MARIANA FERREIRA DE ASSIS FUNARI

**Identificação de deleções do gene *SHOX* :
comparação das técnicas de FISH, análise de
microssatélites e MLPA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Endocrinologia
Orientadora: Dra. Mirian Yumie Nishi

São Paulo

2009

MARIANA FERREIRA DE ASSIS FUNARI

**Identificação de deleções do gene *SHOX* :
comparação das técnicas de FISH, análise de
microssatélites e MLPA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Endocrinologia
Orientadora: Dra. Mirian Yumie Nishi

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Funari, Mariana Ferreira de Assis

Identificação de deleções do gene *SHOX* : comparação das técnicas de FISH, análise de microssatélites e MLPA / Mariana Ferreira de Assis Funari. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Mirian Yumie Nishi.

Descritores: 1.Estatura 2.Discondrosteose de Léri-Weill 3.Hibridização *in situ* fluorescente 4.Repetições de microssatélites 5.*SHOX* 6.Estudo comparativo

USP/FM/SBD-274/09

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a execução deste trabalho, em especial:

A Dra. Berenice por ter me acolhido neste laboratório e pela oportunidade de fazer essa pós-graduação;

A Mirian pela orientação, por toda a ajuda, pelas soluções para as dificuldades experimentais e pelo incentivo nos momentos menos favoráveis;

Ao Alex pela seleção dos pacientes, pela ajuda nos cálculos, pelos conselhos e, principalmente, pela injeção de ânimo a cada conversa;

Aos colegas do laboratório, médicos e pós-graduandos, pela companhia, pelas conversas e boas risadas;

A todos os funcionários que tornaram o meu trabalho menos complicado, principalmente a Cris, pelas lâminas e alíquotas; a Cidinha, a Ana e a Nilda pela ajuda com a burocracia e a Fran pelas ponteiras, tubos e todo o carinho;

Aos meus pais pelo incentivo constante e por toda ajuda que sempre me deram;

Ao meu irmão pelos momentos de descontração e por todas as consultorias em inglês;

E ao Rodrigo pela companhia, dedicação e toda compreensão nos momentos mais difíceis.

Sumário

Lista de símbolos e abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Distúrbios do crescimento e baixa estatura	2
1.2. O gene <i>SHOX</i>	4
1.3. Fenótipos associados às alterações do <i>SHOX</i>	8
1.4. Detecção das alterações do <i>SHOX</i>	14
2. OBJETIVOS.....	19
3. MÉTODOS.....	21
3.1. Casuística.....	22
3.1.1. Critérios de seleção dos pacientes.....	22
3.1.2. Grupo de indivíduos controle.....	23
3.2. Avaliação clínica e laboratorial	24
3.3. Avaliação citogenética molecular	25
3.3.1. Hibridação “in situ” com fluorescência (FISH)	25
3.3.1.1. Elaboração das lâminas	26
3.3.1.2. Preparação da sonda	27
3.3.1.3. Hibridação	29
3.3.1.4. Lavagem e marcação com fluorocromo	30
3.3.1.5. Amplificação do sinal.....	31
3.4. Avaliação molecular	32

3.4.1. Extração do DNA a partir de sangue periférico	32
3.4.2. Análise de microssatélites	33
3.4.3. Estudo do grau de heterozigose do microssatélite DYS290....	35
3.4.4. Análise por PCR em tempo real da região dos marcadores DXYS10096 e DXYS234	37
3.4.5. “Multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA).....	39
3.5. Análise comparativa entre as metodologias	41
3.6. Seqüenciamento direto.....	41
3.6.1. Estudo da variante alélica NM_000451:c.1236 -10T>C por enzima de restrição	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Deleções do <i>SHOX</i>	47
4.2. Casos discordantes	56
4.3. Comparação entre as metodologias	59
4.4. Mutações de ponto do <i>SHOX</i>	61
5. DISCUSSÃO	65
5.1. Frequência das alterações do <i>SHOX</i>	66
5.2. Comparação entre as metodologias.....	70
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE.....	85

Lista de símbolos e abreviaturas

ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BED	baixa estatura desproporcionada
BEI	baixa estatura idiopática
BNP	peptídeo natriurético cerebral
BSA	albumina bovina
cm	centímetro
cM	centimorgan
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorídrico
DLW	discondrosteose de Léri-Weill
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatado
dUTP	desoxiuridina trifosfatada
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
FAM	isômero de carboxifluoresceína
FISH	hibridação “in situ” com fluorêscencia
FSH	hormônio folículo - estimulante
GH	hormônio do crescimento
IC	idade cronológica
IgA	imunoglobulina A
IGF1	fatores de crescimento insulinosímiles
IGFBP3	proteína ligante 3 dos IGF
kb	kilobase
KCl	cloreto de potássio
LH	hormônio luteinizante
λ	lambda

Lista de símbolos e abreviaturas (continuação)

M	molar
Mb	megabases
mL	mililitro
MLPA	“multiplex ligation-dependent probe amplification”
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
µg	micrograma
µL	microlito
µM	micromolar
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	carbonato de amônio
nm	nanômetro
<i>NCP1</i>	“Niemann-Pick C1 protein precursor gene”
pb	pares de bases
PAR1	região pseudoautosômica 1
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBT	tampão com PBS, BSA 0,12% e Tween 20 0,1%
PCR	reação de polimerização em cadeia
<i>PHOG</i>	“pseudoautosomal homeobox containing osteogenic gene”
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNP	polimorfismo de um único nucleotídeo
SSC	tampão com 300 mM cloreto de sódio e 30 mM citrato de sódio
<i>SHOX</i>	gene “short stature homeobox containing gene”

Lista de símbolos e abreviaturas (continuação)

TAE	tampão tris - acetato com EDTA
TE	tampão tris com EDTA
TrisHCl	tampão trisHCl
TSH	hormônio tireoestimulante
T4	tiroxina
U	unidade
UTR	região não traduzida
Xp	braço curto do cromossomo X
Yp	braço curto do cromossomo Y
Z	escore de desvio padrão
Z AS/AT	escore de desvio padrão da altura sentada/altura total corrigido para idade e sexo

Resumo

Funari MFA. *Identificação de deleções do gene SHOX*: comparação das técnicas de FISH, análise de microssatélites e MLPA [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 84p.

O gene *SHOX* (“short stature homeobox containing gene”), expresso em altos níveis nas células osteogênicas, é fundamental para o desenvolvimento ósseo e para a determinação da altura. Haploinsuficiência do *SHOX* é responsável por vários fenótipos que envolvem a baixa estatura, como a síndrome de Turner, a discondrosteose de Léri-Weill e a baixa estatura idiopática. Cerca de dois terços das haploinsuficiências são causados por deleções. Neste trabalho, foi realizada uma comparação entre três técnicas para detecção de deleções do *SHOX*: a hibridação “in situ” com fluorescência (FISH), o estudo de microssatélites e o “multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA). Nos pacientes sem deleção do *SHOX*, foi realizado um rastreamento para identificação de mutações de ponto no gene que levassem à sua haploinsuficiência. Foram analisados seis pacientes com discondrosteose de Léri-Weill (DLW) e 20 com baixa estatura desproporcionada (BED). Na técnica de FISH, os cromossomos metafásicos obtidos a partir de cultura de linfócitos foram hibridados com o cosmídio LLNOYCO3”M”34F5. DNA genômico extraído a partir de leucócitos de sangue periférico foi submetido à análise de microssatélites e MLPA. Foram amplificados seis marcadores de microssatélites (repetições CA, DYS290, DXYS10093, DXYS10096, DXYS233 e DXYS234) e o MLPA foi realizado de acordo com as instruções dos “kits” SALSA MLPA P018-C1 e P018-D1 *SHOX*. Estes “kits” contêm oito sondas específicas para o gene *SHOX* e 13 para a “área do *SHOX*”, localizada a jusante do gene. O seqüenciamento direto da região codificadora do gene foi realizado nos pacientes sem deleção. Todos os pacientes com DLW apresentaram deleções envolvendo todo o gene. Entre os pacientes com BED, apenas um (5,0%) apresentou uma deleção intragênica envolvendo os exons 4, 5 e 6a. Os resultados das três metodologias foram concordantes na maioria dos casos, exceto em dois casos. No primeiro caso, inicialmente o FISH não identificou uma deleção envolvendo todos os éxons em um paciente com DLW. No segundo, uma deleção envolvendo os exons 4, 5 e 6a, identificada em uma paciente com BED, foi detectada apenas pelo MLPA. Ainda entre os pacientes com BED, três (15%) apresentaram deleção da região do marcador DXYS10096, a 3’ do gene. Outros três (15%) pacientes apresentaram mutações de ponto identificadas pelo seqüenciamento direto: a mutação p.Tyr35X, que resulta na substituição de uma tirosina por um

códon de parada prematuro; a p.Arg147His localizada na região do homeodomínio e a NM_000451:c.1236 -10T>C que se encontra a 10 nucleotídeos antes do início do éxon 5. Em uma comparação das três metodologias, o FISH foi considerado a técnica mais trabalhosa e com menor sensibilidade, levando até oito dias para sua realização. A análise por microssatélites requer o estudo dos progenitores, além de um grande número de marcadores para a análise de regiões extensas. O MLPA detectou todas as deleções, sendo considerada a metodologia mais sensível. Ele apresentou também menor custo e tempo de execução, além de possibilitar a estimativa do tamanho da deleção. Desta forma, o MLPA foi considerado a melhor metodologia para investigação inicial dos pacientes com DLW e BED.

Descritores: 1.Estatura 2.Discondrosteose de Léri-Weill 3.Hibridização *in situ* fluorescente 4.Repetições de microssatélites 5.SHOX 6.Estudo comparativo

Summary

Funari MFA. *Identification of SHOX gene deletions: comparison of FISH technique, microsatellites analysis and MLPA* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 84p.

The *SHOX* gene (short stature homeobox containing gene), expressed at high levels in osteogenic cells, is essential for bone development and growth process. *SHOX* haploinsufficiency is responsible for several phenotypes involving short stature, such as Turner syndrome, Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature. Deletions are responsible for 2/3 of *SHOX* haploinsufficiency. In this study, a comparison among three techniques for detection of *SHOX* deletions: fluorescence in situ hybridization (FISH), microsatellites analysis and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was performed. A screening for point mutations that could lead to haploinsufficiency was performed in patients without *SHOX* deletion. Six patients with Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and 20 with disproportionate short stature (DSS) were analyzed. FISH analysis was performed using the cosmid LLNOYCO3"M"34F5 and metaphase spreads obtained from lymphocytes culture. Genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes was used to microsatellite and MLPA analysis. Six microsatellite markers (CA repeats, DYS290, DXYS10093, DXYS10096, DXYS233 and DXYS234) were amplified by PCR and MLPA was performed according to the manufacturer's instructions for SALSA MLPA P018 and P018-C1-D1 *SHOX* kits. These kits contain 8 specific probes for *SHOX* gene and 13 for "*SHOX* area", which is located downstream of the gene. The direct sequencing of entire encoding region was performed in patients with no *SHOX* deletions. All patients with LWD presented deletions involving the entire gene. One (5.0%) patient with DSS, presented an intragenic deletion involving exons 4, 5 and 6a. The results of the three methods were concordant in most cases, except in two cases. In the first case, a patient with DLW, the FISH did not identify a deletion involving all *SHOX* exons. In the second case, a deletion of exons 4, 5 and 6a in a patient with BED was identified only by MLPA. Other 3 (15%) DSS patients had deletion in *SHOX* area, in the DXYS10096 marker. Other three (15%) patients presented a point mutation identified by direct sequencing: p.Tyr35X, which replaces a tyrosine for a premature stop codon, p.Arg147His located in the homeodomain region and NM_000451: c.1236-10T> C which is 10 nucleotides before the exon 5. In a comparison of three methods, the FISH technique was considered the more laborious and less sensitive, taking

until eight days to obtain the results. The microsatellite analysis requires the parents' DNA study. In addition, several markers are essential for the analysis of extensive regions. The MLPA was considered the most sensitive methodology since it detected all deletions. It also presented lower cost and execution time, and allowed the estimation of the size of the deletion. Thus, the MLPA was considered the best approach for initial investigation of LWD and DSS patients.

Descriptors: 1.Body Height 2.Leri-Weill Dyschondrosteosis 3.In Situ Hybridization, Fluorescence 4.Microsatellite Repeats 5.*SHOX*
6.Comparative Study

INTRODUÇÃO

1.1. Distúrbios do crescimento e baixa estatura

A baixa estatura é um achado muito comum na prática clínica e as causas que a determinam são bastante variadas, uma vez que o crescimento é influenciado por uma série de fatores.

Entre as causas primárias da diminuição do crescimento estão as displasias esqueléticas, o retardo do crescimento intra-uterino e as anormalidades cromossômicas responsáveis, por exemplo, pela síndrome de Down e a síndrome de Turner. A desnutrição, as doenças infecto-contagiosas na infância e as doenças crônicas, assim como as causas endócrinas, que incluem a deficiência de hormônio do crescimento, o hipotireoidismo, a síndrome de Cushing e o pseudo-hipoparatiroidismo, podem ser citadas como causas secundárias (1). Ainda assim, grande parte dos indivíduos com déficit de crescimento permanece sem diagnóstico e é incluída em um grupo de baixa estatura idiopática (BEI).

Estudos genéticos e moleculares de mulheres portadoras de baixa estatura resultaram na identificação de alterações cromossômicas possivelmente envolvidas no crescimento, no desenvolvimento ósseo e na determinação da altura. Um dos primeiros estudos realizados em 1961 analisou um grupo de mulheres com amenorréia primária e verificou que as pacientes com deleção do braço curto do cromossomo X eram baixas, enquanto uma paciente com deleção apenas do braço longo apresentava estatura normal (2).

Em 1982, Goldman e colaboradores analisando aspectos clínicos e alterações citogenéticas em pacientes com síndrome de Turner, também encontraram uma correlação entre as deleções do braço curto do cromossomo X e a baixa estatura (3).

Estes trabalhos sugerem que genes localizados no braço curto desse cromossomo desempenham importante papel na determinação da altura dessas pacientes. Esses prováveis genes relacionados ao crescimento certamente não sofrem inativação e possuem um alelo no cromossomo Y (4). Eles estão localizados na região pseudoautossômica 1 (PAR1) dos cromossomos sexuais, uma região de aproximadamente 2,6 Mb situada na porção distal do braço curto desses cromossomos (Xp e Yp) (Figura 1). Durante a meiose masculina, os cromossomos X e Y pareiam-se através dessas regiões homólogas e foi demonstrada recombinação gênica entre elas através do mecanismo de “crossing over” (5, 6). O trabalho de Filatov e Gerrard demonstrou que a taxa de recombinação na PAR1 é muito maior do que no resto do genoma humano (7). Por esse motivo, a probabilidade de acontecerem mutações nessa região também é maior.

Estudos posteriores, que analisaram indivíduos com diferentes alterações estruturais nos cromossomos sexuais, ajudaram na localização desses possíveis genes (8-10). Os indivíduos com deleções nos 750 kb distais da PAR1 eram baixos, enquanto aqueles com deleções em outras regiões da própria PAR1 apresentavam estatura normal. Com base nesses dados, essa região, que compreende os 750 kb distais da PAR1 dos cromossomos sexuais, foi definida como uma região de influência crítica

sobre a estatura. Em 1997, um novo gene foi descrito neste intervalo por dois grupos independentes.

Figura 1: Representação esquemática dos cromossomos sexuais com a localização das duas regiões pseudoautossômicas: PAR1 e PAR2 (11).

1.2. O gene *SHOX*

Rao e colaboradores, a partir de estudos de mapeamento cromossômico de indivíduos com monossomia parcial da PAR1, restringiram a área crítica para a altura a um seguimento de apenas 170 kb e identificaram nesta região um novo gene, que foi denominado *SHOX* (“short stature homeobox containing gene”) (12). Esse gene encontrava-se alterado em um indivíduo com baixa estatura.

Neste mesmo ano, Ellison e colaboradores, estudando células de trabéculas ósseas, caracterizaram um gene neste intervalo crítico para altura, cujo nível de expressão era maior nas células osteogênicas e que, por esse motivo, foi denominado *PHOG* (“pseudoautosomal homeobox

containing osteogenic gene”) (13). Na realidade, tratava-se do mesmo gene descrito por Rao e colaboradores.

Esse gene, recém descoberto, reconhecido como *SHOX*, se expressa em altos níveis nas células osteogênicas e fibroblastos da medula óssea, e em concentrações menores em músculo esquelético, coração, fígado e pâncreas (13, 14). Durante o período embrionário, esta expressão se restringe aos membros e arcos faríngeos, podendo ser detectada nos condrócitos de embriões humanos a partir da 12^a semana de gestação (14). Esses achados sustentam a idéia de que o gene é essencial para o desenvolvimento ósseo.

O *SHOX* ocupa uma região de aproximadamente 40 kb dentro da PAR1 e apresenta sete éxons (12, 13) (Figura 2). O éxon 1, constituído por 262 pb, não é traduzido. O éxon 2 possui 708 pb e sua porção 5' também não é traduzida. Os éxons 3 e 4 possuem 209 pb e 58 pb, respectivamente. O éxon 5 possui 89 pb. Os éxons 6a e 6b são constituídos, respectivamente, por 1166 pb e 625 pb, e ambos apresentam uma grande região não traduzida (12, 13).

O *SHOX* faz parte de uma família de genes, relacionados ao desenvolvimento, que atuam como reguladores transcricionais por apresentarem um “homeobox” (12). Esse “homeobox”, contido nos éxons 3 e 4, codifica um homeodomínio do tipo “paired like”, de 60 aminoácidos, que se liga a seqüências específicas de DNA nas células de origem osteogênica, atuando como ativador transcricional. As proteínas desta família se ligam a seqüências palindrômicas 5'TAAT(N)_nATTA, denominadas sítios P2 ou P3,

dependendo do número de nucleotídeos (n) localizados entre as duas seqüências. A proteína do *SHOX*, por apresentar uma glutamina na posição 50 do homeodomínio, se liga preferencialmente a sítios P3 (15).

Além do homeodomínio, as proteínas que desempenham a função de ativação transcricional apresentam outro domínio de 14 aminoácidos, localizado na porção C-terminal, denominado OAR. Ele é essencial para manter o potencial de transativação da proteína (15).

Até o momento foram descritos dois transcritos do *SHOX*. O “splicing” alternativo dos éxons 6a e 6b resulta nos transcritos: *SHOXa*, com 1870 pb, que codifica uma proteína com 292 aminoácidos, e *SHOXb*, com 1349 pb, cuja proteína possui 225 aminoácidos (12) (Figura 2). Essas duas isoformas apresentam padrões de expressão e distribuição tecidual distintos. O *SHOXa* é amplamente expresso, enquanto a expressão do *SHOXb* é mais restrita e predominantemente encontrada nos fibroblastos da medula óssea (12). O transcrito *SHOXb* não apresenta a porção C-terminal inteira e, por este motivo, é inativo como fator transcricional (15, 16). Acredita-se que ele forme heterodímeros com o *SHOXa*, e desta forma atue modulando a atividade deste transcrito (15).

Além disso, o *SHOX* pode ser transcrito a partir de duas regiões promotoras diferentes (16). O promotor P1 localiza-se a montante do éxon 1 e o promotor P2, na região não traduzida do éxon 2. Essas regiões geram RNAs mensageiros (mRNA) com seqüências codificadoras idênticas que diferem apenas quanto ao tamanho da região 5' não traduzida (UTR). O transcrito tipo 1, por apresentar uma região 5' UTR maior, é traduzido com

menor eficiência, enquanto o tipo 2, com menor 5' UTR, é traduzido com maior eficiência. Dessa forma, o tamanho dessa região não traduzida é inversamente proporcional à eficiência de tradução do mRNA.

Figura 2: Representação esquemática do gene *SHOX*, sua localização e seus transcritos. De cima para baixo: localização da PAR1 dos cromossomos X e Y; em amarelo, a área crítica para altura, região que contém o gene *SHOX*; estrutura do gene *SHOX*, com seus éxons; os dois transcritos do gene resultantes do “splicing” alternativo dos éxons 6a e 6b: *SHOXa* e *SHOXb*; em vermelho, o homeodomínio, codificado pelos éxons 3 e 4. Adaptado de Blaschke e colaboradores (17).

A proteína ativa transcrita pelo *SHOX*, cuja localização é restrita ao núcleo de certas linhagens celulares (15), atua diretamente nas cartilagens (18, 19). Um estudo de expressão do *SHOX* realizado por Munns e colaboradores, em 2004, sugeriu que sua proteína atua como um repressor da diferenciação dos condrócitos, mantendo a organização destas células e retardando a fusão das cartilagens de crescimento. Segundo este estudo, a

haploinsuficiência do *SHOX* resultaria na diferenciação prematura destes condrócitos, o que aceleraria a fusão da cartilagem e provocaria a parada do crescimento (14).

Além disso, a proteína do *SHOX* modula a expressão de outros genes alvos, provavelmente envolvidos no processo do crescimento (15). Estes genes, assim como as vias de sinalização reguladoras do crescimento ósseo ainda não estão bem definidas. Em 2007, o gene *NPPB*, que codifica o peptídeo natriurético cerebral (BNP), foi descrito com o primeiro alvo da regulação transcricional do *SHOX*. A expressão do *SHOX* regula positivamente a expressão do *NPPB* em linhagens de osteosarcoma e condrosarcoma (20). Neste mesmo trabalho, também foi observada uma coexpressão do BNP e da proteína *SHOX* no interior de condrócitos hipertróficos (20).

1.3. Fenótipos associados às alterações do *SHOX*

No mesmo estudo em que descreveram o gene, Rao e colaboradores encontraram uma mutação de ponto no éxon 5 em um paciente com baixa estatura familiar entre 91 pacientes estudados (12). Essa mutação, que resulta em uma proteína truncada, estava presente em todos os indivíduos baixos da família e ausente nos indivíduos com estatura normal. Ela também não foi encontrada em uma análise de 300 indivíduos europeus com estatura normal.

Após a descrição do gene e publicação desta mutação, essa região cromossômica passou a ser analisada em síndromes relacionadas com a baixa estatura e deformidades ósseas, como a síndrome de Turner, discondrosteose de Léri-Weill (DLW), etc. Várias alterações que resultam na ausência de um gene *SHOX* ativo foram descritas nesses indivíduos.

A perda de uma das cópias do *SHOX*, ou seja, sua hemizigose resulta em uma variedade de fenótipos associados à baixa estatura. Na síndrome de Turner, por exemplo, causada por monossomia total ou parcial do cromossomo X, existe a haploinsuficiência desse gene. As mulheres portadoras dessa síndrome apresentam baixa estatura, além de falência ovariana e malformações ósseas (13). Apesar da haploinsuficiência do *SHOX* estar envolvida nas anormalidades esqueléticas, ela não explica todas as anormalidades da síndrome (21).

A haploinsuficiência do *SHOX* também é responsável pela DLW, uma displasia óssea caracterizada principalmente por baixa estatura desproporcionada (BED) com encurtamento mesomélico dos membros e deformidade de Madelung (luxação dorsal da porção distal da ulna e encurtamento do antebraço em relação ao braço e à mão) (13, 22, 23). Mutações no *SHOX* são encontradas em cerca de 50 a 90% desses pacientes (23-30) (Tabela 1).

Muitos trabalhos também avaliaram as alterações do *SHOX* em grupos de indivíduos com BEI. Um dos primeiros estudos, realizado por Rappold e colaboradores, analisou 900 pacientes nos quais foram detectadas alterações no *SHOX* em 2,4% deles, sendo 2% de deleções e

0,4% de mutações (31). Em diversos estudos realizados, a frequência de alterações do *SHOX* nesses pacientes variou de 2 a 15% (29, 32-35) (Tabela 2).

Tabela 1: Frequência das alterações do *SHOX* descritas em pacientes com DLW

Autor/ ano	Deleções	Mutações
Belin e col., 1998 (36)	7/8	1/8
Shears e col., 1998 (37)	6/7	1/7
Grigelioniene e col., 2000 (22)	0/5	3/5
Schiller e col., 2000 (27)	10/18	0/18
Cormier-Daire e col., 2001 (24)	12/23	6/23
Ross e col., 2001 (23)	4/21	17/21
Grigelioniene e col., 2001 (26)	16/28	6/28
Huber e col., 2001 (38)	3/8	5/8
Müsebeck e col., 2001 (39)	5/12	NA
Falcinelli e col., 2002 (40)	10/21	3/21
Flanagan e col., 2002 (25)	9/18	3/18
Binder e col., 2004 (41)	7/20	7/20
Schneider e col., 2005 (42)	40/118	NA
Huber e col. 2006 (33)	29/56	7/56
Rappold e col., 2007 (35)	25/55	7/55
Jorge e col., 2007 (29)	8/9	0/9
Sabherwal e col., 2007 (30)	47/122	17/122

NA: não avaliada

Estes trabalhos demonstram que a frequência de deleções e mutações do *SHOX* varia tanto nos indivíduos com DLW como naqueles com BEI. Essa variação pode ser explicada pela heterogeneidade genética de ambas as doenças, pela utilização de diferentes metodologias, pelo

número de indivíduos avaliados, assim como, pelos critérios de seleção desses pacientes. Em 2007, Jorge e colaboradores demonstraram que a frequência de alterações do *SHOX* em 63 indivíduos com BEI foi de 3,2%. Quando se analisou apenas um grupo de pacientes que apresentava baixa estatura com desproporção corpórea, essa frequência aumentou para 22%, evidenciando a importância desse critério de seleção (29).

Tabela 2: Frequência das alterações do *SHOX* descritas em pacientes com BEI

Autor/ ano	Deleções	Mutações
Rao e col., 1997 (12)	0/91	1/91
Müsebeck e col., 2001 (39)	0/35	NA
Binder e col., 2000 (43)	1/68	0/68
Rappold e col., 2002 (31)	3/150	3/750
Stuppia e col., 2003 (44)	4/56	3/56
Binder e col., 2003 (32)	3/140	NA
Morizio e col., 2003 (34)	4/56	NA
Huber e col. 2006 (33)	14/84	4/84
Rappold e col., 2007 (35)	25/1534	9/1534
Jorge e col., 2007 (29)	0/63	2/63

NA: não avaliada

As alterações em heterozigose do *SHOX* resultam em uma variedade de fenótipos, enquanto que a perda das duas cópias do gene resulta na displasia mesomélica de Langer (19). Trata-se de uma forma muito grave de baixa estatura com encurtamento mesomélico dos membros e múltiplas deformidades ósseas.

Em contraste com a baixa estatura relacionada à perda de uma ou duas cópias do *SHOX*, alguns trabalhos demonstram que a presença de uma cópia extra desse gene relaciona-se com estatura elevada, o que reafirma a importância do papel deste gene no crescimento (45, 46). Estes trabalhos deixam claro que mutações afetando o *SHOX* podem levar a múltiplos fenótipos. Pacientes com haploinsuficiência do gene podem apresentar desde baixa estatura isolada, malformações esqueléticas até displasias graves (36, 47). Uma mesma alteração pode ser encontrada em indivíduos com ou sem deformidade de Madelung.

A variabilidade fenotípica e o grande número de pacientes com DLW aparentemente sem alterações moleculares no *SHOX* levantam a suspeita de que regiões regulatórias próximas ao gene ou mesmo outros genes possam estar envolvidos na etiologia da baixa estatura.

Em 2005, Benito-Sanz e colaboradores descreveram uma nova região, de aproximadamente 500 kb, localizada a jusante do *SHOX*, importante para a estatura e aparentemente envolvida na patogênese da DLW (48). Estudos dessa região, denominada de “área do *SHOX*”, em pacientes ainda sem diagnóstico molecular, resultaram na definição de uma nova classe de deleções da PAR1, cuja análise passou a ser incluída na avaliação dos pacientes com baixa estatura.

O estudo de 80 pacientes com DLW sem alterações no *SHOX* identificou deleções localizadas de 30 a 530 kb a jusante do *SHOX* em 15% deles. Os resultados sugerem a presença de elementos regulatórios da transcrição do *SHOX*, ou ainda a existência de um “locus” adicional na

PAR1, que quando mutado ou deletado resulta em um fenótipo idêntico ao observado nos pacientes com DLW. Além disso, o intervalo comum de deleção de 29 kb, definido distalmente pelo marcador de microssatélite DXYS10086 e na porção proximal pelo SNP rs7077102, foi considerado um “hot spot” para o ponto de quebra dessas deleções (48) (Figura 3).

Dois estudos publicados posteriormente por Schneider e Zinn e seus respectivos colaboradores descreveram duas outras regiões “hot spot” para o ponto de quebra dessa nova classe de deleções (42, 49) (Figura 3). Outros trabalhos reforçam a importância dessa região localizada a jusante do gene e concluem que, independente da existência ou não de uma região “hot spot”, as deleções na “área do *SHOX*” são heterogêneas tanto em relação ao tamanho quanto à localização dos pontos de quebra (50), enfatizando a necessidade de inclusão do estudo molecular dessa região nos pacientes com DLW e BEI (30, 50, 51).

Figura 3: Representação esquemática dos principais “hot spots” para o ponto de quebra das deleções localizadas na “área do *SHOX*”. As setas indicam a localização dos principais “hot spots” das deleções descritas a 3’ do gene *SHOX* em relação à posição dos marcadores de microssatélites. Adaptado de Zinn e colaboradores (49).

1.4. Detecção das alterações do *SHOX*

Como o *SHOX* está localizado em uma região cromossômica rica em seqüências repetitivas, como seqüências “Alu”, que favorecem a recombinação de elementos não homólogos, as deleções são as alterações mais comuns, sendo responsáveis por cerca de 2/3 das alterações do *SHOX* (52). Sendo assim, a investigação molecular dos pacientes com suspeita de alteração no gene deve ser iniciada com a pesquisa destas deleções.

Existem várias metodologias que permitem a identificação destas alterações. Algumas deleções podem ser detectadas por estudos de citogenética tradicional. A análise de cromossomos metafásicos com bandeamento G, obtidos a partir de cultura de linfócitos, permite a visualização de perdas de grandes porções cromossômicas, como as que ocorrem, por exemplo, nas monossomias parciais ou totais do X, características da síndrome de Turner.

A hibridação “in situ” com fluorescência (FISH) permite a detecção de deleções de porções menores do cromossomo. Essa metodologia, descrita na década de 80, possibilita a localização de seqüências específicas de DNA nos cromossomos. Ela utiliza sondas complementares ao *SHOX*, que passam por um processo de marcação com um fluorocromo que permite sua visualização ao microscópio de fluorescência. Em um indivíduo normal, que apresenta duas cópias do *SHOX*, uma em cada cromossomo sexual, são visualizados dois sinais fluorescentes em cada metáfase ou núcleo

interfásico. Quando existe deleção de uma das cópias, visualiza-se apenas um sinal em cada célula.

O FISH, entretanto, em virtude do tamanho das sondas utilizadas, não permite a detecção de pequenas deleções, que resultam na perda de um ou vários nucleotídeos, assim como mutações de ponto, que levam à troca de aminoácidos. Alterações menores como essas podem ser detectadas apenas com a utilização de técnicas de biologia molecular.

A análise de microssatélites é uma metodologia bastante utilizada na biologia molecular, por se tratar de um ensaio simples com diversas aplicações. Os microssatélites são regiões compostas por unidades de repetições de dois a seis nucleotídeos em “tandem” distribuídas pelo genoma. O número dessas repetições, além de caracterizar um alelo, é bastante variável na população. Cada indivíduo apresenta dois alelos, um proveniente do pai e outro da mãe, e por apresentarem padrão de herança de caráter mendeliano, possibilitam a detecção de deleções. Após o estudo dos progenitores, muitas vezes é possível diferenciar indivíduos homozigotos, com dois alelos iguais, dos indivíduos hemizigotos, que apresentam perda de um dos alelos. Porém, em alguns casos a análise não é informativa. Isso ocorre quando o único alelo presente no paciente está presente em ambos os pais (Figura 4).

A metodologia é baseada na amplificação das regiões que contêm as repetições e, para tanto, podem ser utilizados “primers” marcados com fluorescência. Neste caso, a análise é realizada em um seqüenciador automático, o que aumenta relativamente o custo do exame. Mutações de

ponto e deleções fora da região dos microssatélites também não são detectadas por esta técnica.

Figura 4: Eletroferogramas ilustrando o estudo de um marcador de microssatélite em duas famílias. A: O paciente apresenta apenas o alelo 154, herdado do pai, o que sugere deleção do alelo materno 156. B: O paciente apresenta apenas o alelo 144, que está presente tanto no pai quanto na mãe. Neste caso, a análise não é informativa, pois não se pode distinguir entre uma deleção e o estado de homozigose do marcador.

Em 2002, foi descrita uma metodologia capaz de detectar variações no número de cópias de genes e importantes regiões cromossômicas (53). O “multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA) é baseado na hibridação de várias sondas na sequência de DNA, seguida por amplificação (Figura 5). Cada sonda é composta por dois oligonucleotídeos, que após a hibridação com a sequência alvo, são unidos por uma ligase. Os fragmentos ligados são amplificados em uma PCR, com um par de “primers” universal, e submetidos a uma eletroforese capilar. A diferença de tamanho entre os fragmentos é definida por uma sequência específica, denominada “stuffer”,

também presente nas sondas. A análise é feita em programas específicos que comparam os picos correspondentes às sondas em estudo e sondas controles do paciente com as sondas de indivíduos controles.

Essa metodologia, comercialmente disponível para o *SHOX*, é relativamente simples e possibilita a análise de várias regiões importantes em uma única reação.

Figura 5: Representação esquemática da reação do MLPA. Na porção superior, uma única sonda composta por dois oligonucleotídeos: em azul, as seqüências de hibridação; em preto, o par de “primers” (seqüências X e Y) e em verde, a seqüência “stuffer”, que vai definir o tamanho do fragmento amplificado. Estas sondas hibridam ao DNA alvo (em vermelho) e, posteriormente, são unidas por uma ligase termoestável. Os fragmentos unidos são amplificados em uma PCR e submetidos a uma eletroforese capilar, que separa os diversos fragmentos gerados. Adaptado do “site” <http://www.mrc-holland.com>.

Uma vez não detectada deleção do *SHOX*, está indicado o seqüenciamento dos éxons do gene para identificação de mutações de ponto que justifiquem o fenótipo. Esta metodologia possibilita a detecção de qualquer troca, ganho ou perda de poucos nucleotídeos nas regiões codificadoras e sítios de “splicing”.

Apesar de todas essas técnicas disponíveis, muitas vezes não se detecta nenhuma alteração no *SHOX* nos indivíduos com DLW. Em alguns estudos até 40% dos pacientes permanecem sem diagnóstico molecular (48). Nestes casos, o defeito pode estar presente em regiões não analisadas do *SHOX*. Também não podem ser descartadas a presença de microdeleções intragênicas ou mutações intrônicas que alteram regiões promotoras ou reguladoras do *SHOX*, ou ainda, o envolvimento de outros genes no desenvolvimento ósseo. Nesse sentido, estudos envolvendo novas regiões devem ser realizados nestes pacientes como uma tentativa de esclarecer a causa molecular da baixa estatura.

OBJETIVOS

1. Comparar três metodologias utilizadas para a detecção de deleções do *SHOX*: FISH, análise de microssatélites e MLPA, em pacientes com discondrosteose de Léri-Weill ou baixa estatura desproporcionada.
2. Identificar mutações de ponto no *SHOX* nos pacientes que não apresentaram deleção do gene.

MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 819/06).

Os pacientes ou seus representantes legais foram informados a respeito da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1. Casuística

3.1.1. Critérios de seleção dos pacientes

Vinte e seis pacientes foram selecionados no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia para investigação de baixa estatura. Esses pacientes foram divididos em dois grupos (Tabela 3):

Grupo 1 - Pacientes com discondrosteose de Léri-Weill

Seis pacientes com DLW, três do sexo masculino e três do sexo feminino, com idade variando entre 7,3 a 18,5 anos (média de 12,9 anos) foram selecionados pelos seguintes critérios de inclusão: baixa estatura

caracterizada por escore de desvio padrão (Z) da altura inferior a -2 (54) e/ou presença de desproporção corpórea caracterizada por encurtamento dos membros, evidenciada por Z da relação altura sentada/altura total superior a 2 (55) e/ou presença, no paciente ou em seus familiares de primeiro grau, de deformidade de Madelung (luxação dorsal da porção distal da ulna e encurtamento do antebraço em relação ao braço e à mão) ou evidências de discondrosteose em radiografia simples de antebraço (curvatura dupla do rádio lateral e dorsal, fusão precoce da porção medial da epífise distal da ulna e aspecto triangular do carpo) (56, 57).

Grupo 2 - Pacientes com baixa estatura desproporcionada

Foram estudados 20 pacientes com BED, nove do sexo masculino e 11 do sexo feminino, com idade variando entre 4,9 a 18,5 anos (média de 11,7 anos), selecionados pelos seguintes critérios de inclusão: baixa estatura caracterizada por Z da altura inferior a -2 (54) e/ou presença de desproporção corpórea caracterizada por encurtamento dos membros, evidenciada por Z da relação altura sentada/altura total superior a 2 (55).

3.1.2. Grupo de indivíduos controle

Para o grupo controle foram selecionados 160 indivíduos adultos com altura normal (Z da altura dentro da normalidade).

Tabela 3: Aspectos clínicos dos pacientes com DLW e BED

Paciente	Sexo	IC (anos)	Altura (cm)	Z Alt	Z AS/A	Tipo de BED
1/DLW	m	7,3	97,8	-4,15	2,05	Familiar
2/DLW	f	10,7	106,0	-2,98	2,65	Familiar
3/DLW	m	16,4	109,0	-2,40	2,17	Isolada
4/DLW	f	15,2	130,5	-1,75	2,38	Familiar
5/DLW	m	18,5	138,2	-0,46	4,87	Familiar
6/DLW	f	13,2	137,8	-4,05	3,68	Isolada
1/BED	m	8,9	102,5	-2,24	3,39	Familiar
2/BED	f	13,5	153,4	-0,68	3,76	Familiar
3/BED	f	13,9	136,1	-3,57	2,92	Familiar
4/BED	f	11,3	116,6	-2,42	4,32	Isolada
5/BED	f	11,8	116,2	-3,83	3,06	Isolada
6/BED	m	5,9	129,5	-2,37	2,01	Isolada
7/BED	m	15,1	152,0	-2,12	2,31	Isolada
8/BED	f	7,4	128,7	-2,46	2,49	Isolada
9/BED	f	6,9	129,8	-2,11	3,14	Isolada
10/BED	m	10,3	143,0	-1,40	3,04	Familiar
11/BED	f	4,9	124,1	-3,71	5,97	Familiar
12/BED	m	16,3	139,7	-1,51	2,63	Familiar
13/BED	f	9,9	139,0	-2,24	4,05	Isolada
14/BED	m	10,5	126,6	-0,74	2,75	Familiar
15/BED	f	13,2	128,5	-3,61	2,72	Familiar
16/BED	f	18,5	116,8	-3,61	5,63	Familiar
17/BED	m	8,0	148,0	-1,40	2,72	Isolada
18/BED	m	5,6	124,5	-1,96	2,70	Familiar
19/BED	f	12,4	122,4	-2,64	2,79	Isolada
20/BED	m	9,9	129,5	-3,70	2,17	Familiar

IC: idade cronológica; Z Alt: escore de desvio padrão da altura; Z AS/A: escore de desvio padrão da altura sentada/altura total corrigido para sexo e idade; BED: baixa estatura desproporcionada; DLW: discondrosteose de Léri-Weill; f: feminino; m: masculino.

3.2. Avaliação clínica e laboratorial

Todos os pacientes foram avaliados clínica e laboratorialmente para afastar outras causas de baixa estatura, sendo submetidos aos seguintes exames: hemograma, glicemia de jejum, uréia, creatinina, eletrólitos séricos

(Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, P⁻), proteínas totais e frações, AST, ALT, fosfatase alcalina, gasometria venosa, anticorpo anti-endomísio, IgA, pesquisa de elementos anormais e sedimentos na urina, protoparasitológico de fezes e cariótipo. Foram realizadas ainda dosagens hormonais, como TSH, T4 livre, LH, FSH, estradiol ou testosterona, IGF-1, IGFBP-3 e teste de estímulo farmacológico com clonidina para dosagem de GH.

3.3. Avaliação citogenética molecular

3.3.1. Hibridação “in situ” com fluorescência (FISH)

A avaliação citogenética consistiu na análise de cromossomos metafásicos em 20 células, através da técnica de FISH utilizando uma sonda específica para o *SHOX*. Esta sonda, contida no cosmídio LLNOYCO3”M”34F5, apresenta 42 kb e é complementar à região que abrange os éxons 3 a 6b do *SHOX* (25). Este cosmídio foi gentilmente cedido pela Dra. Gudrun Rappold do Instituto de Genética Humana da Universidade de Heidelberg, na Alemanha. Mais recentemente, uma segunda sonda, complementar a uma região centromérica do cromossomo X (Xp11.22), contida no clone RP11-167P23, foi utilizada simultaneamente para facilitar a localização deste cromossomo.

3.3.1.1. Elaboração das lâminas

As lâminas foram preparadas a partir de cromossomos metafásicos obtidos através de cultura de linfócitos de sangue periférico (58). Cerca de 5,0 mL de sangue periférico foram colhidos com uma seringa previamente heparinizada (heparina sódica ou liquemine 5000 U/mL) ou em um tubo de coleta a vácuo com heparina em condições assépticas. Após a sedimentação das hemácias, aproximadamente 0,2 mL de plasma com os leucócitos foram semeados, dentro do fluxo laminar, em frascos contendo 4,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 20% de soro fetal bovino inativado (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,2 mL de fitohemaglutinina P (0,8%) (Difco, Detroit, EUA) e 20 µL de L-glutamina 200 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Estes frascos foram incubados em uma estufa a 37 °C.

Após um período de 72 horas de incubação, foram acrescentados 100 µL de colchicina (0,05 µg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) à cultura, que permaneceu por mais uma hora a 37 °C. Então, o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 1000 rpm por oito minutos à temperatura ambiente (Sorvall RT7, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados ao material precipitado 4,0 mL de uma solução hipotônica de cloreto de potássio (75 mM), previamente aquecida a 37 °C. Depois de ser homogeneizado delicadamente com uma pipeta Pasteur, o material permaneceu a 37 °C durante 15 minutos.

Após este período, cerca de quatro gotas de uma solução fixadora composta por metanol e ácido acético glacial (3:1) (Fixador de Carvey) foram

acrescentadas ao material, homogeneizando-se cuidadosamente com a pipeta Pasteur. Em seguida, foram adicionados mais 4,0 mL da solução fixadora sem homogeneização. O material foi centrifugado a 1000 rpm por oito minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e 5,0 mL da mesma solução fixadora foram acrescentados, homogeneizando-se com a pipeta Pasteur. O material foi novamente centrifugado a 1000 rpm por oito minutos à temperatura ambiente. Este material foi lavado mais duas vezes com a solução fixadora, e ao final foi suspenso em cerca de 3,0 mL da mesma. O material foi pingado sobre lâminas molhadas e geladas a uma distância de pelo menos 15 cm. As lâminas permaneceram à temperatura ambiente até o uso.

3.3.1.2. Preparação da sonda

Inicialmente apenas a sonda do *SHOX* foi utilizada. Esta sonda foi marcada com biotina e, posteriormente, hibridada com uma avidina ligada a fluoresceína, visualizada na coloração verde. A partir de janeiro de 2007, a marcação da sonda do *SHOX* passou a ser realizada com digoxigenina, em uma tentativa de melhorar a intensidade do sinal fluorescente. Após uma incubação com anticorpos anti-digoxigenina ligados a rodamina, esta sonda passou a ser visualizada em vermelho (Figura 6).

Uma cohibridação com uma sonda complementar a região Xp11.22 também passou a ser realizada. Esta sonda foi, então, marcada com biotina e visualizada em verde (Figura 6). No total, seis pacientes com BED foram analisados desta forma.

Figura 6: Representação esquemática dos resultados do FISH. As figuras A e C mostram a hibridação realizada inicialmente, apenas com a sonda do *SHOX* marcada com a biotina e visualizada em verde; enquanto as figuras B e D mostram a hibridação da sonda do *SHOX* marcada com a digoxigenina e visualizada em vermelho, e também a cohibridação com a sonda centromérica do X, visualizada em verde. As figuras A e B mostram cromossomos normais, com presença das duas cópias do *SHOX*; enquanto as C e D mostram a deleção de um dos alelos, no cromossomo X ou Y.

Cerca de 1 µg das sondas foi marcado com biotina ou digoxigenina pelo método "nick translation" seguindo o protocolo dos "kits" de marcação "BioNick DNA Labeling System" (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e "DIG-Nick Translation Mix" (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

Após a marcação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 2% em TAE (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001 M; pH 8,0) contendo brometo de etídio (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 µg/mL de gel, com o objetivo de verificar a eficiência desta marcação. Os fragmentos da sonda marcada com biotina deveriam encontrar-se entre 50 e 500 pb, enquanto os marcados com a digoxigenina, entre 200 e 500 pb.

Como as duas sondas são complementares a regiões que contêm seqüências "Alu" e outras seqüências repetitivas, foi necessário realizar uma supressão para evitar hibridações não específicas. Para esta supressão utilizou-se o "DNA humano Cot-1" (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Cerca de 300 ng da sonda marcada com biotina e 200 ng da sonda marcada com

digoxigenina foram precipitados juntamente com 25 µg do “DNA humano Cot-1”, utilizando acetato de sódio (3,0 M) e etanol absoluto gelado, permanecendo a -20 °C por, no mínimo, 24 horas. Após esta precipitação, as sondas foram lavadas com etanol 70% gelado, secas em uma centrífuga a vácuo (Concentrator 5301, Eppendorf, Alemanha) e suspensas em 20 µL de meio de hibridação (Formamida Deionizada 50%; 2xSSC pH 7,0; Tampão Fosfato 40 mM; Solução de Denhart 1x; SDS 0,1%; Dextran Sulfato 10%; pH 7,0), a 37 °C por, no mínimo, cinco minutos.

3.3.1.3. Hibridação

As áreas de hibridação das lâminas foram marcadas ao microscópio óptico comum. Em seguida, elas foram submetidas a uma incubação com 2xSSC (NaCl 0,3 M; Citrato Trissódico 0,03 M; pH 7,0), em câmara úmida, a 37 °C durante uma hora. Após esse período, foram submetidas aos seguintes banhos de três minutos cada, à temperatura ambiente: três banhos sucessivos de 2xSSC e três banhos de etanol nas concentrações de 50%, 70% e 100%.

As lâminas secaram a temperatura ambiente e, em seguida, o material fixado foi desnaturado, mergulhando-se as lâminas em uma solução de desnaturação (Formamida Deionizada 70%; 2xSSC pH 7,0) a 75 °C por dois minutos. Após este período, elas foram submetidas a três banhos de etanol gelado nas concentrações de 50%, 70% e 100% durante três minutos cada. Elas foram, então, secas à temperatura ambiente.

As sondas suprimidas foram desnaturadas ao serem submetidas a um banho a 98 °C por 10 minutos e depois transferidas para um banho de gelo. As sondas desnaturadas sofreram uma pré-hibridação ao permanecerem a 37 °C por, pelo menos, 30 minutos. Após este período, elas foram colocadas sobre as lâminas, que foram cuidadosamente cobertas por uma lamínula, evitando a formação de bolhas.

As lâminas foram incubadas com as sondas em câmara úmida a 37 °C por 72 horas, para que estas se ligassem aos respectivos alvos.

3.3.1.4. Lavagem e marcação com fluorocromo

As lâminas foram retiradas da câmara úmida, sendo as lamínulas desprezadas. Elas foram submetidas a um banho de solução de lavagem (Formamida Deionizada 50%; 2xSSC pH 7,0) seguido por um banho de 2xSSC, ambos a 37 °C por dois minutos. Para finalizar, foram submetidas a um banho de PBT (PBS pH 7,4; BSA 0,12%; Tween 20 0,1%) por cinco minutos à temperatura ambiente.

Cerca de 500 ng de avidina marcada com fluoresceína (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e 300 ng de anticorpo anti-digoxigenina marcado com rodamina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) diluídos em 25 µL PBT foram colocados sobre a região de hibridação das lâminas. Cobertas por lamínulas, estas foram colocadas em uma câmara úmida a 37 °C por 45 minutos. Por afinidade, a avidina se liga às moléculas de biotina da sonda, enquanto os anticorpos anti-digoxigenina se ligam a própria digoxigenina. Após este período, as lâminas foram retiradas da câmara

úmida e submetidas a três banhos de PBT à temperatura ambiente por três minutos cada.

3.3.1.5. Amplificação do sinal

Quinhentos ng de anticorpo anti-avidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) marcado com biotina e 25 ng de anticorpo anti-anti-digoxigenina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) diluídos em 25 µL PBT foram adicionados à área de hibridação das lâminas. Uma lamínula foi cuidadosamente colocada sobre a região, evitando a formação de bolhas. As lâminas foram incubadas em uma câmara úmida a 37 °C por 45 minutos. Após esta incubação, elas foram lavadas em três banhos de PBT à temperatura ambiente por três minutos cada.

Novamente, 500 ng de avidina marcada com fluoresceína e 300 ng de anticorpo anti-digoxigenina marcado com rodamina diluídos em 25 µL PBT foram colocados sobre a área de hibridação, sendo cobertos por uma lamínula. As lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida a 37 °C por 45 minutos.

Após esta incubação, elas foram submetidas a três banhos de PBT à temperatura ambiente de três minutos cada. Para finalizar, foram colocados 15 µL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole dihidroclorídrico) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (0,8 ng/µL) sobre a área de hibridação das lâminas ainda molhadas. Elas foram cuidadosamente cobertas com uma lamínula, a fim de evitar a formação de bolhas. As lâminas foram, então, observadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss, Axioscop, Alemanha) e para a captura

de imagens foi utilizado o sistema de análise de imagens Mackprobe (Perceptive Scientific Instruments Inc., Reino Unido).

3.4. Avaliação molecular

3.4.1. Extração do DNA a partir de sangue periférico

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e familiares selecionados. Quinze mL de sangue venoso foram colhidos em EDTA 25 mM e submetidos ao método de extração com NaCl saturado (59). Esta técnica consiste em duas etapas de lise de hemácias (NH_4Cl 114 mM; NH_4HCO_3 1 mM) e uma etapa de lise de leucócitos (NaCl 150 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) utilizando SDS (0,2%) e proteinase K (160 mg/mL). A precipitação do DNA foi feita com etanol absoluto gelado seguida de lavagem com etanol 70%, finalizando com sua suspensão em TE (10:0,1) (10 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em um espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 $\mu\text{g/mL}$). Foi estabelecido que a relação acima de 1,75 entre as leituras em 260 e 280 nm seria a ideal para a caracterização da pureza do material (60).

As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,004 M; Ácido

Acético Glacial; EDTA 0,001 M pH 8,0) contendo brometo de etídio (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 µg/mL de gel e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade. Como padrões de massa foram utilizados 500 ng do marcador de peso molecular λ HindIII (250 ng/µL) e 20 ng do λ DNA (10 ng/µL).

3.4.2. Análise de microssatélites

O estudo consistiu na análise de seis marcadores de microssatélites: repetições CA, DYS290, DXYS10093, DXYS10096, DXYS233 e DXYS234. O marcador repetições CA é um marcador intragênico localizado na região 5'UTR. O DYS290 e o DXYS10093 também são intragênicos e estão localizados em regiões intrônicas, entre os éxons 6a e 6b. Os marcadores DXYS10096, DXYS233 e DXYS234 estão localizados a 3' do gene, em uma região importante aparentemente envolvida com a DLW (42, 48, 49). O primeiro localiza-se a cerca de 200 kb do *SHOX*, o segundo, a aproximadamente 300 kb e o último a cerca de 1.100 kb (Figura 7).

Para comparações diretas com o FISH, foi definido um painel de marcadores intragênicos que envolve apenas os marcadores: repetições CA, DYS290 e DXYS10093.

O DNA genômico dos pacientes e seus progenitores disponíveis foi amplificado através de PCR, utilizando pares de “primers” específicos para cada marcador (Tabela 4).

Figura 7: Representação esquemática da localização dos marcadores de microssatélites ao longo da PAR1. Adaptado de Benito-Sanz e colaboradores (48).

Todos os “primers” diretos (F) foram marcados com um isômero de carboxifluoresceína (FAM) em suas extremidades 5’. Todas as reações foram realizadas em um volume total de 25 μ L, utilizando-se de 100 a 300 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 15 pmol de cada par de “primer”, tampão da reação (KCl 50 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 9,0) e 1 unidade da enzima “Taq” DNA polimerase (5 U/ μ L) (Promega Corporation, WI, EUA).

O protocolo básico de amplificação consistiu em uma temperatura inicial de 94 °C durante cinco minutos, seguida por 30 ciclos a 94 °C, temperatura de hibridação variável de acordo com os “primers” (Tabela 4) e 72 °C durante 30 segundos para cada temperatura, mais um ciclo final de extensão a 72 °C por 30 minutos, realizado em um termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese capilar no seqüenciador automático “ABI Prism 310 Genetic Analyzer” (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EUA) e analisadas pelo programa de análise de fragmentos “GeneScan” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.4.3. Estudo do grau de heterozigose do microssatélite DYS290

Como não foi encontrado na literatura o grau de heterozigose do marcador DYS290, 60 indivíduos controles foram estudados para definir este valor na população brasileira.

O DNA genômico destes controles foi amplificado através de PCR, utilizando o par de “primers” específico para o marcador DYS290 (Tabela 4) e o mesmo protocolo de reação descrito na análise de microssatélites. Uma vez amplificadas, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar no seqüenciador automático “ABI Prism 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e analisadas pelo programa de análise de fragmentos “GeneScan” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O grau de heterozigose foi obtido através de uma razão entre o número de indivíduos com dois alelos distintos e o número total de indivíduos analisados (61).

Tabela 4: “Primers” utilizados na amplificação dos marcadores de microssatélites

Marcadores	“Primers”	Temperatura Hibridação (°C)	Repetições	Grau de Heterozigose
repetições CA (36)	F: 5'- CATGTCATATATATATGTGATCC - 3'	55	CA	0,93
	R: 5'- GACACAGAAATCCTTCATAAA - 3'			
DYS290 (62)	F: 5'- CAGAGTGAGACTTCATCGAAG - 3'	53	CCTT	0,63
	R: 5'- TGCTAGCTGCTTCTTTCTCC - 3'			
DXYS10093 (48)	F: 5'- GCCCGTGATCCCAGTACTG - 3'	55	CT	0,69
	R: 5'- CAACTTCCTTGGAAATCTTC - 3'			
DXYS10096 (48)	F: 5'- TTAAACAAACCGCATTCTCCAA - 3'	58	TG	0,50
	R: 5'- GTGGTGGAGCTTGCAGTGA - 3'			
DXYS233 (62)	F: 5'- TGGGAATTCGAGGCTG - 3'	56	CA	0,81
	R: 5 - TGATTTTCCTTGATTTCCATCCTGGGGTTG - 3'			
DXYS234 (62)	F: 5'- CCCAGATCGNCCATT - 3'	62	CA	0,72
	R: 5'- ATGGCTCTGAGGCGGG - 3'			

F: “primer” direto; R: “primer” reverso. Os “primers” F foram marcados com FAM em sua extremidade 5'.

3.4.4. Análise por PCR em tempo real da região dos marcadores DXYS10096 e DXYS234

Segundo os “kits” de MLPA utilizados, a presença de deleção de uma única sonda deve ser confirmada por uma segunda metodologia. Este mesmo raciocínio é válido para deleções envolvendo apenas um marcador de microssatélite. A presença de polimorfismos ou mutações na região das sondas e “primers” utilizados para a amplificação dos fragmentos pode gerar resultados que sugerem deleção, ou seja, resultados falsos positivos para deleções.

A confirmação destas possíveis deleções foi realizada através de um estudo de quantificação relativa das regiões em questão por PCR em tempo real. As reações foram realizadas pelo método baseado em “SYBR Green 1”, utilizando-se o aparelho “ABI 7000 Sequence Detection Systems” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O estudo foi realizado a partir de DNA genômico dos pacientes com suspeita de deleção e familiares disponíveis. Foi realizada uma análise de quantificação relativa, baseada na comparação de um gene referência que, assim como o *SHOX*, apresenta duas cópias no genoma. O gene escolhido foi o *NCP1* (“Niemann-Pick C1 protein precursor”), localizado no cromossomo 18q11.2, que foi quantificado, simultaneamente, em tubos separados para cada paciente. Foram elaborados “primers” específicos para as duas regiões em questão, correspondentes aos marcadores DXYS10096 e DXYS234, e para o gene referência (Tabela 5).

Tabela 5: “Primers” utilizados no PCR em tempo real para quantificação relativa da região dos marcadores DXYS10096 e DXYS234

Marcador	“Primers”	Produto (pb)
DXY10096	F: 5'- CTGGGCTCTGTGGTGAAAGATGATG - 3'	130
	R: 5'- TTTGGAGTTACAGGGGAAGGAAGCTG - 3'	
DXYS234	F: 5'- CAGAGCCAT CCCTCTGAGACAAGTG - 3'	101
	R: 5'- GTGACCACAGTCACATCCATCTCCTC - 3'	
NPC1	F: 5' - ACCCTGGCTGTGTCAATTTCTTCTCG - 3'	101
	R: 5' - TGACCAGAGGTCAACTGGATTGGTTG - 3'	

O “kit” “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) contém o corante “SYBR Green 1”, uma DNA polimerase (“AmpliTaq Gold DNA Polymerase”), dNTPs com dUTP e um tampão que proporciona condições apropriadas para a PCR. Este método é baseado na detecção de fluorescência gerada à medida que o produto de PCR é amplificado, uma vez que o corante “SYBR Green 1” apresenta grande afinidade pela molécula de DNA dupla fita. Sendo assim, o produto gerado a cada ciclo resulta no aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de cópias destas regiões.

As reações foram realizadas em triplicata, com volume total de 25 µL, 0,2 µM de cada “primer” e 50 ng de DNA genômico. As condições de reação compreenderam uma incubação a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. Todos os resultados foram confirmados em um segundo ensaio.

Ao final de cada reação, foi realizada uma curva de dissociação para verificação dos produtos amplificados. Esta análise é importante para

garantir que apenas o produto esperado tenha sido amplificado, uma vez que o “SYBR Green 1” se liga inespecificamente a qualquer DNA fita dupla.

O cálculo da quantificação relativa do número de cópias da região foi realizado a partir de um número inicial de cópias conhecido do calibrador (controle normal), utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme descrito por Livak (63). ΔCT é a diferença entre os Ct do gene alvo e gene referência de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT do calibrador e da amostra.

3.4.5. “Multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA)

Todas as etapas foram realizadas de acordo com as instruções dos “kits”: “P018-C1 *SHOX*” e “P018-D1 *SHOX*” (MCR Holland, Amsterdam, Holanda). Eles possibilitam a análise simultânea de 34 regiões, sendo sete referentes a seqüências exônicas do gene (éxons 1, 2, 3, 4, 5, 6a e 6b); uma referente a uma seqüência intrônica, localizada entre os éxons 6a e 6b e denominada pelo “kit” de éxon 7; 13 referentes à “área do *SHOX*”, localizada a jusante do gene e outras 13 referentes a diversas regiões do cromossomo X.

Cerca de 100 ng de DNA genômico dos pacientes foi diluído em água ultrapura em um volume final de 5 μ L. Em um termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), os tubos com 5 μ L de DNA diluído foram incubados por 5 minutos a 98 °C, a fim de ocorrer a desnaturação. A temperatura foi diminuída para 25 °C e foram acrescentados 3 μ L do “mix”

de sondas, preparado a partir de 1,5 μ L do “Salsa probe mix” e 1,5 μ L do tampão MLPA. Essa mistura foi submetida por um minuto a uma temperatura de 95 °C, seguida por 16 horas a 60 °C, para que as sondas hibridassem aos seus respectivos alvos.

Após as 16 horas de incubação, a temperatura foi reduzida para 54 °C. Nesta temperatura, 32 μ L do “mix” ligase-65, preparado a partir 3 μ L do tampão ligase-65 A, 3 μ L do tampão ligase-65 B, 1 μ L da ligase-65 e 25 μ L de água ultrapura, foram adicionados a cada tubo. Estes foram incubados a 54 °C por 15 minutos para ocorrer a ligação das sondas previamente hibridadas e, em seguida, a 98 °C por cinco minutos, para inativação das enzimas restantes.

Dez μ L do produto de ligação foram transferidos para um novo tubo contendo 30 μ L do “mix” PCR, preparado a partir de 4 μ L do tampão “Salsa PCR” e 26 μ L de água ultrapura. Este tubo foi colocado no termociclador a 60 °C e mantido nesta temperatura enquanto se adicionou 10 μ L do “mix” polimerase, que contém 2 μ L de “Salsa PCR primers”, 2 μ L do tampão “Salsa enzyme dilution”, 0,5 μ L da enzima “Salsa polimerase” e 5,5 μ L de água ultrapura. Nessa etapa, se iniciou a reação de amplificação por PCR das sondas ligadas. O protocolo de amplificação consistiu em 35 ciclos de 95 °C, temperatura de hibridação dos “primers” de 60 °C e 72 °C, durante 30 segundos para cada temperatura, mais um ciclo final de extensão a 72 °C por 20 minutos.

Estas amostras amplificadas foram submetidas a uma eletroforese capilar no seqüenciador automático “ABI Prism 310 Genetic Analyzer”

(Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e analisadas pelo programa de análise de fragmentos “GeneScan” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados obtidos pelo “GeneScan” foram analisados pelo programa “MCR Coffalyzer” (MCR Holland, Amsterdam, Holanda), que determina a relação das áreas dos picos de interesse com as áreas dos picos das regiões controle, considerando um pico como sendo normal quando a razão entre essas áreas estiver entre 0,7 e 1,3, deletado quando for inferior a 0,7 e duplicado quando for superior a 1,3. Seis indivíduos com estatura normal foram utilizados como grupo controle para a validação da reação e análise dos pacientes.

3.5. Análise comparativa entre as metodologias

As três metodologias foram comparadas quanto à sensibilidade, especificidade, tempo de execução, grau de dificuldade e custo.

3.6. Seqüenciamento direto

O seqüenciamento foi realizado em todos os pacientes que não apresentaram deleção do gene *SHOX* pelas metodologias anteriores. O DNA genômico dos pacientes foi amplificado através de PCR, a partir de diferentes pares de “primers” específicos para os cinco éxons traduzidos do gene (éxons 2, 3, 4, 5 e 6a) (Tabela 6).

O seqüenciamento da região de hibridação dos “primers” utilizados para a amplificação do marcador DXY234 foi realizado nos pacientes com suspeita de deleção desta região pela análise de microssatélites, com a finalidade de excluir qualquer variante alélica que pudesse resultar em uma não hibridação com conseqüente não amplificação de um dos alelos. Os “primers” utilizados para o seqüenciamento desta região encontram-se na Tabela 7.

Todas as reações foram realizadas em um volume total de 25 µL, utilizando-se de 100 a 300 ng de DNA genômico, 200 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada “primer”, tampão da reação (KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 9) e 1 unidade da enzima “Taq” DNA polimerase (5 U/µL) (Promega Corporation, WI, EUA).

Tabela 6: “Primers” utilizados na amplificação e seqüenciamento dos éxons do *SHOX*

Éxon	“Primers”	Produto (pb)	Temperatura de hibridação (°C)
2	F: 5'- GCGAGGTCGCCGCGTATAAATAGTGAG - 3'	440	66
	R: 5'- AGCCGGAGCGCAAAGGAACCTTAC - 3'		
3	F: 5'- GTTGCGCAAAACCTCCCC - 3'	328	65
	R: 5'- CGTGCTGTGCGCTCCC - 3'		
4 e 5	F: 5'- TCTCTCTCTGCTTCTCCCCA - 3'	340	57
	R: 5'- CAGGTCCCTAGGGATCTTCA - 3'		
6	F: 5'- TCCTGCGCCCTCACCC - 3'	354	65
	R: 5'- GTGCAGGACGCGCGGT - 3'		

O protocolo básico de amplificação consistiu em uma temperatura inicial de 94 °C durante cinco minutos, seguida por 35 ciclos de 97,5 °C, temperatura de hibridação variável dependendo do par de “primers” utilizado

(Tabelas 6 e 7) e 72 °C, durante 30 segundos para cada temperatura, mais um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 minutos, realizado em um termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Tabela 7: “Primers” utilizados no seqüenciamento da região de hibridação dos “primers” utilizados para amplificação do marcador DXYS234

“Primers”	Produto (pb)	Temperatura de hibridação (°C)
F: 5'- TCACGAGCTCAGGATTTCAA- 3'	440	66
R: 5'- GGTGACCACAGTCACATCCA- 3'		

O produto amplificado foi quantificado através de uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 2% em TAE (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M; pH 8,0) contendo brometo de etídio (Sigma, St Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 µg/mL de gel, utilizando-se como padrão de massa 500 ng do marcador de peso molecular ϕ X174/*Hae*III ou “DNA Mass Ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA).

Cerca de 30 ng deste produto foram submetidos a uma reação de purificação enzimática com 10 U da enzima “ExoSAP-IT” (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 15 minutos a uma temperatura de 37° C, seguida por 15 minutos a 80 °C.

Após a purificação, o material foi submetido a uma reação de seqüenciamento seguindo as instruções do “kit” “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Vinte ng de produto de PCR purificado, 2 µL de “BigDye Terminator”, 6 µL de tampão de seqüenciamento e 5 pmol de um

dos “primers” específicos para cada éxon (Tabela 6) foram submetidos ao protocolo de seqüenciamento que consistiu em 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por cinco segundos e 60 °C por quatro minutos, realizado em um termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado segundo o protocolo do isopropanol/etanol. As amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços (“MicroAmp optical 96-well Reaction Plate”, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e cerca de 80 µL de isopropanol 75% foram acrescentados a cada poço. A placa permaneceu em repouso por 10 minutos e, então, foi centrifugada a 3700 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e cerca de 150 µL de etanol 70% foi adicionado a cada poço. A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 3700 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa permaneceu invertida em temperatura ambiente, protegida da luz, até que o álcool evaporasse totalmente.

Foram acrescentados 15 µL de formamida (“Formamida Hi-Di”, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a cada poço e esse material foi submetido a uma eletroforese capilar no seqüenciador automático “ABI Prism 3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise foi realizada pelo programa “Sequencing Analysis” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.6.1. Estudo da variante alélica NM_000451:c.1236 -10T>C por enzima de restrição

Com o objetivo de verificar a frequência da variante alélica encontrada no íntron 4 da paciente 16/BED na população, foi realizado um estudo em 320 alelos normais com a enzima de restrição *Hpy188III* (New England, Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA).

O fragmento que contém os éxons 4 e 5 foi amplificado em 160 indivíduos controles normais a partir do mesmo protocolo inicial utilizado para o seqüenciamento. Cerca de 100 ng do produto amplificado foram incubados por 16 horas a 37°C juntamente com 2,5 unidades da enzima de restrição *Hpy188III*, BSA (100 µg/mL) e “NEBuffer 2” em um volume total de 20 µL.

O produto digerido foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 2% em TAE (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M; pH 8,0) contendo brometo de etídio (Sigma, St Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 µg/mL de gel, utilizando-se como padrão 500 ng do marcador de peso molecular ϕ X174/*HaeIII* ou 1 Kb “DNA Ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Nos indivíduos sem a variante alélica NM_000451:c.1236 -10T>C, o fragmento amplificado de 340 pb é digerido em três fragmentos com tamanhos de 245, 58 e 37 pb. Nos indivíduos com a variante, um novo sítio de restrição é criado no fragmento de 245 kb e como resultado da digestão temos quatro fragmentos com tamanhos de 143, 102, 58 e 37 pb. Os indivíduos com a variante em heterozigose apresentam os cinco fragmentos.

RESULTADOS

4.1. Deleções do *SHOX*

Os resultados das três metodologias dos 26 pacientes podem ser visualizados na Tabela 8, inclusive os resultados de cada marcador de microssatélite de forma isolada. O grau de heterozigose do marcador DYS290 determinado pelo estudo em 60 indivíduos normais foi de 63%.

Os seis (100%) pacientes do grupo 1, com DLW, apresentaram deleções do *SHOX* em heterozigose. As deleções foram detectadas tanto por MLPA, quanto pelo painel de microssatélites intragênicos, definido pelos marcadores repetições CA, DYS290 e DXYS10093 (Tabela 8). O FISH não foi capaz de detectar a deleção no paciente 1/DLW (Figuras 8 e 9).

As deleções encontradas nos pacientes com DLW envolveram todos os éxons do gene e os intervalos de deleção, estimados pela análise de microssatélites e pelo MLPA, variaram de 37,4 a 367,2 kb para a menor deleção (paciente 1/DLW) e de 2,8 a 6,2 Mb para a maior (pacientes 2/DLW e 3/DLW). O menor valor destes intervalos foi definido pela distância entre as sondas deletadas, enquanto o maior valor foi estimado pela distância entre as sondas vizinhas preservadas (Tabela 9).

No grupo 2, composto por 20 pacientes com BED, apenas uma (5%) deleção foi detectada na região do *SHOX* (Tabela 8). Trata-se de uma deleção intragênica em heterozigose, envolvendo os éxons 4, 5 e 6a, detectada apenas por MLPA na paciente 2/BED.

Tabela 8: Detecção de deleções do gene *SHOX* nos pacientes com DLW e BED pelos métodos de FISH, análise de microssatélites e MLPA

	DLW						BED																			
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
MLPA	■	■	■	■	■	■	■	■						■									■			
FISH	□	■		■	■	■	■																■			
Microssatélites	■	■	■	■	■	■	■	■						■	■								■			
repetições CA	■	■	■	■	■																					
DYS290	■	■		■	■											■				■				■		■
DXYS10093	■	■	■	■	■											■	■									
DXYS10096	■	■	■		■											■			■	■				■	■	
DXYS233		■	■																	■	■			■		
DXYS234	■	■	■		■	■									■	■				■	■					

Os quadros pretos e brancos representam presença e ausência de deleção, respectivamente. Os quadros cinza indicam uma análise de microssatélites não informativa. No grupo de pacientes com DLW, houve discordância entre o FISH e as demais metodologias no paciente 1/DLW. Neste caso, o FISH não detectou a deleção. No grupo com BED, seis pacientes apresentaram deleções: a paciente 2/BED apresentou uma deleção intragênica detectada apenas por MLPA. Outros cinco pacientes apresentaram deleções fora do *SHOX*, a 3' do gene. A análise de microssatélites detectou a deleção nos 5 casos e o MLPA em três destes casos (pacientes 1/BED, 8/BED e 17/BED).

Figura 8: À esquerda, uma imagem do FISH do paciente 1/DLW. Note a presença de dois sinais fluorescentes no braço curto dos cromossomos X e Y. À direita, o heredograma da família do mesmo paciente e os haplótipos obtidos pela análise de microssatélites. Os indivíduos em preto são clinicamente afetados com DLW. As regiões em preto indicam os segmentos deletados, e em cinza indicam uma análise não informativa. Os marcadores DYS290 e DXYS10096 não foram informativos. A deleção dos marcadores repetições CA e DXYS10093 foram confirmadas por MLPA.

Figura 9: Gráfico gerado pelo programa “Coffalyser” da análise do MLPA do paciente 1/DLW. A altura reduzida em aproximadamente 50% dos picos correspondentes aos éxons do *SHOX* indica a presença de uma deleção em heterozigose desta região. A região a jusante do gene, “*SHOX area*” está aparentemente conservada. A sonda denominada éxon 7, corresponde a uma região intrônica localizada entre os éxons 6a e 6b.

Figura 10: Gráfico gerado pelo programa “Coffalyser” da análise do MLPA da paciente 2/BED. A altura reduzida em aproximadamente 50% dos picos correspondentes aos éxons 4, 5 e 6a indica a presença de uma deleção em heterozigose desses éxons. Uma análise semelhante foi encontrada nos outros cinco indivíduos afetados clinicamente da família.

Figura 11: Heredograma da família da paciente 2/BED e um esquema com os haplótipos obtidos pela análise de microssatélites. Os indivíduos em preto apresentam DLW, enquanto que os em cinza apresentam apenas BED. Note que todos os indivíduos clinicamente afetados pela baixa estatura carregam o mesmo haplótipo.

Figura 12: Imagem do FISH da paciente 2/BED. Note a presença de dois sinais fluorescentes nos braços curtos dos cromossomos X. Os sinais estão presentes apesar da deleção intragênica que envolve os éxons 4, 5 e 6a determinada pelo MLPA em um dos alelos. Resultado semelhante foi observado em uma prima de segundo grau que apresenta DLW.

Ainda no grupo 2, cinco (25%) pacientes (1/BED, 5/BED, 8/BED, 9/BED e 17/BED) apresentaram deleções em regiões a jusante do gene, descritas como importantes na etiopatogenia da baixa estatura (Tabelas 8 e 9). Nos pacientes 1/BED, 8/BED e 17/BED a deleção detectada pela análise de microssatélites e por MLPA, estava localizada a cerca de 200 kb do *SHOX*, na região do marcador DXYS10096 (Tabela 9; Figura 13). A outra deleção a jusante do *SHOX* foi encontrada na região do marcador DXYS234, a aproximadamente 1.100 kb do gene, nas pacientes 5/BED e 9/BED (Tabela 9; Figura 14). Nestes dois casos, porém, o MLPA não foi capaz de confirmar a deleção, uma vez que nos “kits” utilizados não existe uma sonda específica para região em questão. A sonda mais próxima está localizada a aproximadamente 70 kb do marcador, o que não descartaria a presença de uma pequena deleção. Nestes cinco casos, a comparação com a análise do FISH não pôde ser realizada, uma vez que o cosmídio utilizado como sonda só avalia a região intragênica.

Figura 13: Na parte superior, à esquerda, o heredograma da família do paciente 1/BED e à direita, da paciente 8/BED. Na parte inferior, o paciente 17/BED. Os indivíduos em cinza apresentam baixa estatura desproporcionada. As regiões em preto indicam os segmentos deletados, e em cinza indicam uma análise não informativa. Nos três casos, os haplótipos obtidos pela análise de microssatélites indicam deleção do marcador DXYS10096. As deleções foram confirmadas por MLPA, que possui uma sonda para a mesma região.

Para confirmar a presença destas deleções localizadas a jusante do gene, nas regiões correspondentes aos marcadores DXYS10096 e DXYS234, foi realizado a PCR em tempo real para quantificação relativa do número de cópias. Esta técnica confirmou a deleção em heterozigose da região do marcador DXYS10096, nos três casos, pacientes 1/BED, 8/BED e 17/BED (Figura 15).

Figura 14: À esquerda, o heredograma da família da paciente 5/BED e à direita, da paciente 9/BED. O DNA do pai da paciente 5/BED não estava disponível para análise. Os indivíduos em cinza apresentam baixa estatura desproporcionada. As regiões em preto indicam os segmentos deletados, e em cinza indicam uma análise não informativa. Os haplótipos obtidos pela análise de microsatélites indicam deleção do marcador DXYS234.

Figura 15: Representação gráfica dos resultados do PCR em tempo real para quantificação relativa do número de cópias da região do marcador DXYS10096. Em verde, dois controles normais com duas cópias da região do marcador DXYS10096; em vermelho, um controle de deleção, que apresenta deleção desta região em um dos alelos; em tons de azul, as três famílias com deleção do marcador DXYS10096 pela análise de microsatélites. Os pacientes 1/BED, 8/BED e 17/DLW apresentam deleção em heterozigose da região analisada.

Com relação à região do marcador DXYS234, a quantificação por PCR em tempo real não confirmou a presença da deleção encontrada pela análise de microssatélites nos pacientes 5 e 9/BED (Figura 16). Diante destes resultados, foi realizado o seqüenciamento da região de hibridação dos “primers” utilizados para amplificação do microssatélite, para excluir a presença de polimorfismos que justificassem a não amplificação de um dos alelos. O seqüenciamento não mostrou nenhum polimorfismo nestas regiões.

Figura 16: Representação gráfica dos resultados do PCR em tempo real para quantificação relativa do número de cópias da região do marcador DXYS234. Em verde, dois controles normais com duas cópias da região do marcador DXYS234; em vermelho, um controle de deleção, que apresenta deleção desta região em um dos alelos; em tons de azul, as três famílias com deleção do marcador DXYS234 pela análise de microssatélites. Os pacientes 5/BED 9/BED e 1/DLW apresentam duas cópias da região analisada, o que descarta a presença de deleção em heterozigose.

4.2. Casos discordantes

Os resultados das três metodologias foram concordantes em 24 (92,3%) dos 26 casos, sendo cinco pacientes, portadores de DLW, com deleção do *SHOX* e 19, com BED, sem a presença da deleção. Nos dois casos discordantes, um com DLW e outro com BED, pelo menos uma das metodologias deixou de identificar a deleção. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 8.

O paciente 1/DLW apresentou uma deleção parcial de pelo menos 37 kb, envolvendo todos os éxons do *SHOX*, porém com uma região 3' UTR preservada. Esta deleção foi detectada tanto pelos microssatélites intragênicos, como pelo MLPA. O FISH realizado no paciente e em sua mãe, que também apresenta DLW, mostrou um resultado falso negativo para a deleção, uma vez que foram visualizados dois sinais fluorescentes (Figuras 8 e 9).

Este paciente ainda apresentou a perda do alelo materno do marcador DXYS234, sugerindo a deleção de um segundo fragmento localizado à jusante do gene (Figura 17). Por este motivo, também foi realizado o PCR em tempo real para a quantificação relativa da região. Esta deleção não foi confirmada neste paciente, assim como nos outros pacientes com BED (Figura 16). O seqüenciamento da região de hibridação dos “primers” utilizados para amplificar a região do marcador DXYS234 também não mostrou a presença de variantes alélicas.

A paciente 2/BED foi o segundo caso com resultados discordantes. Ela e os outros cinco membros afetados da família apresentaram uma

deleção em heterozigose dos éxons 4, 5 e 6a detectada por MLPA. Após uma análise da localização das sondas do MLPA e dos “primers” dos microssatélites, o tamanho dessa deleção pôde ser estimado entre 4 e 14 kb (Tabela 9).

Figura 17: Representação esquemática do mapa de deleção do paciente 1/DLW. O retângulo azul representa o gene *SHOX*; a região em preto, localizada dentro do gene, corresponde a deleção encontrada pelo MLPA e pelos marcadores de microssatélites repetições CA e DXYS10093; em vermelho, podem ser vistos a sonda do FISH e a possível região de hibridação que se encontra preservada. A segunda região em preto localizada a 3' do gene mostra uma segunda provável deleção, que foi detectada pelo marcador DXYS234.

Neste segundo caso, os marcadores de microssatélites, apesar de informativos, não detectaram a deleção. Eles apenas mostraram que todos os indivíduos afetados apresentaram o mesmo haplótipo, sugerindo um possível envolvimento da região do *SHOX* (Figura 11). O FISH também não foi capaz de detectar a deleção, mostrando dois sinais fluorescentes na paciente e em uma prima de segundo grau portadora de DLW (Figura 12).

Diante dos resultados discordantes obtidos entre as metodologias nestes dois casos, cujas deleções não foram detectadas pelo FISH, e levando em consideração o fato de que nenhuma redução na intensidade da

fluorescência foi observada, conforme tem sido descrito (37), a metodologia foi revista e foi realizada uma segunda reação. Este novo ensaio de FISH foi realizado sem o procedimento da amplificação do sinal, descrito no item 3.3.1.5, em uma tentativa de aumentar a sensibilidade da técnica.

No caso do paciente 1/DLW, uma nova reação realizada no material de sua mãe, que apresentou a mesma deleção, mostrou uma redução na intensidade do sinal correspondente a uma das sondas do *SHOX* (Figura 18). Esta diminuição do sinal sugere a presença de deleção de parte do gene em um dos alelos.

Figura 18: À esquerda, uma imagem do FISH da mãe do paciente 1/DLW, sem a amplificação do sinal. Note que um dos dois sinais fluorescentes encontra-se significativamente diminuído. Este padrão foi observado em todas as metáfases analisadas. À direita, uma imagem do FISH da paciente 2/BED sem a amplificação do sinal. Apesar da pequena deleção, não é possível notar diferença na intensidade dos sinais. O mesmo resultado foi observado nas imagens de sua prima de segundo grau também afetada.

No caso da paciente 2/BED, cuja deleção é menor, com no máximo 14 kb, a mesma redução não foi observada. O procedimento foi realizado tanto na paciente, como em sua prima de segundo grau, também

afetada, e aparentemente não houve diferença na intensidade dos sinais fluorescentes correspondentes ao *SHOX* nos dois casos (Figura 18).

Um terceiro caso, que no início se mostrou aparentemente discordante foi o discordante foi o da paciente 6/DLW. Na análise do FISH, apenas um sinal fluorescente foi visualizado, sugerindo a deleção. Em contrapartida, o resultado do marcador repetições CA, que é o mais utilizado para a investigação de deleções do *SHOX*, mostrou a presença de dois alelos, o que descartaria a deleção. Porém a análise dos outros marcadores intragênicos e o resultado do MLPA comprovaram a presença da deleção, que estava localizada a 3' do marcador repetições CA.

4.3. Comparação entre as metodologias

O MLPA apresentou 100% de sensibilidade, enquanto a análise de microssatélites apresentou 90%. A sensibilidade do FISH passou de 71% para 86% quando o procedimento de amplificação do sinal deixou de ser realizado.

A especificidade do FISH foi de 100%. Considerando que a região do marcador DXYS10096 estava deletada em três pacientes e que a deleção da região do marcador DXYS234 não foi confirmada, a especificidade do MLPA foi de 100%, enquanto a dos microssatélites foi de 88%.

As três metodologias ainda foram comparadas quanto ao custo, tempo total para execução do exame e tamanho da região analisada. Os resultados dessa análise estão resumidos na Tabela 10.

O MLPA apresentou o menor custo, enquanto o FISH apresentou o maior. Nos cálculos de custo foram incluídos os reagentes e materiais utilizados na realização do exame e custo médio dos serviços técnicos exigidos para cada etapa do processo. O valor dos equipamentos utilizados não foi incluído no custo de cada exame. A relação dos equipamentos de grande porte essenciais para a realização de cada uma das técnicas está apresentada na Tabela 11.

Tabela 10: Comparação entre as três metodologias utilizadas para detecção de deleção do *SHOX* quanto ao custo, tempo de execução e tamanho da região analisada

	Região analisada (kb)	Tempo de execução (h)	Custo (R\$)		
			Reagentes	Serviços técnicos	Total
FISH	~40	186	230,00	350,00	580,00
Microsatélites					
3 marcadores*	~46	40	142,00	130,00	272,00
6 marcadores	~1100	55	229,00	175,00	404,30
MLPA	~1300	47	102,00	115,00	217,00

* Os dados da análise de microsatélites de três marcadores correspondem ao estudo dos três marcadores intragênicos.

O FISH foi a metodologia mais demorada, podendo levar até oito dias para obtenção dos resultados. Essa demora foi decorrente dos procedimentos de cultura de linfócitos de sangue periférico para obtenção das metáfases, que facilitam o estudo, e de longas incubações. Os tempos

de execução do MLPA e da análise de microssatélites foram semelhantes e muito inferiores ao FISH, uma vez que estas metodologias são baseadas em amplificação por PCR, sendo consideradas bem mais simples.

Tabela 11: Custo dos equipamentos de grande porte essenciais para a realização das três metodologias para detecção das deleções do *SHOX*

Metodologia	Equipamentos de grande porte	Custo (R\$)	Custo total (R\$)
FISH	Microscópio com fluorescência	140.000	304.000
	Sistema para captura de imagens	164.000	
Microssatélites e MLPA	Termociclador	26.500	328.700
	Seqüenciador automático com software para análise	302.200	

Com relação ao tamanho da região analisada, o estudo por FISH com apenas esta sonda, ficou restrito a uma região de aproximadamente 40 kb. As regiões analisadas pelo estudo de seis marcadores de microssatélites e pelo MLPA foram relativamente semelhantes, com a ressalva de que o MLPA apresenta 21 sondas dentro deste intervalo, contra seis da análise por microssatélites.

4.4. Mutações de ponto do *SHOX*

Todos os pacientes que não apresentaram deleções do *SHOX* foram submetidos ao seqüenciamento para detecção de possíveis mutações de ponto. No grupo 2, foram encontradas três (15%) variantes alélicas.

A paciente 3/BED apresentou uma substituição, em heterozigose, de uma citosina por uma adenina no último nucleotídeo do códon 35 no éxon 2

(p.Tyr35X), que resulta na substituição de uma tirosina por um códon prematuro de parada, gerando uma proteína truncada (Figura 19). Esta mesma mutação foi encontrada em 14 membros afetados dentre 22 indivíduos analisados da família da paciente.

Figura 19: À esquerda, o eletroferograma do seqüenciamento da paciente 3/BED mostrando a substituição, em heterozigose, de uma citosina por uma adenina no último nucleotídeo do códon 35 no éxon 2, que resulta na mutação p.Tyr35X. À direita, o eletroferograma do seqüenciamento de um controle normal (CN).

O paciente 14/BED apresentou uma substituição de uma guanina por uma adenina, em heterozigose, na posição 531 no éxon 3, que resulta na substituição de uma arginina por uma histidina, no códon 147 (p.Arg147His), na região do homeodomínio (Figura 20). O pai do paciente, que também apresenta baixa estatura, apresentou a mesma mutação, em heterozigose. Um estudo realizado com a enzima de restrição *BssSI* (New England, Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA) não encontrou essa variação alélica em 71 indivíduos controles com altura normal (29).

Na paciente 16/BED foi encontrada uma substituição, em heterozigose, de uma timina por uma citosina no íntron 4, 10 nucleotídeos antes do início do éxon 5 (NM_000451:c.1236 -10T>C) (Figura 21). A mãe da paciente, que também apresenta baixa estatura, é portadora da mesma variante alélica. Esta variante não foi encontrada no DNA genômico de 160

indivíduos controles estudados com a enzima de restrição *Hpy188III* (New England, Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA) (Figura 22).

Figura 20: À esquerda, o eletroferograma do seqüenciamento realizado com “primer” reverso do paciente 14/BED mostrando a substituição, em heterozigose, de uma guanina por uma adenina na posição 531 no éxon 3, que resulta na substituição de uma arginina por uma histidina (p.Arg147His). À direita, o eletroferograma do seqüenciamento de um controle normal (CN).

Figura 21: À esquerda, o eletroferograma do seqüenciamento realizado com “primer” reverso da paciente 16/BED mostrando a variante alélica NM_000451:c.1236 -10T>C no íntron 4, em heterozigose. À direita, o eletroferograma do seqüenciamento de um controle normal (CN).

Figura 22: Digestão com a enzima de restrição *Hpy188III* do produto amplificado dos éxons 4 e 5. CN: indivíduos controles normais; M: marcador de peso molecular 1 kb “DNA ladder”; ND: produto amplificado não digerido; p16: paciente portadora da variante NM_000451:c.1236 -10T>C.

Para avaliar o efeito dessa mutação sobre o sítio acceptor de “splicing” no íntron 4 foi utilizado um programa preditor de sítios de “splicing” (Splice Site Prediction by Neural Network – <http://www.fruitfly.org/>). A comparação da seqüência mutada com o banco de seqüências de sítios de “splicing” do “site” mostrou que essa substituição de uma timina por uma citosina não altera o sítio usual, mas resulta na diminuição o escore do sítio preferencial de 0,70 para 0,54.

DISCUSSÃO

5.1. Frequência das alterações do *SHOX*

A haploinsuficiência do *SHOX* é a principal responsável pelo fenótipo da DLW, estando presente também em alguns casos de BEI. Os trabalhos publicados relatam que 50 a 90% (23-30) dos pacientes com DLW apresentam algum tipo de mutação no *SHOX*, e cerca de 2/3 dessas mutações correspondem a deleções do gene (48, 50). De acordo com os dados encontrados na literatura, 100% dos pacientes com DLW avaliados no presente estudo apresentou deleção em heterozigose do gene, o que justificaria o fenótipo da DLW.

Com relação aos pacientes com BEI, a literatura relata diferentes taxas de mutações no *SHOX*, que variam de 2 a 15% (29, 31-35). Essa grande variação pode ser resultante de fatores, como a metodologia utilizada para detectar essas mutações, o número de pacientes avaliados e até mesmo os critérios de seleção do estudo. Jorge e colaboradores demonstraram que a incidência de mutações subiu de 3,2% para 22% quando o critério de seleção passou de simples baixa estatura para baixa estatura com desproporção corpórea (29). No grupo 2, composto por 20 pacientes com BED, quatro (20%) apresentaram alterações no gene *SHOX*, sendo uma deleção intragênica e três mutações de ponto.

A paciente 2/BED, que faz parte de uma família que possui vários membros com baixa estatura desproporcionada, alguns inclusive com deformidade de Madelung, apresentou uma deleção intragênica envolvendo os éxons 4, 5 e 6a. Deleções envolvendo estes mesmos éxons, também

detectadas por MLPA, foram descritas recentemente por dois grupos. Benito-Sanz e colaboradores, estudando 47 pacientes europeus com DLW, encontraram deleções envolvendo o *SHOX* em todos eles, sendo quatro deleções intragênicas. A menor deleção descrita neste trabalho envolvia os mesmos éxons deletados na paciente 2/BED (50). Fukami e colaboradores descreveram três deleções intragênicas em um grupo de seis pacientes japoneses com DLW. Entre elas, uma também envolvia os éxons 4, 5 e 6a (52).

A paciente 3/BED apresentou a mutação p.Tyr35X, caracterizada pela substituição de uma citosina por uma adenina no último nucleotídeo do códon 35 no éxon 2. Esta troca resulta em um códon de parada originando uma proteína truncada. A mutação foi encontrada em outros 14 membros da família dentre os 22 indivíduos analisados. Uma grande variabilidade fenotípica foi encontrada nos indivíduos adultos portadores desta mutação. Enquanto alguns apresentam apenas baixa estatura com desproporção corpórea, outros apresentam também deformidade de Madelung (29).

A mutação p.Arg147His, identificada no paciente 14/BED, está localizada em uma região importante que codifica o homeodomínio. Este é responsável pela ligação da proteína *SHOX* a outras seqüências de DNA específicas, essencial para que a sua função de ativador transcricional seja exercida. A arginina em questão é conservada entre as espécies. Esta mutação foi previamente descrita em uma paciente com baixa estatura familiar levemente desproporcionada, sem alterações ósseas pelo exame radiográfico (29).

A mutação intrônica NM_000451:c.1236 -10T>C encontrada na paciente 16/BED, ainda não descrita na literatura, aparentemente não modifica o sítio de “splicing”, mas reduz o escore do sítio acceptor de 0,70 para 0,54. Esta redução poderia afetar o processamento do mRNA resultando em uma proteína anômala. Entretanto, estudos funcionais devem ser realizados para a confirmação desta hipótese.

Outros cinco (25%) pacientes do grupo 2 (1/BED, 5/BED, 8/BED, 9/BED e 17/BED) apresentaram deleções a 3' do gene, na denominada “área do *SHOX*”, reconhecida por sua importância na regulação positiva da expressão da proteína do *SHOX* (48, 50). Nos últimos anos foram publicados trabalhos que enfatizam a necessidade de estudos moleculares desta região nos indivíduos com fenótipos de baixa estatura. Em 2006, foi descrito um provável “enhancer”, a jusante do *SHOX*, em uma região evolutivamente conservada de aproximadamente 800 pb (51). Este trabalho sugere uma possível interação entre esta região e o promotor do gene *SHOX* localizado no éxon 2 (51). Outro trabalho, que propôs um modelo animal, descreveu oito elementos não gênicos altamente conservados localizados na “área do *SHOX*” que seriam importantes na regulação da expressão deste gene no tecido (30).

A deleção da região do marcador DXYS10096, incluída em um intervalo comum de deleção descrito por Benito-Sanz e colaboradores (48), encontrada nos pacientes 1/BED, 8/BED e 17/BED, pela análise de microssatélites e MLPA, foi confirmada pelo PCR em tempo real. Através da análise de quantificação relativa, apenas uma cópia desta região foi

detectada, confirmando a perda de um dos alelos nestes pacientes. A deleção em heterozigose desta região também foi encontrada em um indivíduo controle com 178 cm de altura. Este achado questiona o papel da deleção isolada da região do marcador DXYS10096 na etiologia da baixa estatura.

A quantificação por PCR em tempo real da região do marcador DXYS234, que estava deletado em heterozigose nos pacientes 1/DLW, 5/BED e 9/BED, também foi realizada. Esta análise, porém não confirmou a presença de deleção de um dos alelos. O seqüenciamento da região de hibridação dos “primers” também não identificou nenhuma variante alélica que pudesse justificar a ausência de amplificação do marcador. Desta forma, uma hipótese para explicar este fato, seria a presença da deleção da região das repetições, mas não da região analisada pelo PCR em tempo real, cerca de 140 pb a jusante das repetições. Outra justificativa para a ausência de um dos alelos seria a presença de alguma mutação na região do próprio marcador no paciente que resultou em um número de repetições distinto dos pais. A taxa de mutação nas regiões dos microssatélites é superior à taxa normal de mutação, da ordem de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por “locus” por geração (64). Esta maior taxa de mutação pode ser explicada por um “crossing over” desigual decorrente de emparelhamento desigual da região de repetições, seguido por uma recombinação ou ainda pelo “slippage” da polimerase durante a replicação do DNA (64).

Sendo assim, no grupo 2, sete (35%) pacientes apresentaram algum tipo de alteração molecular no *SHOX* ou em regiões possivelmente

relacionadas a sua regulação, sendo uma deleção intragênica, três mutações de ponto e duas deleções a jusante do gene, na região do marcador DXYS10096. Se as deleções da região do marcador DXYS234 fossem confirmadas, este número subiria para nove pacientes, que resultaria em 45% dos casos. Esta frequência está acima da encontrada na literatura (29, 32-35). Estas alterações poderiam estar relacionadas ao fenótipo da baixa estatura, porém, estudos funcionais seriam fundamentais para definir o papel das mutações p.Arg147His e NM_000451:c.1236-10T>C e ainda da deleção isolada dos marcadores DXYS10096 e DXYS 234 na patogênese da baixa estatura.

5.2. Comparação entre as metodologias

Analisando os dois grupos, foram encontradas sete deleções envolvendo o gene *SHOX*. A técnica de FISH detectou cinco (71,4%) deleções utilizando o procedimento de amplificação do sinal. No caso do paciente 1/DLW, cuja deleção se estendia até o éxon 6b, a sonda fluorescente hibridou com o fragmento preservado a 3' do gene, apesar da presença da deleção (Figuras 8 e 17). Esta deleção parcial apresentou cerca de 37 kb, ocupando aproximadamente 23 kb dentro da região de hibridação da sonda. Por se tratar de uma sonda relativamente grande, com cerca de 40 kb, esse tipo de hibridação pode acontecer gerando resultados falso-negativos para deleções de porções pequenas. O mesmo aconteceu com a

paciente 2/BED que apresentou a deleção intragênica de aproximadamente 4 a 14 kb (Figura 12).

Com base nesses dois resultados, a metodologia do FISH foi revista e modificada. O procedimento de amplificação do sinal, que poderia contribuir para a redução da sensibilidade, não foi realizado. No caso do paciente 1/DLW, foi verificada uma redução na intensidade do sinal de uma das sondas do *SHOX* na nova reação, comprovando o fato de que a amplificação, apesar de facilitar a visualização das sondas, pode comprometer a sensibilidade da técnica (Figura 18). Quando o procedimento de amplificação do sinal deixou de ser realizado, a sensibilidade aumentou de 71% para 86%.

No caso da paciente 2/BED, portadora da deleção intragênica, nenhuma redução de sinal foi observada no FISH realizado sem a amplificação do sinal (Figura 18). A região perdida neste caso apresenta no máximo 14 kb, reforçando a idéia de que, independente do procedimento, deleções pequenas não podem ser detectadas por FISH.

Esses dois exemplos demonstram que a ausência de deleção do *SHOX* por FISH, nem sempre exclui a presença de deleções de porções menores. Esta afirmação torna-se mais verdadeira quando se utiliza uma única sonda. Nesses casos, portanto, é essencial a utilização de outras metodologias mais sensíveis para complementar o estudo molecular.

Além desta relativa falta de sensibilidade, a técnica de FISH é uma metodologia bastante trabalhosa que utiliza reagentes e equipamentos de custo elevado. Outra grande desvantagem é o tempo de execução, que

pode chegar a oito dias, e a necessidade de um treinamento técnico rigoroso.

A análise de microssatélites mostrou-se bastante útil na detecção das deleções, mostrando uma sensibilidade de 90%. O painel de marcadores intragênicos foi capaz de detectar seis das sete deleções encontradas no gene *SHOX*. A deleção intragênica foi a única deleção não detectada por essa técnica, uma vez que nenhum dos marcadores estavam localizados na região deletada.

Em uma análise individual dos marcadores intragênicos, ficou nítido que nenhum dos três isoladamente foi capaz de identificar todas as deleções. O marcador repetições CA, normalmente o mais utilizado no estudo molecular das deleções do *SHOX* por ser bastante polimórfico (29, 33, 35, 49, 61), não foi capaz de identificar a deleção na paciente 6/DLW, ou seja, em um (16,7%) dos seis casos do grupo 1. A paciente é heterozigota para esse marcador, porém apresenta uma deleção localizada a 3' do mesmo, de no máximo 200 kb. O único marcador capaz de detectar sua deleção foi o DXYS10093. O DYS290 não foi informativo (Tabela 8). O FISH desta paciente mostrou nitidamente a deleção, uma vez que apenas um sinal foi visualizado.

O marcador DXYS290 não se mostrou polimórfico. O grau de heterozigose de 63% é considerado baixo. Ele detectou a deleção apenas em três (50%) dos seis casos do grupo 1, não sendo informativo nos outros três. Uma análise dos microssatélites do grupo 2 mostrou que esse marcador não foi informativo em sete (35%) dos 20 pacientes. Ainda no

grupo 2, o marcador DXYS10093 não foi informativo em 4 (20%) casos e o repetições CA apenas 2 (10%), o que condiz com o grau de heterozigose descrito na literatura (48, 61) (Tabela 4).

De forma geral, como o *SHOX* é um gene relativamente grande, com cerca de 40 Kb, é fundamental o estudo de vários marcadores de microssatélites para abranger toda sua região. Neste estudo, foram analisados três marcadores intragênicos, mas esse número foi insuficiente para identificar uma deleção que envolvia os éxons 4, 5 e 6a. A necessidade de se estudar muitos marcadores é uma desvantagem, uma vez que aumenta consideravelmente o custo e o tempo de execução do estudo.

Outra grande desvantagem da análise de microssatélites é a dependência da análise do DNA dos progenitores quando o paciente apresenta apenas um alelo. Nestes casos, o estudo dos pais é essencial para definir a origem desse alelo e concluir se o paciente apresenta uma deleção ou se é homozigoto para o marcador. Em alguns casos, mesmo após este estudo, a análise continua não sendo informativa. Isso ocorre quando o único alelo presente no paciente também está presente em ambos os pais. Mais uma vez, não é possível excluir a deleção. Por esse motivo, um dos aspectos a ser considerado é o fato dos marcadores apresentarem elevado grau de heterozigose e serem suficientemente polimórficos.

O MLPA foi a metodologia mais sensível para o estudo das deleções detectando as sete deleções que envolveram o gene *SHOX*, além de outras três localizadas a jusante do gene, na região do marcador DXYS10096. As únicas deleções não detectadas por MLPA foram aquelas localizadas na

região do marcador DXYS234, também a 3' do gene, mas que não foram confirmadas pelo PCR em tempo real. Esta técnica foi capaz de detectar desde deleções extensas até aquelas menores, como a deleção intragênica de 4 a 14 kb, não identificada por nenhuma outra metodologia.

Trata-se de uma metodologia relativamente simples, que utiliza DNA genômico e com estes “kits” analisa, em uma única reação, uma região de aproximadamente 1.300 kb dentro da PAR1. Sua análise não depende do DNA dos pais e possibilita estimar a extensão das deleções. Sua principal desvantagem é que se trata de uma análise quantitativa indireta, o que acaba aumentando a possibilidade de interferentes. A presença de variantes alélicas na região de hibridação das sondas pode resultar em falsas deleções. E assim como a análise de microssatélites, para sua realização é necessário a aquisição um seqüenciador automático.

Além de maior sensibilidade e do menor custo, o tempo de execução do MLPA se aproximou muito do tempo gasto para a realização do painel completo de marcadores de microssatélites. A região analisada pelo MLPA dentro da PAR1 foi aproximadamente 1.300 kb, comparável aos 1.100 kb analisados pelos microssatélites, entretanto o “kit” MLPA possui 21 sondas dentro dessa região, enquanto a análise de microssatélites realizada utiliza apenas seis marcadores, o que torna a análise do MLPA mais sensível.

Na maioria dos casos estudados não houve grandes discordâncias entre as metodologias. O FISH e o painel de microssatélites deixaram de detectar uma deleção. Grande parte das dúvidas foi decorrente da análise não informativa dos microssatélites.

A inclusão do estudo do *SHOX* na rotina de investigação das causas de baixa estatura tem sido cada vez mais freqüente, exigindo que os laboratórios busquem técnicas sensíveis, aplicáveis a rotina e viáveis financeiramente. O estudo de alterações moleculares do *SHOX* não se resume ao “screening” de deleções e mutações do gene, mas envolve a análise de possíveis regiões regulatórias localizadas próximas a ele. A análise de toda esta região, de aproximadamente 1.300 kb, pela técnica de FISH exigiria a utilização de várias sondas, que resultaria em um aumento substancial de tempo e custo. O mesmo pode ser dito em relação ao estudo por microssatélites, que implicaria na utilização de um grande painel de marcadores. Deste modo, a triagem inicial por MLPA parece ser a melhor opção. Suas sondas, localizadas dentro dos éxons, permitem a detecção de deleções intragênicas, que podem ser perdidas pelo FISH ou pelos microssatélites. Além disso, as sondas localizadas a jusante do gene possibilitam a triagem de uma grande região com potencial regulatório, podendo direcionar estudo posteriores.

Na ausência de deleções do *SHOX* está indicado o seqüenciamento deste gene para a exclusão de possíveis mutações de ponto, pequenas deleções ou inserções em regiões codificadoras ou em sítios de “splicing”.

Na ausência destas alterações, seria interessante investigar possíveis alterações em regiões promotoras, regulatórias ou ainda o envolvimento de outros genes na determinação da estatura.

CONCLUSÕES

1. A técnica de MLPA foi considerada a melhor metodologia para investigação de deleções do gene *SHOX*, por apresentar maior sensibilidade, menor custo e tempo de execução. Desta forma, sua utilização está indicada para o início da investigação molecular dos pacientes com discondrosteose de Léri-Weill ou baixa estatura desproporcionada.
2. Deleções do gene *SHOX* foram identificadas em 100% dos pacientes com discondrosteose de Léri-Weill e em 5% dos pacientes com baixa estatura desproporcionada.
3. Mutações de ponto no gene *SHOX* foram encontradas em 15% dos pacientes com baixa estatura desproporcionada, sendo duas já descritas anteriormente (p.Tyr35X e p.Arg147His) e a terceira uma nova mutação (NM_000451:c.1236 -10T>C).

REFERÊNCIAS

1. Salgado LR, Stefan, V., Nicolau, W., Wajchenberg, B.L. . Distúrbios de crescimento. Tratado de Endocrinologia Clínica. São Paulo: Roca; 1992.
2. Jacobs PA, Harnden DG, Buckton KE, Brown WM, King MJ, Mc BJ, et al. Cytogenetic studies in primary amenorrhoea. *Lancet*1961 Jun 3;1(7188):1183-9.
3. Goldman B, Polani PE, Daker MG, Angell RR. Clinical and cytogenetic aspects of X-chromosome deletions. *Clin Genet*1982 Jan;21(1):36-52.
4. Fisher EM, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Lawrence JB, et al. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell*1990 Dec 21;63(6):1205-18.
5. Rouyer F, Simmler MC, Johnsson C, Vergnaud G, Cooke HJ, Weissenbach J. A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Nature*1986 Jan 23-29;319(6051):291-5.
6. Rouyer F, Simmler MC, Vergnaud G, Johnsson C, Leveilliers J, Petit C, et al. The pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*1986;51 Pt 1:221-8.
7. Filatov DA, Gerrard DT. High mutation rates in human and ape pseudoautosomal genes. *Gene*2003 Oct 23;317(1-2):67-77.
8. Ballabio A, Bardoni B, Carrozzo R, Andria G, Bick D, Campbell L, et al. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*1989 Dec;86(24):10001-5.
9. Ogata T, Goodfellow P, Petit C, Aya M, Matsuo N. Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to DXYS15: localisation of a growth gene(s) in the pseudoautosomal region. *J Med Genet*1992 Jul;29(7):455-9.
10. Ogata T, Yoshizawa A, Muroya K, Matsuo N, Fukushima Y, Rappold G, et al. Short stature in a girl with partial monosomy of the pseudoautosomal region distal to DXYS15: further evidence for the assignment of the critical region for a pseudoautosomal growth gene(s). *J Med Genet*1995 Oct;32(10):831-4.
11. Souza SC. Estudo das mutações e deleções do gene SHOX em pacientes com baixa estatura idiopática, discondrosteose e síndrome de Noonan. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.

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 May;16(1):54-63.
13. Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet*1997 Aug;6(8):1341-7.
14. Munns CJ, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, Rappold G, et al. Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab*2004 Aug;89(8):4130-5.
15. Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, Rappold GA. The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet*2001 Dec 15;10(26):3083-91.
16. Blaschke RJ, Topfer C, Marchini A, Steinbeisser H, Janssen JW, Rappold GA. Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J Biol Chem*2003 Nov 28;278(48):47820-6.
17. Blaschke RJ, Rappold GA. SHOX: growth, Leri-Weill and Turner syndromes. *Trends Endocrinol Metab*2000 Aug;11(6):227-30.
18. Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet*2000 Mar 22;9(5):695-702.
19. 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 Jul 15;128(2):179-84.
20. Marchini A, Hacker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, et al. BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet*2007 Dec 15;16(24):3081-7.
21. Rosenfeld RG. A SHOX to the system. *J Clin Endocrinol Metab*2001 Dec;86(12):5672-3.
22. Grigeliuniene 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 Aug;107(2):145-9.
23. Ross JL, Scott C, Jr., Marttila P, Kowal K, Nass A, Papenhausen P, et al. Phenotypes Associated with SHOX Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*2001 Dec;86(12):5674-80.

24. Cormier-Daire V, Huber C, Munnich A. Allelic and nonallelic heterogeneity in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Am J Med Genet* 2001 Winter;106(4):272-4.
25. 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 Oct;39(10):758-63.
26. 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 Nov;109(5):551-8.
27. 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 Jan;8(1):54-62.
28. Blaschke RJ, Rappold G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr Opin Genet Dev* 2006 Jun;16(3):233-9.
29. Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Liborio DC, Kim CA, et al. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007 Jan;66(1):130-5.
30. Sabherwal N, Bangs F, Roth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, et al. 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 Jan 15;16(2):210-22.
31. 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 Mar;87(3):1402-6.
32. 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 Oct;88(10):4891-6.
33. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V. High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet* 2006 Sep;43(9):735-9.
34. Morizio E, Stuppia L, Gatta V, Fantasia D, Guanciali Franchi P, Rinaldi MM, et al. Deletion of the SHOX gene in patients with short stature of unknown cause. *Am J Med Genet A* 2003 Jun 15;119A(3):293-6.

35. 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 May;44(5):306-13.
36. Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, et al. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* 1998 May;19(1):67-9.
37. 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 May;19(1):70-3.
38. Huber C, Cusin V, Le Merrer M, Mathieu M, Sulmont V, Dagoneau N, et al. SHOX point mutations in dyschondrosteosis. *J Med Genet* 2001 May;38(5):323.
39. Musebeck J, Mohnike K, Beye P, Tonnies H, Neitzel H, Schnabel D, et al. Short stature homeobox-containing gene deletion screening by fluorescence in situ hybridisation in patients with short stature. *Eur J Pediatr* 2001 Sep;160(9):561-5.
40. Falcinelli C, Iughetti L, Percesepe A, Calabrese G, Chiarelli F, Cisternino M, et al. SHOX point mutations and deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Med Genet* 2002 Jun;39(6):E33.
41. Binder G, Renz A, Martinez A, Keselman A, Hesse V, Riedl 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 Sep;89(9):4403-8.
42. Schneider KU, Sabherwal N, Jantz K, Roth R, Muncke N, Blum WF, et al. Identification of a major recombination hotspot in patients with short stature and SHOX deficiency. *Am J Hum Genet* 2005 Jul;77(1):89-96.
43. Binder G, Schwarze CP, Ranke MB. Identification of short stature caused by SHOX defects and therapeutic effect of recombinant human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Jan;85(1):245-9.
44. Stuppia L, Calabrese G, Gatta V, Pintor S, Morizio E, Fantasia D, et al. SHOX mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature. *J Med Genet* 2003 Feb;40(2):E11.
45. Binder G, Eggermann T, Enders H, Ranke MB, Dufke A. Tall stature, gonadal dysgenesis, and stigmata of Turner's syndrome caused by a structurally altered X chromosome. *J Pediatr* 2001 Feb;138(2):285-7.
46. Ogata T, Kosho T, Wakui K, Fukushima Y, Yoshimoto M, Miharuru N. Short stature homeobox-containing gene duplication on the der(X)

- chromosome in a female with 45,X/46,X, der(X), gonadal dysgenesis, and tall stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Aug;85(8):2927-30.
47. Ogata T. SHOX: pseudoautosomal homeobox containing gene for short stature and dyschondrosteosis. *Growth Horm IGF Res* 1999 Jun;9 Suppl B:53-7; discussion 7-8.
 48. Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, et al. A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 2005 Oct;77(4):533-44.
 49. Zinn AR, Ramos P, Ross JL. A second recombination hotspot associated with SHOX deletions. *Am J Hum Genet* 2006 Mar;78(3):523-5.
 50. Benito-Sanz S, Gorbenko del Blanco D, Huber C, Thomas NS, Aza-Carmona M, Bunyan D, et al. Characterization of SHOX deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet* 2006 Aug;79(2):409-14; author reply 14.
 51. Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet* 2006 Jan;78(1):167-70.
 52. Fukami M, Dateki S, Kato F, Hasegawa Y, Mochizuki H, Horikawa R, et al. Identification and characterization of cryptic SHOX intragenic deletions in three Japanese patients with Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Hum Genet* 2008;53(5):454-9.
 53. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002 Jun 15;30(12):e57.
 54. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child* 1966;41(219):454-71.
 55. Gerver WJM, Bruin R. *Paediatric Morphometrics. A reference manual.* 2nd ed. Maastricht: Universitaire Pers Maastricht; 2001.
 56. Herdman RC, Langer LO, Good RA. Dyschondrosteosis. The most common cause of Madelung's deformity. *J Pediatr* 1966 Mar;68(3):432-41.

-
57. Langer LO, Jr. Dyschondrosteosis, a Hereditary Bone Dysplasia with Characteristic Roentgenographic Features. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*1965 Sep;95:178-88.
 58. Beiguelman B. A multiplicação das células somáticas humanas. *Citogenética Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986.
 59. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*1988 Feb 11;16(3):1215.
 60. Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniatis, T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor 1989.
 61. Ezquieta B, Cueva E, Oliver A, Gracia R. SHOX intragenic microsatellite analysis in patients with short stature. *J Pediatr Endocrinol Metab*2002 Feb;15(2):139-48.
 62. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*1996 Mar 14;380(6570):152-4.
 63. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*2001 Dec;25(4):402-8.
 64. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*2002 Dec;11(12):2453-65.

APÊNDICE

Cryptic Intragenic Deletion of the *SHOX* Gene in a Family with Léri-Weill Dyschondrosteosis Detected by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

ABSTRACT

LWD is associated to *SHOX* haploinsufficiency, in most cases, due to gene deletion. Generally FISH and microsatellite analysis are used to identify *SHOX* deletion. MLPA is a new method of detecting gene copy variation, allowing simultaneous analysis of several regions. Here we describe the presence of a *SHOX* intragenic deletion in a family with LWD, analyzed through different methodologies. Genomic DNA of 11 subjects from one family were studied by microsatellite analysis, direct sequencing and MLPA. FISH was performed in two affected individuals. Microsatellite analysis showed that all affected members shared the same haplotype suggesting the involvement of *SHOX*. MLPA detected an intragenic deletion involving exons IV-VIa, which was not detected by FISH and microsatellite analysis. In conclusion, the MLPA technique was proved to be the best solution on detecting this small deletion, it has the advantage of being less laborious also allowing the analysis of several regions simultaneously. (Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8:1381-1386)

Keywords: Léri-Weill Dyschondrosteosis, *SHOX*, intragenic deletion, MLPA

RESUMO

Deleção Críptica Intragênica do Gene *SHOX* em uma Família com Discondrosteose de Léri-Weill Detectada por Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA).

Discondrosteose de Léri-Weill (DLW) está associada à haploinsuficiência do gene *SHOX* resultante, principalmente, de deleções. Geralmente, o FISH e a análise de microssatélites são os métodos utilizados para a identificação destas deleções. MLPA é um novo método para detectar variações do número de cópias gênicas, permitindo uma análise simultânea de várias regiões. Aqui, descrevemos uma pequena deleção intragênica no *SHOX* em uma família com DLW analisada por diferentes metodologias. DNA genômico de 11 membros de uma família foram estudados por microssatélites, seqüenciamento direto e MLPA. FISH foi realizado em dois indivíduos afetados. Os microssatélites demonstraram que todos os membros afetados apresentavam o mesmo haplotipo, sugerindo o envolvimento do *SHOX*. MLPA identificou uma deleção intragênica envolvendo os éxons IV-VIa, que não foi detectada pelo FISH e pelos microssatélites. Conclui-se que o MLPA demonstrou melhor resolução para detectar esta pequena deleção, com a vantagem de ser menos trabalhoso e permitir a análise de várias regiões simultaneamente. (Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8:1381-1386)

Descritores: Discondrosteose de Léri-Weill; *SHOX*; Deleção intragênica; MLPA

perspectives

MARIANA F. A. FUNARI
ALEXANDER A. L. JORGE
EMILIA M. PINTO
IVO J. P. ARNHOLD
BERENICE B. MENDONCA
MIRIAN Y. NISHI

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), São Paulo, SP, Brazil.

Received in 25/8/2008
Accepted in 2/10/2008

INTRODUCTION

In 1997, two independent groups identified a gene related to stature (1,2): short stature homeobox containing gene (*SHOX*) [MIM 312865], located within the pseudoautosomal region 1 (PAR 1) of the short arms of sex chromosomes. They found it to be composed of 7 exons and having about 40 Kb (3).

This gene belongs to a family of genes that encode a cell-specific homeodomain protein of the paired like type involved in cell cycle and growth regulation (4). This protein, expressed in high levels in osteogenic cells, binds to DNA in a sequence-specific manner and acts as a transcriptional activator, regulating the expression of others genes also involved in growth process (4). *SHOX* protein may also function as a repressor of chondrocytes differentiation within the growth plate, then *SHOX* haploinsufficiency may result in premature terminal differentiation of proliferative chondrocytes, with progression to the hypertrophic phenotype and accelerated growth plate fusion (5).

SHOX haploinsufficiency is associated to Turner-like phenotype, Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and also idiopathic short stature. LWD [MIM 127300] is a dominant inherited skeletal dysplasia characterized by disproportionate short stature, mesomelic limb shortening and the Madelung deformity of the forearm, with bowing of the radius and dorsal dislocation of the distal ulna (6). The genotype-phenotype correlation is weak and incomplete expression in families with LWD has been demonstrated, with some patients carrying *SHOX* mutations, only presenting short stature without the Madelung deformity (7). Heterozygous defects in *SHOX* have been identified in 56-100% of LWD cases. Variability in the detection rates can often be explained by differences in cohort composition, clinical criteria or mutation detecting methods (7).

About two thirds of *SHOX* gene defects are caused by deletions (8). Fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, microsatellite analysis and Southern blotting are the most common techniques used to identify these deletions. Recently, a new methodology was developed to detect gene copy variation, the Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). It is based on the simultaneous hybridization of several probes followed by a multiplex PCR amplification. In one reaction, different regions within and around the gene are analyzed (9).

In the present study, we describe the presence of *SHOX* intragenic deletion in a family with LWD, evaluated through several distinct molecular strategies including MLPA technique.

PATIENTS

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital das Clinicas of the University of Sao Paulo Medical School, University of Sao Paulo. The patients or tutors gave their written informed consent.

The index case is an apparently healthy Brazilian girl of mixed ethnicity, with short stature noticed by her parents at 6 years of age. She was born at term by vaginal delivery after an uneventful pregnancy, with normal birth weight (3,600 g). She is the first child of nonconsanguineous parents. Both parents are short, her father's height is 159 cm (-2.4 SD) and her mother's height is 149 cm (-2.2 SD). The patient was referred to our hospital at 11 years of age. At that time, she was prepubertal and presented with short stature (height standard deviation score [SDS] = -3.4) and normal weight (body mass index SDS = 0.6). Physical examination disclosed a high arched palate, cubitus valgus, disproportional body proportion with short limbs (sitting height:height for age SDS = +4.5) and mesomelia (upper and lower arm length SDS of -4.7 and -5.5, respectively). No Madelung or other skeletal deformity was observed in the patient and in her first-degree relatives. Her father was not available for better phenotype characterization. However, a careful review of her family history identified 1 aunt and 2 second-degree relatives (Figure 1) from paternal side with disproportionate short stature and Madelung deformity (Figure 2), findings that indicated Léri-Weill dyschondrosteosis.

Results of routine laboratory assessments and hormonal measurement were normal. Patient's bone age was of a 11 year-old and no radiology signal of Madelung deformity was observed.

METHODS

Cytogenetic analysis

Chromosome analysis was performed on chromosomal spreads obtained from peripheral blood lymphocyte cultures of the patients using standard karyotyping techniques with G-banding. FISH methodology was carried out in lymphocyte metaphase spreads, using

Figure 1. Family heredogram showing that all affected members shared the same haplotype suggesting the involvement of *SHOX*.

Figure 2. Madelung deformity in patient II.4.

biotinylated cosmid LLNOYCO3'M/34F5 as a probe, which contains exons III to VIb of *SHOX* (10). The analysis was performed using the Karyotyping Software Macktype v.5.4.1 and Mackprobe v. 4.0 (Perceptive Scientific Instruments Inc., UK).

Molecular Analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using the salt precipitation method (11). For microsatellite analysis, the markers *SHOX* CA repeat, DYS290, DXYS10093, DXYS10096 and DXYS234 were used. CA repeat is an intragenic marker identified in the 5' untranslated region of exon I. DYS290 and DXYS10093 are intragenic markers. DXYS10096 is 3' flanking the gene, located at an important region apparently implicated in etiopathogenesis of LWD (12). DXYS234 is located downstream of *SHOX* approximately 2 cM from the Xp telomere (Figure 3). They were amplified from the family genomic DNA using fluorescent labeled primers. The PCR products were submitted to electrophoresis in the ABI PRISM 310 automatic

Figure 3. Schematic representation of microsatellite markers position on PAR 1 (Adapted from Benito-Sanz and cols. (12)).

sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the analysis was made by GeneScan software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Genomic DNA was amplified by PCR and sequenced on an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) automatic sequencer using the fluorescent di-deoxy-terminator method and specific intronic primers, previously described for exons II to VI of *SHOX* (13).

MLPA analysis of *SHOX* and PAR 1 region was carried out using the commercial Kit P018-C1 *SHOX* (MCR Holland, Amsterdam, The Netherlands). This kit contains 8 probes for *SHOX* exons, 13 for *SHOX* surround area and 13 for the other X regions. Six individuals with normal height and body proportions were used as control for PAR1 deletion. As deletion control, four individuals with *SHOX* deletion detected by FISH were used. The manufacturer instructions were followed and data was analyzed using Coffalyser software (MCR Holland, Amsterdam, The Netherlands).

RESULTS

The index case (III.2) and one second-degree relative (II.4) presented normal karyotype with presence of *SHOX* in FISH analysis (Figure 4).

Microsatellite analysis did not display any deletion. This analysis showed that all affected members (I.2, II.1, II.2, II.4, III.2 and III.3) shared the same haplotype (Figure 1). In the individuals I.2, I.3, III.2, III.4 the direct sequencing did not identify mutations in the encoding region and splicing sites.

An intragenic deletion of exons IV to VIa in heterozygous form was detected in 5 affected members (I.2, II.2, II.4, III.2 and III.3) by MLPA (Figure 5). It was not possible to perform MPLA analysis in the affected member II.1 due to insufficient genomic DNA and the impossibility to obtain new sample.

Figure 4. Fluorescence *in situ* hybridization of cosmid LLNOYCO3/M'34F5 to metaphase chromosome in the index case. Note the presence of two signals on Xp.

DISCUSSION

Several methodologies have been used in *SHOX* mutation screening, but the molecular defect remains unidentified in a significant proportion of LWD cases. Several factors can be involved in the failure to detect mutations in *SHOX* gene. First of all an alternative clinical diagnosis should be excluded. Secondly, the molecular defect may be present in unscreened areas of the *SHOX* gene (14).

SHOX gene deletion is the most common cause of LWD and it is usually detected by FISH or microsatellite analysis. However, in this family both techniques failed to detect the intragenic deletion which was detected by MLPA. FISH is a laborious and expensive technique that uses biotinylated specific probes and permits their visualization in a fluorescent microscope. In normal individuals with two copies of *SHOX*, two fluorescent signals are visible in each metaphase. In de-

Figure 5. Electropherograms of MLPA runs. Each peak corresponds to amplification of one probe. A - Normal control. B - Index case; Comparisons of relative peak areas indicate heterozygous deletion involving exons IV, V and VIa.

letions of one copy, only one signal is visible. This methodology does not allow the detection of small deletions. In this family the clone LLNOYCO3™M™34F5 of 42 Kb hybridized to the *SHOX* gene, despite the presence of the small deletion.

Microsatellite analysis uses fluorescent primers and an automatic sequencer. This technique is able to detect small deletions but in case of big genes as *SHOX*, it is important to analyze several markers to cover the entire gene. Besides that, parents' DNA analysis is necessary to characterize the presence of small deletions. This analysis showed that all affected members shared the same haplotype indicating the involvement of *SHOX* region. However, since the markers were not located at the deleted region, it was not detected by microsatellite analysis. No mutation was detected in *SHOX* exons and splicing regions by direct sequencing. This family presented an apparently normal *SHOX* gene, despite the typical phenotype.

MLPA is a relatively simple technique that is commercially available for *SHOX* analysis. In this family the MLPA detected a deletion involving exons IV to VIa in all affected members analyzed. Analyzing the probes

and DYS290 marker positions, it was possible to estimate that deletion could be 4 to 14 kb in length.

It is noteworthy that microdeletions involving *SHOX* are much more prevalent than intragenic *SHOX* mutations (15). MLPA has been an important tool for the diagnosis of patients with *SHOX* microdeletions. Recently, Fukami and cols. reported three patients with LWD with apparently normal *SHOX* according to conventional screening techniques. MLPA also detected an heterozygous deletion involving exons IV and V in one case, exons IV–VIa in the second case and exons IV–VIb in the third case (8).

In conclusion, MLPA technique for *SHOX* analysis has the best resolution to detect small deletions and has the advantage to be less laborious and should be used to identify cryptic *SHOX* intragenic deletions.

Acknowledgment: This work was supported by grants from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo - FAPESP (05/04726-0) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico - CNPq (307951/06-5 to A.A.L.J., 301246/95-5 to B.B.M. and 300938/06-3 to I.J.P.A.) No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

1. Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1341-7.
2. 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.
3. Blaschke RJ, Rappold GA. SHOX: growth, Leri-Weill and Turner syndromes. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:227-230.
4. Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, Rappold GA. The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet.* 2001;10:3083-91.
5. Munns CJ, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, Rappold G, et al. Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:4130-5.
6. Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, et al. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet.* 1998; 19:67-9.
7. Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Liborio DC, Kim CA, et al. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66:130-5.
8. Fukami M, Dateki S, Kato F, Hasegawa Y, Mochizuki H, Horikawa R, et al. Identification and characterization of cryptic SHOX intragenic deletions in three Japanese patients with Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Hum Genet.* 2008;53:454-9.
9. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30:e57.
10. Flanagan SF, Munns CFJ, 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;39:758-63.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky KF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc Acid Res.* 1998;16:1215.
12. Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza Carmona, M, Crolla JA, et al. A novel class of pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Léri-Weill dyschondrosteosis. *Am Hum Genet.* 2005;77: 533-44.
13. 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;19:70-3.
14. Jorge AA, Nishi MY, Funari MFA, Souza SC, Arnhold IJP Mendonça BB. Baixa estatura por haploinsuficiência do gene SHOX: do diagnóstico ao tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52(5):765-73.
15. Ogata T. SHOX haploinsufficiency: lessons from clinical studies. *Endocrinology & Diabetes.* 2002;9(1):13-20.

Correspondece to:

Alexander A. L. Jorge
Hospital das Clínicas, FMUSP, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42, Disciplina de Endocrinologia
Av. Dr Enéias de Carvalho Aguiar, 155, PAMB, 2º andar, bloco 6
05403-900 São Paulo, SP
E-mail: alexj@usp.br