *et al.* (2000) The short stature homeobox gene *SHOX* is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 9:695-702.
- Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M and Chiong W (1997) *PHOG*, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 6:1341-1347.
- Filatov DA and Gerrard DT (2003) High mutation rates in human and ape pseudoautosomal genes. *Gene* 317:67-77.
- Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S and Ogata T (2006) Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the *SHOX* 3' region: Implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet* 78:167-170.
- Henry A and Thorburn MJ (1967) Madelung's deformity. A clinical and cytogenetic study. *J Bone Joint Surg* 49B:66-73.

- Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Liborio DC, Kim CA, Amhold IJ and Mendonca BB (2007) *SHOX* mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: Frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol* 66:130-135.
- Lien S, Szyda J, Schechinger B, Rappold G and Amheim N (2000). Evidence for heterogeneity in recombination in the human pseudoautosomal region: High resolution analysis by sperm typing and radiation-hybrid mapping. *Am J Hum Genet* 66:557-566.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, *et al.* (1997) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16:54-63.
- Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL and Niesler B (2007) Genotypes and phenotypes in children with short stature: Clinical indicators of *SHOX* haploinsufficiency. *J Med Genet* 44:306-313.
- Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zunkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadopoulou E, Reinhr T, Onigata K, *et al.* (2002) Deletions of the homeobox gene *SHOX* (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1402-1406.
- Schneider KU, Sabherwal N, Jantz K, Röth R, Muncke N, Blum WF, Cutler GB Jr and Rappold G (2005) Identification of major recombinant hotspot in patients with short stature and *SHOX* deficiency. *Am J Hum Genet* 77:89-96.
- Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, Scambler PJ and Winter RM (1998) Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Léri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 19:70-72.
- Zebala LP, Manske PR and Goldfarb CA (2007) Madelung's deformity: A spectrum of presentation. *The J Hand Surg* 32A:1393-1401.
- Zinn AR, Ramos P and Ross J (2006) A second recombination hotspot associated with *SHOX* deletions. *Am J Hum Genet* 78:523-525.

### Internet Resources

- Leri-Weill dyschondrosteosis; LWD (MIM 127300), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=127300> (April 10, 2007).

*Associate Editor: Paulo A. Otto*

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.