KELI TIEKO SUZUKI

**Investigação molecular por sequenciamento do gene
CBP em portadores da Síndrome de Rubinstein-Taybi**

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof^a. Dra. Magda Maria Sales Carneiro
Sampaio

SÃO PAULO

2012

KELI TIEKO SUZUKI

**Investigação molecular por sequenciamento do gene
CBP em portadores da Síndrome de Rubinstein-Taybi**

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof^a. Dra. Magda Maria Sales Carneiro
Sampaio

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Suzuki, Keli Tieko

Investigação molecular por sequenciamento do gene CBP em portadores da
Síndrome de Rubinstein-Taybi / Keli Tieko Suzuki. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientadora: Magda Maria Sales Carneiro Sampaio.

Descritores: 1.Hibridização genômica comparativa-*Array* 2.Proteína de ligação
a CREB 3.Síndrome de Rubinstein-Taybi 4.Análise de sequência de DNA

USP/FM/DBD-061/12

*Dedico aos meus queridos pais, Fideyoichi e Sonia,
pelo incentivo, amor e apoio em todos os momentos que foram
de extrema importância para a realização desta dissertação.*

Sem vocês este trabalho não seria possível.

Hoje sou o que eu queria ser graças a vocês.

Amo muito vocês, serei eternamente grata.

Agradecimentos

À Deus, pai amado que sempre me impulsiona a evolução e progresso, que nos momentos difíceis sempre nos consola e nos encoraja a seguir em frente, abençoando-nos com o seu amor proporcionando força, saúde e alegria;

À minha orientadora Dra Magda Carneiro Sampaio por ter acreditado no meu trabalho e pela oportunidade da realização desta dissertação, disponibilizando todos os meios para que isso fosse possível;

À Leuridan Cavalcante Torres que desde o início da amizade confiou no meu desejo e me incentivou ao mestrado sendo sempre amiga e companheira em todas as minhas dificuldades, me direcionou e fez o possível para que essa dissertação fosse concretizada;

Ào coordenador do Laboratório de Investigação Médica 36 (LIM36) Prof. Dr. Carlos Moreira Filho, pela disponibilização do laboratório para este trabalho;

À Dra Sofia Mizuho Miura Sugayama pela colaboração, principalmente nos aspectos genético-clínicos e por toda ajuda e consideração no decorrer do trabalho;

À Beatriz Alves que com muita paciência me auxiliou muito com seus conhecimentos em genética, guiando-me para um resultado fiel;

À Dra. Leslie Kulikowski pela expansão da minha visão do micro ao macro no convite a viagem ao mundo dos métodos citogenéticos e moleculares, conhecimentos adquiridos essenciais para a conclusão deste trabalho;

À Dra Thelma Okay pela minha introdução e aprendizado em biologia molecular através da oportunidade de me integrar no LIM 36;

À Dra Gilda, Vagner, Mariana Vitule, Karina e Lúcia que no meu estágio, fase importantíssima para minha base sobre as principais técnicas moleculares, ensinaram-me com muita paciência e disciplina;

À Dra Patrícia Pizri e Dra Patricia Locosque que na convivência de vários trabalhos desenvolvidos no LIM36 e no Instituto de Ciências Biomédicas, contribuíram com os seus conhecimentos e troca de experiências;

À minha irmã Heidi pela paciência e apoio ao dividir o mesmo quarto e ter de dormir de luz acesa nas noites de execução de meu trabalho no computador.

Aos grandes amigos (as) que fiz nessa minha jornada, Thaís, Carolina, Roberta, Fernanda, Marília, Alin, Natália, Mariana Basso, Mariana Ambrosio, Ana, Camila, Patrícia Palmira, Ana Caroline, Jerusa, Cláudia, Joyce, Hatygas, Silvia, Vinicius enfim todos da equipe da genômica, citogenômica e imunologia do Laboratório de Investigação Médica 36, que tornaram a trajetória adornada de alegria e de ótima convivência, além de muito companheirismo, compartilharam conhecimentos de vários âmbitos além de terem me ajudado muito não só com as práticas do laboratório, mas também com as atribuições da vida;

A amiga que ganhei na trajetória do mestrado, Rúbia, que contribuiu com muito divertimento, no entendimento dos softwares de sequenciamentos;

A Karen do LIM56 que com bondade me ensinou a técnica do sequenciamento e contribuiu na interpretação das alterações encontradas na análise, além da conquista da amizade nesse período;

Aos meus amigos do laboratório Flzury e Científicalab, que além de me ajudar com os plantões, sempre me incentivaram e ajudaram quando mais precisei;

A Adriana Nagai e sua família, pela sincera amizade, acompanhamento e ajuda na minha trajetória;

A todos os funcionários do ICR, principalmente Nivaldo e sua esposa que me ajudaram na fase do estabelecimento da fratura do braço, incentivaram a permanecer até o término do mestrado e com muito carinho fizeram a impressão final da dissertação;

Aos funcionários da secretaria e biblioteca, em especial Mariza e Adriana.

Aos pacientes e familiares que contribuíram com o trabalho para o bem de todos que por essa síndrome está acometido.

“Se um dia você tiver que escolher entre o mundo e o amor,
lembre-se: Se escolher o mundo ficará sem amor,
mas se você escolher o amor, com ele conquistará o mundo”.

ALBERT EINSTEIN

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Síndrome de Rubinstein-Taybi.....	2
1.2 Estrutura e função do gene <i>CBP</i> correlação com o gene <i>Ep300</i>	6
1.3 Principais achados citogenéticos e moleculares na RTSs	8
1.3.1 Translocações	9
1.3.2 Microdeleções.....	9
1.3.3 Mutações de ponto	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos específicos	14
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	15
3.1 Casuística.....	16
3.1.1 Pacientes.....	16
3.1.2 Indivíduos controles	19
3.1 Métodos.....	19
3.2.1 Coleta de sangue e extração de DNA genômico.....	19
3.2.2 Quantificação, diluição e armazenamento das amostras	20
3.2.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) e Padronização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)	20

3.2.4 Técnica de sequenciamento	24
3.2.5 Análise estatística e do sequenciamento	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Sequenciamentos do gene <i>CBP</i> dos portadores de RTSs.....	27
4.1.1 Deleção	28
4.1.2 Alterações do tipo <i>nonsense</i>	29
4.1.3 Alterações do tipo “ <i>missense</i> ”.....	31
4.1.4 Polimorfismo catalogado.....	34
4.2 Relação entre as manifestações clínicas e achados moleculares	35
5 DISCUSSÃO	388
6 CONCLUSÃO	498
ANEXOS	50
8 REFERÊNCIAS	632
8.1 Referências eletrônicas	70
Vocabulário inglês-portugues de termos correntemente utilizados em biologia molecular	
Glossário	

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A	Adenina
AD	Autossômica Dominante
ALIM 001	Ambulatório do Laboratório de Investigação Médica 001
Arg	Arginina
Array-CGH	Array-Hibridização genômica comparativa
Asp	Asparigina
ARTS	Associação Rubinstein-Taybi Síndrome
BD	Bromo domain
c.	Códon
C	Citosina
CBP	Gene CREB binding protein
CREBBP	Gene CREB binding protein
del	Deleção
DI	Deficiência intelectual
dNTP	Termo genérico para o composto de um tipo de nucleosídeo deoxi trifosfato utilizado nas reações de polimerização em cadeia (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EP300	Gene EP300
EX	Exon
FISH	Hibridização <i>In Situ</i> por Fluorescência
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
fs	Frame shift
G	Guanina
HAT	Histona Acetil Transferase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
His	Histidina
ICR	Instituto da Criança
ins	Inserção

Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
L	Left
Leu	Leucina
LIM 36	Laboratório de Investigação Médica 36
LIM 56	Laboratório de Investigação Médica 56
Mb	Megabase
mL	Mililitro
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mA	Miliampére
mM ou mmol	milimolar
ng	nanograma
OMAs	Otites Médias de repetição
OMIM	On Line Mendelian Inheritance in Man
p.	Proteína
P	Paciente
p300	Proteína de EP300
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHD	Do inglês: Plant homeodomain
pmol/uL	Picomol por micromol
Pro	Prolina
QI	Quociente intelectual
R	Right
RGHC	Registro Hospital das Clínicas
RT	Sonda de FISH
RTSs	Síndrome de Rubinstein-Taybi
RX	Raio X
Ser	Serina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Do inglês: Single Nucleotide Polymorphisms

SSCP	Do inglês: Single Strand DNA Polymorfism
T	Timina
TAD	Domínios de transativação
TAE	Tampão (Tris + Ácido Acético + EDTA)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris EDTA
Thr	Treonina
U	Unidades internacionais
UV	Ultra violeta
uL	Microlitro
uM	micromolar
V	Volts
X	Códon de parada (Stop códon)
Zn	Zinco
1X	Concentração de uma vez
%	Por cento
[]	Concentração
°C	Graus Célcus
®	Marca registrada
≤	Menor igual

FIGURAS

Figura 1 - (a e b)- Paciente com 23 anos: dismorfismos craniofaciais típicos da RTSs; (c e d) polegares alargados e com desvio radial, falanges distais curtas e alargadas.....3

Figure 2 - Exon 12 do gene *CBP*: A) Deleção de 8 nucleotídeos (c.2444del8bpfs) presente no paciente P7; B) Sequência de nucleotídeos do *BLAST*, demonstrando em sublinhado os nucleotídeos que foram deletados no paciente.....28

Figura 3 - A seta indica posição da deleção de uma guanina no exon 15 em P12 (c.3236delGfs).....29

Figura 4 - A seta indica mudança de nucleotídeo em um dos alelos do exon 24 no paciente P10 (c.4226C→T).....30

Figura 5 - Exon 27 do gene *CBP*: A) A seta indica mudança de nucleotídeo em um dos alelos do exon 27 em P18 (c.4696C → T); B) A mesma mudança de nucleotídeo é observada em P19 (c.4696C → T).....31

Figura 6. A seta indica transição de nucleotídeo em um dos alelos do exon 31 em P11(c.5923G→A).....32

Figura 7 - A seta indica mudança de nucleotídeo em um dos alelos do exon 8 no paciente P14 (c.2015T→C).....33

Figura 8 - A seta indica mudança de nucleotídeo em um dos alelos do exon 22 em P15 (c.4076A → G).....33

Figura 9 - Representação esquemática da CBP, indicando a posição do domínio acetiltransferase (HAT) e PHD dentro desse domínio (PHD), o domínio KIX, o bromodomain (BD), a região CH3, o sítio de ligação p160 com o N-terminal e C-terminal domínios de transativação (TAD). Os números referem-se às posições de aminoácidos na *CBP* humana.....41

Figura 10 - Estrutura PHD em *CBP* humano. As cisteínas (C), histidina(H) e os átomos de zinco (Zn) estão indicados. A seta indica a Histidina 1291 que foi alterada para Arginina em P16.....42

TABELAS

Tabela 1 - Microdeleções em 16p13.3 detectadas por FISH com a sonda RT1 em pacientes com RTSs.....	11
---	----

Tabela 2 - Descrição dos pacientes (registro Hospital das Clínicas, sexo e idade) avaliados no presente estudo – dados de 2003 a 2010.....	17
---	----

Tabela 3 - Sequências dos <i>primers</i> referentes aos 31 exons do gene <i>CBP</i> e as condições de amplificação por PCR.....	21
--	----

Tabela 4 - Alterações encontradas por sequenciamento do gene <i>CBP</i> em portadores brasileiros de RTSs.....	34
---	----

Tabela 5 - Aspectos clínicos dos pacientes com alteração e sem alteração no gene <i>CPB</i>	35
--	----

Tabela Suplementar 1 – Distribuição de mutações existentes no banco de dados de RTSs	51
---	----

RESUMO

Suzuki KT. *Investigação molecular por sequenciamento do gene CBP em portadores da Síndrome de Rubinstein-Taybi* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A Síndrome de Rubinstein-Taybi (RTSs) é uma doença rara de herança autossômica dominante, caracterizada por dismorfismos craniofaciais, polegares e háluces alargados, deficiência intelectual e de crescimento. RTSs tem sido associada com mutações no gene *CREBBP* (*CBP*) e mutações menos frequentes no gene *EP300* que foram descritas em oito indivíduos. *CBP* e *p300* possuem alta homologia e são extremamente importantes em várias vias de sinalização, principalmente como coativadores de transcrição e na acetilação das histonas. Nosso estudo baseou-se na análise de alterações moleculares por sequenciamento direto do *CBP*, FISH e array-CGH em 20 pacientes com RTSs. Dos 20 pacientes avaliados por sequenciamento direto foram identificadas oito alterações moleculares, dentre estas, seis são alterações moleculares novas as quais não foram descritas na literatura, são elas: i) duas deleções (p.M747fs → STOP830 e p.G1011fs → STOP1021) ii) duas alterações do tipo *nonsense* (p.Arg1341X, p.Arg1498X) iii) três do tipo *missense* (p.Arg1907Trp, p.Leu604Pro e p.His1291Arg). Também identificamos um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) (rs115594471/ c.5874C→T). Dois pacientes apresentaram deleção do gene *CBP* em um dos alelos, identificado pelo método *array-CGH*. Outro, apresentou uma translocação aparentemente equilibrada t(2;16), cuja análise subsequente com *FISH* revelou uma quebra na região do *CBP*. Neste trabalho, a taxa de detecção de alteração molecular no *CBP* por sequenciamento direto foi de 40% (08/20). Porém, a taxa de detecção das alterações moleculares no *CBP* foi de 55% (11/20), considerando a combinação das diferentes técnicas utilizadas (*FISH*, sequenciamento direto e array-CGH). Não houve correlação genótipo-fenótipo, exceto por uma maior frequência da presença de epicanto nos pacientes com alteração no *CBP*. Os resultados obtidos neste trabalho servem como o diagnóstico molecular para os pacientes com RTSs atendidos no Ambulatório do Laboratório de investigação Médica 001 (ALIM 001) do Instituto da Criança - FMUSP, contribuindo para uma melhor orientação médica, como também para realização do aconselhamento genético às famílias.

Descritores: Hibridização Genômica Comparativa-Array, Proteína de ligação a CREB, Síndrome de Rubinstein-Taybi, Análise de sequência de DNA.

ABSTRACT

Suzuki KT. *Molecular investigation by sequencing of the CBP gene in patients with Rubinstein-Taybi syndrome* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Rubinstein-Taybi syndrome (RTSs) is a rare autosomal dominant disease characterized by craniofacial dysmorphisms, broad thumbs and toes, mental and growth deficiency. RTS has been associated with *CREBBP* (*CBP*) gene mutations and less frequently with mutations in *EP300* gene, which have been reported in eight individuals. CBP and p300 have high homology and are extremely important in many signaling pathways especially as transcriptional coactivators and histone acetylation. Our study was based on the alteration analysis by direct sequencing of the *CBP*, by FISH and array-CGH in 20 RTSs patients. We identified eight molecular alterations in 20 RTSs patients evaluated by direct sequencing: i) two deletions (p.M747fs → STOP830 and p.G1011fs → STOP1021) ii) two nonsense alterations (p.Arg1341X and p.Arg1498X) iii) Three missense alteration (p.Arg1907Trp, p.Leu604Pro and p.His1291Arg). Single-nucleotide polymorphism were also identified (rs115594471 / c.5874C→T), and six of these are new molecular alterations, not described in literature. Two RTSs patients studied had *CBP* gene deletion in one allele, identified by array-CGH method. Other patient, presented with apparent balanced translocation t(2;16) in which the subsequent analysis using FISH, showed a break in region of *CBP*. In this work, the rate of detection of molecular alteration in *CBP* by direct sequencing in RTSs patient was 40.0% (08/20). However, the rate of detection of molecular alteration in *CBP* was 55.0% (11/20), considering the combination of different techniques (FISH, direct sequencing and array-CGH). No significant correlation could be established in this study between the different types of mutations and genotype-phenotype of RTSs patients, except a higher frequency of the presence of epicanthus in the RTS patients with alteration in the *CBP*. The results of this study serve as a molecular diagnosis for RTSs patients treated at the Ambulatory of the Medical Investigation Laboratory 001 (ALIM 001) of the Instituto da Criança - FMUSP, and this contributes to better clinical management, such as making an appropriate genetic counseling for families.

Descriptors: Array-Comparative Genomic Hybridization, CREB-binding protein; Rubinstein-Taybi syndrome; Sequence analysis DNA.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome de Rubinstein-Taybi

A Síndrome de Rubinstein-Taybi (RTSs) encontra-se catalogada (OMIM 180849) como uma doença autossômica dominante (AD) e caracteriza-se por dismorfismos craniofacial, polegares e háluces largos, baixa estatura e deficiência intelectual (Rubinstein, 1990). Em 1963, a RTSs foi descrita pela primeira vez em sete crianças que apresentavam manifestações clínicas semelhantes como, deficiência intelectual, anomalias faciais e dígitos largos (Rubinstein & Taybi, 1963) (Figura1). A partir disso, outros casos foram sendo relatados na literatura, colaborando na definição dos principais sinais clínicos apresentados pelos portadores da síndrome (Filipp, 1972; Coffin, 1964; Ciacchi et al., 1988).

A morbidade na RTSs está mais frequentemente relacionada às cardiopatias congênitas e as infecções respiratórias recorrentes que acometem os portadores da síndrome (Stevens et al., 1990; Wiley et al., 2003). Além disso, eles também apresentam múltiplas malformações esqueléticas, alterações neurológicas, susceptibilidade aumentada a alterações endocrinológicas, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e déficit de linguagem (Rubinstein, 1990; Rohlfing et al., 1971; Stevens, 1997). Os pacientes com RTSs apresentam uma predisposição a tumores benignos

e malignos, com frequência maior no sistema nervoso central e neoplasias malignas da linhagem hematopoiética, como leucemias e linfomas (Siraganian et al., 1989; Miller e Rubinstein, 1995).

O coeficiente de inteligência (QI) nos pacientes com RTSs varia de 30 a 79, com uma média de 51 e aproximadamente 52% dos afetados apresentam QI inferior a 50 (Rubinstein, 1990).

Figura 1 - (a e b)- Paciente com 23 anos: dismorfismos craniofaciais típicos da RTSs; (c e d) polegares alargados e com desvio radial, falanges distais curtas e alargadas.

A RTSs é uma doença rara, cuja incidência é de 1:125.000 a 1:330.000 nativos, sem predomínio de sexo ou cor. Na maioria das famílias, a ocorrência é esporádica, mas existem alguns casos familiares descritos na literatura (Hennekam et al., 1989; Hennekam et al., 1990; El Hafidi et al., 2004).

O diagnóstico da RTSs é essencialmente clínico e baseia-se no reconhecimento de distúrbios craniofaciais e de outras características clínicas. As alterações faciais da RTSs não são facilmente reconhecíveis no período neonatal e na lactância, tornando-se mais evidentes na infância (Rubinstein, 1990). Os indivíduos com suspeita clínica de RTSs devem ser avaliados por geneticista pediátrico especializado em distúrbios (Wiley et al., 2003).

A presença dos polegares e/ou háluces curtos e alargados são considerados critérios maiores para o diagnóstico da RTSs, já que ocorrem em 100% dos casos (Rubinstein, 1990). Anormalidades nos estudos citogenéticos e moleculares dos pacientes com RTSs são detectadas em 55% dos casos. Desse modo, resultados citogenéticos e moleculares normais não excluem o diagnóstico da RTSs (Hennekam et al., 1990; Hennekam et al., 2006).

A descrição de casos familiares é rara e geralmente de herança AD, sugerindo que a maioria dos casos de RTSs ocorre devido à mutação *de novo*, ou seja, os pais são aparentemente saudáveis. Quanto ao aconselhamento genético, o risco de recorrência para a irmandade dos indivíduos é de 0,1% baseado em dados empíricos. Para os filhos (a) dos

pacientes com RTSs pode ser elevado até 50% (Hennekam, et al., 1990).

A etiologia da RTSs ainda é bastante investigada por vários pesquisadores, devido aos rearranjos cromossômicos e microdeleções encontrados na região 16p13.3. (Roelfsema, et al., 2005; Barthold, et al., 2007; Zimmermann, et al., 2007; Bartsch, et al., 2010). Nesta região do cromossomo 16, localiza-se o *locus* do gene *CBP* (*CREB Binding Protein - CREBBP*). Petrij et al.(1995) demonstraram que a RTSs é causada não apenas por rearranjos cromossômicos envolvendo a região 16p, mas também por mutações de ponto, translocações e inversões cromossômicas, e até deleções parciais ou completas no próprio gene *CBP*, sugerindo que a perda funcional de uma das cópias deste gene pode levar às anormalidades de desenvolvimento e deficiência mental observadas nos pacientes com RTSs.

Em 2005, surgiram os primeiros relatos do envolvimento de outro gene, *EP300* (proteína p300), como causa de RTSs em três indivíduos, cujo fenótipo não era típico (Roelfsema et al., 2005). As mutações no *EP300* na RTSs são raras e até o momento só foram encontradas em oito indivíduos que apresentaram sinais clínicos incompletos da síndrome (Roelfsema et al., 2005; Barthold et al., 2007; Zimmermann et al., 2007; Bartsch et al., 2010; Foley et al., 2009; Tsai et al., 2010).

1.2 Estrutura e função do gene *CBP* correlação com o gene *Ep300*

O *CBP* foi descrito pela primeira vez por Chrivia et al. (1993), como um coativador transcripcional e a denominação dada ao *CBP* baseia-se na interação com a proteína CREB (*CREB-binding protein- CBP*), que é regulada pelo AMP cíclico. O *CBP* possui 31 exons, ocupa 159 kb do DNA genômico e codifica uma proteína de 265 kDa com 2.442 aminoácidos (Giles et al., 1997). As mutações no gene *CBP*, que inativa um dos alelos nos afetados pela RTSs, variam desde mutações de ponto, translocações e inversões cromossômicas até deleções parciais ou completas do gene (Petrij et al., 1995). O *CBP* parece ser crucial em certos estágios do desenvolvimento embrionário, o que explica todas as alterações fenotípicas que caracterizam a RTSs (Goodman e Smolik, 2000).

Existem hipóteses de que o *CBP* atue como transdutor de sinais provenientes de diversas vias celulares de sinalização, além de possuir atividade histona acetil-transferase (HAT) intrínseca (Goodman e Smolik, 2000; Bannister e Kouzarides, 1996; Murata et al., 2001; Kalkhoven et al., 2003). Os fatores de transcrição dessas vias precisam competir entre si por uma quantidade limitada da proteína *CBP* disponível no núcleo da célula e por meio da acetilação das histonas, abre a estrutura de sua cromatina no *locus* onde ela precisa ser expressa, sendo processo essencial para a expressão gênica. A interação da *CBP* também promove a acetilação de um

grande número de outras proteínas, permitindo o acesso de fatores transcripcionais ao DNA (Goodman e Smolik, 2000).

O *CBP* é composto por domínios conservados caracterizados por Bromo cbp_like, Zinc finger ZZ_CBP, KAT11 (ou HAT), KIX, DUF 902, zinc finger TAZ, domínio de ligação da CREB e PAT1, que participam e atuam em diferentes etapas de sinalização e funções celulares básicas, tais como o reparo do DNA, crescimento, diferenciação celular, apoptose e também atuam sobre genes supressores de tumores como o p53 (Gu e Roeder, 1997; Vilella et al., 2002; Baldwin et al., 1996; Chen e Greene, 2004).

Na descrição geral dos domínios do *CBP*, um dos domínios mais importantes incorporados nos genes *CBP/ EP300* é o KAT11, que além de ser necessário á acetilação das histonas, está envolvido com muitos processos celulares, incluindo a transcrição, reparo do DNA e montagem da cromatina (Das et al., 2009; Marchler-Bauer et al., 2011). O domínio Bromo, além de participar da acetilação de histonas e de proteínas não histonas, ativa transcrição; o domínio PAT1 é necessário para transmissão precisa de cromossomos durante a divisão celular e a função do domínio DUF902 ainda é desconhecida (Marchler-Bauer et al., 2011).

O domínio Zinc finger tipo ZZ, coordena dois íons de zinco e provavelmente participa de andaimes de ligação molecular, oferecendo sítios de ligação para coativadores transcripcionais, bem como o domínio TAZ2 que se faz presente duas vezes no gene *CBP* e liga-se a outros fatores de transcrição como a proteína supressora de tumor p53, E1A oncoproteína, MyoD e GATA-1. (Gu e Roeder, 1997; Marchler-Bauer et al., 2011).

A ligação da proteína CREB ao gene *CBP* se faz por meio do domínio KIX que efetua a transativação de fatores nucleares, incluindo myb e jun, além de recrutar RNA polimerase II responsável pela maquinaria de transcrição basal. A ativação do domínio KIX também ativa produção de hormônios da tireóide e receptores de retinóides (Parker et al., 1997; Radhakrishnan et al., 1997).

O *CBP* humano apresenta elevado grau de homologia estrutural e funcional com o gene *EP300*, que se localiza na região cromossômica 22q13.2. Ambos os genes encontraram-se conservados nos mamíferos e estão relacionados com etiologia da RTSs. (Janknecht, 2002; Lundblad et al., 1995).

1.3 Principais achados citogenéticos e moleculares na RTSs

Os primeiros estudos citogenéticos e moleculares da síndrome surgiram após quase três décadas do primeiro relato, a partir da descrição de rearranjos cromossômicos na banda 16p13.3 associadas à RTSs.

1.3.1 Translocações

Em 1991, Imaizumi e Kuroki observaram uma translocação recíproca *de novo* $t(2;16)(p13.3;p13.3)$ em um paciente japonês com RTSs. No ano seguinte, Tommerup et al. (1992) relataram translocação recíproca balanceada *de novo* $t(7;16)(q34;p13.3)$ em um paciente masculino com ponto de quebra em 16p, envolvendo a mesma banda p13.3. No mesmo ano, Lacombe et al. (1992) descreveram um lactente com RTSs que apresentava inversão pericêntrica em um dos cromossomos 16 e concluíram que o gene responsável pela RTSs estava localizado na região 16p13.3. Desde então, essa região passou a ser investigada nos pacientes com RTSs com técnicas citogenéticas de alta resolução, como hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e estudos moleculares.

1.3.2 Microdeleções

Breuning et al. (1993) investigaram a região 16p13.3 com FISH pressupondo a presença de uma microdeleção, utilizando duas sondas, N2 e RT1. Estes autores demonstraram que o sinal de RT1 estava ausente em um dos alelos do cromossomo 16 nos seis afetados pela RTSs. Não havia

alteração da região de RT1 nos genitores de 5 dos 6 pacientes com deleção, indicando que os pacientes apresentavam mutações *de novo*. Posteriormente, vários pesquisadores realizaram estudos com a técnica de FISH utilizando a sonda RT1 para identificar microdeleção na região 16p13.3 (Tabela 1).

Blough et al. (2000) realizaram estudos de FISH em 66 pacientes com RTSs, utilizando as sondas RT100, RT102, RT166, RT191 E RT203. Cinco dos 66 pacientes (9%) apresentavam deleções: i) deleção na região 5' do gene *CBP*, porém sem deleção na região 3'; ii) deleção total do gene *CBP*; iii) deleção do gene *CBP* exceto a região 5' e iv) deleção intersticial na região 3'. Estes autores verificaram que não houve diferença nas 85 características clínicas estudadas na correlação genótipo-fenótipo entre os pacientes com ou sem deleção.

Em vários trabalhos a frequência de microdeleção detectada pelo teste de FISH com as sondas RT1 (ou RT100), variou de 4 a 25,0%, com uma média de 9,6% (Tabela 1). A sonda RT1 ocupa cerca de 29 kilobases (kb) da região 3' do gene *CBP*, enquanto a parte transcrita do gene tem extensão de 146 kb do DNA genômico (Petrij et al., 2000). Portanto, o teste de FISH com resultado negativo não é suficiente para afastar o diagnóstico de RTSs. A extensão da deleção no gene *CBP* descrita em alguns trabalhos varia amplamente, desde deleções inferiores a 50 kb (Blough et al., 2000) até superiores a 650 kb (Petrij et al., 1995).

Tabela 1 - Microdeleções em 16p13.3 detectadas por FISH com a sonda RT1 em pacientes com RTSs

Deleção/ total de casos	% com deleção	Referências
6/24	25.0	Breuning et al. (1993)
1/25	4.0	Masuno et al. (1994)
2/16	12.5	McGaughan et al. (1996)
7/64	10.9	Wallerstein et al. (1997)
3/30	10.0	Taine et al. (1998)
5/66	7.6	Blough et al. (2000)
14/171	8,2	Petrij et al. (2000)
38/396	9,6	Total

1.3.3 Mutações de ponto

Mutações de ponto no gene *CBP* também têm sido implicadas como causa da RTSs. Petrij et al. (1995) utilizaram o teste da proteína truncada, no qual fragmentos específicos do gene são transcritos e traduzidos *in vitro* com a finalidade de detectar “paradas” no processo de tradução da proteína. A análise dos primeiros 1,2 kb do gene *CBP* em 16 pacientes com diagnóstico clínico de RTSs mostrou uma substituição de um único par de bases que resultou em parada prematura da tradução em dois pacientes. Em posterior estudo multicêntrico, Petrij et al. (2000) demonstraram que as mutações no gene *CBP* geraram proteínas truncadas em 4 dos 37 pacientes.

Com a finalidade de determinar a frequência de mutações de ponto na RTSs, Bartsch et al. (2005) realizaram estudo em 45 pacientes com RTSs, utilizando a técnica de sequenciamento genômico, dividindo-os em 3 categorias: i) 30 pacientes com quadro clínico típico da RTSs (grupo 1); ii) 8 pacientes com RTSs moderada ou incompleta (grupo 2); iii) 7 pacientes com diagnóstico sugestivo de RTSs devido a presença de características clínicas isoladas da RTSs (grupo 3). Bartsch et al. (2005) verificaram 17 mutações (56,6%) no primeiro grupo, 2 mutações (25%) no segundo grupo e nenhuma mutação no terceiro grupo. Em geral, as mutações ficaram distribuídas ao longo do gene, não constituindo *hot spots* e verificou-se maior detecção de mutação nos pacientes com quadro clínico típico da RTSs.

Diante da importância crescente do gene *CBP* como causa da síndrome de Rubinstein-Taybi, e também da inexistência de diagnóstico molecular nos pacientes com RTSs atendidos no Instituto da Criança/HC-FMUSP, verificamos a necessidade do estudo clínico-molecular para que pudéssemos realizar um aconselhamento genético apropriado aos familiares dos propósitos. O trabalho em questão poderá também contribuir com mais informações sobre esse gene, bem como correlacioná-las com manifestações clínicas graves e ainda pouco descritas na literatura, tais como as alterações no sistema imunológico e as neoplasias. Portanto, o presente trabalho investigou alterações moleculares no gene *CBP* em 20 pacientes com diagnóstico clínico de RTSs.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi realizar a investigação das possíveis alterações moleculares no gene *CBP* em 20 pacientes com RTSs.

2.1 Objetivos específicos:

- Analisar o tipo e a frequência de alterações moleculares encontradas no gene *CBP* em pacientes portadores da RTSs e relacionar com alterações citadas na literatura.
- Correlacionar as alterações moleculares no gene *CBP* com o fenótipo dos propósitos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Pacientes

A casuística compreendeu 20 pacientes com RTSs não aparentados (13 indivíduos do sexo feminino e 7 indivíduos do sexo masculino, com idade entre 5 meses a 32 anos), cujo diagnóstico foi essencialmente clínico e realizado por médico geneticista, utilizando critérios clínicos definidos pela presença dos quatro principais sinais clínicos da síndrome: fácies peculiar, anormalidades esqueléticas (principalmente, polegares e/ou háluces alargados), déficit de crescimento e deficiência intelectual (Hennekam et al., 1990). O grupo estudado consistiu de crianças, adolescentes e adultos com RTSs atendidos no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICR- HC/FMUSP) (Tabela 2), que na inexistência de um centro de atendimento especializado para essa síndrome, devido sua incidência rara, o ICR- HC/FMUSP por possuir médicos-geneticista especialistas nessa síndrome, assumiu o atendimento assistencial dos pacientes com RTSs, e contou com a colaboração da associação de pais e amigos dos portadores da RTSs (ARTS). O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação

Médica 36 (LIM 36) do HC-FMUSP. Todos os pacientes foram oriundos de famílias brasileiras e de aspecto caucasóide.

Tabela 2 - Descrição dos pacientes (registro Hospital das Clínicas, sexo e idade) avaliados no presente estudo – dados de 2003 a 2010

Paciente	RGHC	Sexo	Idade na 1ª avaliação (anos)
P1	6115337G	Feminino	11
P2	88201420E	Masculino	24
P3	6084806K	Feminino	11
P4	6115906D	Feminino	15
P5	3006041J	Feminino	16
P6	6114632E	Feminino	10
P7	4028002B	Feminino	24
P8	6125862J	Masculino	23
P9	6116474K	Feminino	9
P10	6114252D	Feminino	3
P11	6115789G	Feminino	27
P12	6116475J	Feminino	32
P13	6023298C	Feminino	23
P14	6115008E	Masculino	17
P15	6123761C	Masculino	8
P16	6145905I	Masculino	4
P17	44122037K	Masculino	7
P18	3064328D	Masculino	13
P19	6150643H	Feminino	6
P20	5260037D	Feminino	0,5

Os pacientes foram submetidos à anamnese e exame físico completo, de acordo com protocolo estabelecido pelo ALIM 001-ICR.

Todos os pacientes tem exames de cariótipo em bandamento G e a maioria com resultado normal, exceto a paciente 13, que apresentou uma translocação aparentemente equilibrada t(2;16). Uma análise subsequente com FISH, realizada pelo nosso grupo em outro estudo, revelou um cariótipo 46,XX.ish t(2;16)(p11.2;p13.3)(RT100+,RT166-;RT100+;RT166-), mostrando uma quebra exatamente na região do gene *CBP*. No estudo de Torres et al (2008) foi realizada análise pelo método de hibridação genômica comparativa com oligos (*array-CGH*) em nove pacientes que mostrou a deleção do gene *CBP* em dois pacientes (P3 e P8).

Os protocolos clínicos e laboratoriais estabelecidos foram submetidos à Comissão de Ética do Hospital das Clínicas (CAPPesq – processo no. 0473/08), bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após explicação detalhada do objetivo do estudo e de suas limitações, os responsáveis pelos pacientes assinaram o TCLE e somente após a assinatura, os pacientes foram incluídos no estudo. Nossos pacientes fazem parte da ARTS composta de 143 integrantes, com sede na cidade de São Paulo (www.arts.org.br).

3.1.2 Indivíduos controles

Utilizamos amostras sanguíneas de quatro adultos jovens e saudáveis com idade de 20 a 35 anos, sem história de síndrome de Rubinstein-Taybi na família, apenas para padronização das condições de amplificações dos *primers*.

3.1 Métodos

3.2.1 Coleta de sangue e extração de DNA genômico

Foram coletadas amostras de sangue periférico (10mL) dos pacientes e indivíduos controles em tubo com anticoagulante (EDTA) para a extração de DNA. Todas as coletas realizadas nos pacientes foram acompanhadas pelos pais ou responsáveis, que colaboraram no momento da coleta. Os tubos contendo sangue foram encaminhados para o LIM 36 pela equipe de enfermagem do Instituto da Criança-HC-FMUSP. A extração de DNA genômico dos pacientes e controles foi realizada das amostras de sangue periférico, utilizando *blood genomic Prep Mini Spin kit* (GE Healthcare, USA), conforme instrução do fabricante.

3.2.2 Quantificação, diluição e armazenamento das amostras

A quantificação e a verificação da qualidade do DNA extraído foram realizadas, utilizando-se nanoespectrofotômetro (NanoVue® - GE Healthcare, USA). As amostras de DNA para uso imediato foram diluídas para a concentração de 25 ng/μL, aliquotadas, identificadas e conservadas a -20 °C. Amostras concentradas de DNA foram conservadas a -80 °C.

3.2.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) e Padronização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Utilizamos 38 pares de *primers* localizados nas regiões intrônicas que compreende os 31 exons do gene *CBP*. Os *primers* foram desenhados conforme estudo de Coupry et al. (2002) e o exon 31, pela sua extensão, foi dividido em vários conjuntos de primers para o estudo e o exon 2 foi dividido em duas partes, estes foram desenhados no programa *Primer Express®* (Applied Biosystems, USA). Entretanto, este trabalho apresentou algumas dificuldades durante sua realização, que embora na literatura esteja descrito as condições e os desenho dos *primers* (Coupry et al., 2002; Udaka et al., 2005), foi necessário para o estudo, uma nova padronização das condições da PCR para todos os *primers*. Na Tabela 3 estão descritos as sequências

dos *primers*, bem como, as condições de amplificação.

Tabela 3- Sequências dos *primers* referentes aos 31 exons do gene *CBP* e as condições de amplificação por PCR.

Gene CBP (exons)	Peso molecular do fragmento (bp)	Primer	Sequência do Primer 5' → 3'	MgCl ₂ e Temperatura
Exon 1 (890 bp)	400	EX1-L	GTTGCTGTGGCTGAGATTG	-
		EX1-R	GACAGTCCTGCGACGAACCTC	
		EX2-1L	TGGCAGTTGGAGAGCTGTAA	
Exon 2 (713 bp)	798	EX2-1R	TCATGCAGATACCAAGGTCCA	1,5 mmol/l – 62°C
		EX2-2L	AGCCAGGGAGATTCTTCAGC	
		EX2-2R	GTGGTCCCATTTACGCATT	
Exon 3 (177 bp)	284	EX3-L	CCCAGGCCCTTCCTTTTAT	1,5 mmol/l – 59°C
		EX3-R	ACCCACCGGAGAGCCATA	
Exon 4 (241 bp)	369	EX4-L	AGCTTTTGCTTTTGTGAGA	1,5 mmol/l – 59°C
		EX4-R	TCCTGACCTCTACCACTAGGAG	
Exon 5 (114 bp)	258	EX5-L	TTGAAAGTGTGACGATTGGA	1,5 mmol/l – 59°C
		EX5-R	TGCCCACTCCCTACCTACTC	
Exon 6 (243 bp)	354	EX6-L	CGTGGGCTTCTCCCTTTTAC	1,5 mmol/l – 54°C
		EX6-R	TTTGCTGCATGTGGACAAGT	
Exon 7 (103 bp)	232	EX7-L	TGGTGGCATGTTGGTTATCT	1,5 mmol/l – 59°C
		EX7-R	TGCTCCTGTTGGACTGTCAC	
Exon 8 (147 bp)	288	EX8-L	TGTGGTGGCAGAAGAACCCTT	1,5 mmol/l – 57°C
		EX8-R	CAATGGGCAACACAGGAATA	
Exon 9 (118 bp)	273	EX9-L	GGACGAAACCCCATGTCTTT	2,5 mmol/l – 59°C
		EX9-R	TTCCAGATAACAAAGCAGACAAA	
Exon 10 (172 bp)	276	EX10-L	CAACACAGATCATTCAAGTTGCTT	1,5 mmol/l – 56°C
		EX10-R	CAGGCTAAGGGATGGCAGTA	
Exon 11 (45 bp)	189	EX11-L	AAGAAATTCCTATTCCTGAATCAA	3 mmol/l – 61°C
		EX11-R	CAGTGAAAGTTATGGCTGTTGAA	
		EX12-L	GTAAACGACGGCCAGTTTCTGTTGCC	
Exon 12 (125 bp)	195	EX12-R	TGTGCGTTCCATC GATTCTCAAGTGACATGAATTCTGCTGC	2 mmol/l – 59°C
		EX13-L	CGTCAGCTTCCGAACCTACAG	
Exon 13 (180 bp)	292	EX13-R	AAAAACCAAACTTAACACAAGAATTT	2 mmol/l – 57°C
		EX14-L	TTTTCAAACGGGGGAAATAA	
Exon 14 (417 bp)	505	EX14-R	GAGTCTTGGCCCAAAACAG	1,5 mmol/l – 52°C
		EX15-L	TGCATGAGCAGCATAGTTGA	
Exon 15 (180 bp)	297	EX15-R	GTTGCGATACGCAGTAATG	2 mmol/l – 57°C
		EX16-L	AGAGTCTTCCCGTGAGGTTG	
Exon 16 (190 bp)	320	EX16-R	TCCTAACACCGTGAAAAAGC	2 mmol/l – 57°C
		EX17-L	CATCGTGGCTGGGATGTCAC	
Exon 17 (119 bp)	325	EX17-R	AACAATGGACACTCAGAA GTCACACC	2 mmol/l – 62°C
		EX18-L	GCCAGATGAGACTGGCATTT	
Exon 18 (240 bp)	365	EX18-R	ACCCCTCTGGCTGGATTAAC	3 mmol/l – 52°C
		EX19-L	GAACATTATAAGACAGTAAATGGAATG	
Exon 19 (89 bp)	201	EX19-R	ACGTGCCTTGCCCTAAGAC	2 mmol/l – 60°C

“CONTINUA”

Tabela 3- Sequências dos *primers* referentes aos 31 exons do gene *CBP* e as condições de amplificação por PCR. “conclusão”

Gene CBP (exons)	Peso molecular do fragmento (bp)	Primer	Sequência do Primer 5' → 3'	MgCl ₂ e Temperatura
Exon 20 (81 bp)	190	EX20-L	TTGGGTGGCTGTGTGTTATG	2 mmol/l – 57°C
		EX20-R	TTTAAGGTCACCCCTCCCTCA	
Exon 21 (57 bp)	192	EX21-L	CAAAATAACATTCCAGAGACCCTA	2 mmol/l – 60°C
		EX21-R	CCGATTTCAAACCAAACTGA	
Exon 22 (78 bp)	246	EX22-L	GGACGCACACACAGACTTCTAC	2,5 mmol/l - 61°C
		EX22-R	ACAATGAATGAGATGCAGTAGCC	
Exon 23 (68 bp)	200	EX23-L	TGCATTTTGTGTTTGACAAT	1,5 mmol/l – 60°C
		EX23-R	GGGACAATTTCTACAAGTTTCTAA	
Exon 24 (151 bp)	274	EX24-L	TGCTGTTGAAGCCCTCTCAC	1.5 mmol/l – 60°C
		EX24-R	CAAGAGCTTTGCAGAGAGCA	
Exon 25 (147 bp)	258	EX25-L	CTGGTGTGCAGAAGCACCT	1.5 mmol/l – 61°C
		EX25-R	CACGGCTCACTGAATGACAC	
Exon 26 (114 bp)	308	EX26-L	TTCCAGGGTGTGTTTGTG	1.5 mmol/l – 56°C
		EX26-R	GGATGGAAAAATAAAAACGCATA	
Exon 27 (166 bp)	301	EX27-L	CTTAAAGGCAGGGCCGATT	1.5 mmol/l – 60°C
		EX27-R	TGCAAGAAAAAGGCACACAA	
Exon 28 (168 bp)	327	EX28-L	CACACATGCATGGGACTCTG	2,0 mmol/l - 62°C
		EX28-R	GACACGTGGGCAATGGAG	
Exon 29 (162 bp)	258	EX29-L	ACTTGCCCTGGTCTCACAGC	2,0 mmol/l – 62°C
		EX29-R	TGCGAGTCTTTCCCTCCTC	
Exon 30 (282 bp)	350	EX30-L	CCCTTGTGTGGGACTAAAGC	1.5 mmol/l – 55°C
		EX30-R	ACCATCAGGTACAGACACCAACC	
Exon 31 (3077 bp)	394	EX31a-L	ACAGACCCAGACTTAGCGGTG	1.5 mmol/l -58°C-
		EX31a-R	CTTGTGTTTGATGTTGAGGCAGAAGG	
	368	EX31b-L	GGTGTGCAAGCAGCTCATCG	1.5 mmol/l – 61°C
		EX31b-R	TGGTAGGCTTCCCTGTGGAC	
	400	EX31c-L	ACCCGTGAGCATGTCACCAG	1.5mmol/l – 64°C
		EX31c-R	CTGGGCCTGCATGGATATCAC	
	443	EX31d-L	TGAATGTGCCCCGACCCAAC	1.5 mmol/l- 62°C-
		EX31d-R	AGCCTGCATGGCATTACAGTTTC	
	435	EX31e-L	AATCAAACCCGCAGCTAA TG	1.5 mmol/l -61°C-
		EX31e-R	CTTGAGGCTGCTGGAAGTCTG	
	481	EX31f-L	GAATCCACAGTACCGAGAAATGTTACG	2 mmol/l -62°C-
		EX31f-R	AGACCGCACCTGGTTACTAAGG	
	486	EX31g-L	CCCAGCAACACATGCTCT CAG	1.5 mmol/l -62°C-
		EX31g-R	GGAAGTCGCAGTTCCATCTAGG	

Para a PCR foram utilizados 2 μ L (50 ng/ μ L) de DNA genômico, 2,5 μ L tampão (10X) (LGC biotechnology, USA), 0,5 μ L de desoxirribonucleotídeos (dNTP)– dATP, dTTP, dCTP e dGTP (5uM/ μ L - LGC biotechnology, USA), 0,1 μ L (5U/ μ l) de enzima Easy *Taq* DNA polimerase (LGC biotechnology, USA); 0,25 μ L de cada *primer Forward* e *Reverse* (4 μ M/ μ mol - Invitrogen, USA), completando com água ultrapura para um volume total de solução de 25 μ L. As concentrações de $MgCl_2$ (LGC biotechnology, USA) estão especificadas para cada *primer* na tabela 3. A PCR foi realizada no equipamento termociclador (MJ Research, EUA) com a seguinte programação: etapa inicial de desnaturação de 6 minutos a 94°C, seguida de 10 ciclos de 30 segundos de anelamento em temperatura específica para cada iniciador, e 30 segundos de extensão a 72 °C, a programação repete mais uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 segundos e segue com 30 ciclos de 45 segundos de anelamento em temperatura específica para cada iniciador e 30 segundos de extensão a 72 °C. As amplificações foram encerradas por etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C e para uso, as amostras amplificadas foram mantidas a 4°C. Para cada um dos pares de *primers* foi realizado ajustes nas temperaturas de anelamento e nas concentrações $MgCl_2$ até a obtenção de padrões que estivessem bem definidos para todos os exons do gene *CBP*.

Para visualização dos produtos obtidos da amplificação por PCR foi realizado eletroforese em cuba horizontal (Biometra, Alemanha) com gel de agarose a 2% (Invitrogen, USA) em tampão Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE) 1X (Invitrogen, USA).

Nos poços do gel de agarose foram aplicados 4µL das amostras (produto amplificado - DNA) com 1µL de *Loading Buffer* (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e glicerol 30%) e 1 µL do padrão de peso molecular (Ladder, Invitrogen, USA) de 50 pb diluído em 9µL de TAE e 2µL de *Lodding Buffer*. A corrida das amostras no gel de agarose foi realizada por aproximadamente 35 minutos a 110V e 90 mA. Em seguida, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio (0,5 ng/mL), visualizado e fotografado na luz ultravioleta no equipamento de fotodocumentação (Alpha Innotech, USA).

3.2.4 Técnica de sequenciamento

As amostras de DNA amplificadas por PCR foram purificadas por meio de colunas do Kit de Purificação *GFX PCR DNA e Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech, USA), conforme instrução do fabricante. Para o sequenciamento, foi utilizado o kit *CyTM5 Thermo Sequenase Dye terminator* (Amersham Pharmacia Biotech, USA), seguindo instrução do fabricante. A leitura do sequenciamento foi realizada no equipamento *MegaBace* (Amersham Pharmacia Biotech, USA) do laboratório de Investigação Médica 56 (LIM 56).

3.2.5 Análise estatística e do sequenciamento

A análise estatística da correlação entre as alterações moleculares no *CBP* com o fenótipo dos propósitos foi realizada utilizando o teste exato de *Fisher* por meio do programa *GraphPad Prism®* (San Diego, CA, USA). Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. A análise do sequenciamento foi realizada no programa *Chromaspro* versão 1.34 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e comparados á sequência que constam no banco de dados (NCBI Blast – Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Sequenciamentos do gene *CBP* dos portadores de RTSs

Os resultados exposto neste trabalho são referentes ao sequenciamento direto do exon 2 ao 31 do gene *CBP* de 20 pacientes com RTSs, que resultou na identificação de 8 alterações nucleotídicas confirmadas em replicatas: i) duas deleções, ii) três alterações do tipo *nonsense* e iii) três do tipo *missense*. Dentre essas, seis alterações são novas, não descritas na literatura e duas mutações identificadas nesse estudo, do tipo *nonsense*, já foram descritas por Udaka et al. (2005) e Couptry et al. (2002). Foi também identificado um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) catalogado no banco de dados do *single nucleotide polymorphism* – SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

É importante esclarecer que não foi possível realizar o sequenciamento do exon 1 do *CBP*, pois após várias tentativas de amplificação com diferentes condições de temperatura de anelamento e concentrações de cloreto de magnésio, não obtivemos êxito na análise desse exon.

4.1.1 Deleção

Foram visualizadas deleções nos exons 12 e 15 nos pacientes P7 e P12, respectivamente. A análise da sequência do exon 12 do paciente P7 revelou uma deleção de 8 nucleotídeos (c.2444del8bpfs), levando ao desemparelhamento no quadro de leitura, que pode ter produzido uma proteína CBP reduzida, mantendo-se apenas 746 aminoácidos, devido à formação de um códon de parada 79 aminoácidos adiante no exon 14 (Figura 2). A deleção está localizada na região do domínio PAT1.

Figure 2 - Exon 12 do gene *CBP*: A) Deleção de 8 nucleotídeos (c.2444del8bpfs) presente no paciente P7; B) Sequência de nucleotídeos do *BLAST*, demonstrando em sublinhado os nucleotídeos que foram deletados no paciente.

O paciente P12 apresentou deleção de um nucleotídeo no exon 15 (c. 3236delGfs), que pode ocasionar mudança no quadro de leitura, levando a um códon de parada precoce de onze aminoácidos adiante no exon 16 (Figura 3). Essa deleção prevê a formação de uma proteína truncada com 1010 aminoácidos e encontra-se anterior a região do domínio Bromo do gene *CBP*.

Figura 3 - A seta indica posição da deleção de uma guanina no exon 15 em P12 (c.3236delGfs).

4.1.2 Alterações do tipo *nonsense*

Os pacientes P10, P18 e P19 apresentaram alterações do tipo *nonsense* no *CBP*. O paciente P10 apresentou alteração no exon 24, houve uma substituição de uma **citossina** por uma **timina** no nucleotídeo 4226

(c.4226C→T), que transcreve um códon de parada no aminoácido 1341 da proteína, em um dos alelos (p.Arg1341X). Essa alteração pode produzir uma proteína truncada com 1340 aminoácidos (Figura 4).

Figura 4 - A seta indica mudança de nucleotídeo em um dos alelos do exon 24 no paciente P10 (c.4226C→T).

Os pacientes P18 e P19 apresentaram alteração no exon 27 do gene *CBP*. Ambos apresentaram uma substituição de uma **citossina** por uma **timina** no nucleotídeo 4696 (c.4696C → T) que transcreve um códon de parada no aminoácido 1498 da proteína em um dos alelos (p.Arg1498X), que pode produzir uma proteína reduzida de 1497 aminoácidos. Essa alteração está localizada na região *plant homeodomain* (PHD) localizada no domínio KAT11 do gene *CBP* (Figura 5).

Figura 5 - Exon 27 do gene *CBP*: A) A seta indica mudança de nucleotídeo em um dos alelos do exon 27 em P18 (c.4696C → T); B) A mesma mudança de nucleotídeo é observada em P19 (c.4696C → T).

4.1.3 Alterações do tipo “*missense*”

Foram observadas três alterações nucleotídicas do tipo *missense*. O paciente P11 apresentou uma alteração na sequência do exon 31, havendo uma substituição de uma **guanina** por uma **adenina** no nucleotídeo 5923 (c.5923G→A) que promove uma mudança no códon 1907 de GCC (arginina) para ACC (treonina) em um dos alelos (p.Arg1907Thr) (Figura 6).

Figura 6. A seta indica transição de nucleotídeo em um dos alelos do exon 31 em P11 (c.5923G→A).

Outra alteração *missense* foi visualizada na paciente P14 que apresentou uma alteração no exon 8. Foi observado neste exon, uma substituição de uma **timina** por uma **citossina** no nucleotídeo 2015 (c.2015T→C), como mostra a figura 6. Isso pode causar mudança no códon 604 de CTA (leucina) para CCA (prolina) em um dos alelos (p.Leu604Pro). Essa alteração encontra-se localizada no domínio KIX do gene *CBP* (Figura 7).

Figura 7 - A seta indica mudança de nucleotídeo em um dos alelos do exon 8 no paciente P14 (c.2015T→C).

Paciente P15 apresentou uma alteração no exon 22 e na análise da sequência do exon 22 houve uma substituição de uma **adenina** por uma **guanina** no nucleotídeo 4076 (c.4076A → G) prevendo uma mudança no códon 1291 de CAT (histidina) para CGT (Arginina) em um dos alelos (His1291Arg) (Figura 8).

Figura 8 - A seta indica mudança de nucleotídeo em um dos alelos do exon 22 em P15 (c.4076A → G).

4.1.4 Polimorfismo catalogado

O gene *CBP* humano tem catalogado 1298 polimorfismos e dentre os pacientes sequenciados, o P18 apresentou um polimorfismo no exon 31 que se encontra registrado no banco de dados disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, identificado como rs115594471. É caracterizado por troca de uma **citossina** por uma **timina** no nucleotídeo 5874 (c.5874C→T). Essa transição nucleotídica, no códon 1890, traduz o mesmo aminoácido, ou seja, prolina para prolina (Pro1890Pro).

Um resumo de todas as alterações moleculares identificadas encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Alterações encontradas por sequenciamento do gene *CBP* em portadores brasileiros de RTSs

Paciente	Exon	Alteração Nucleotídica	Consequência	Domínio	Tipo
P14	Exon 8	c.2015T → C	p.Leu604Pro	KIX	Missense
P7	Exon 12	c.2444del8bpfs	p.M747fs → STOP830	PAT1	Deleção
P12	Exon 15	c.3236delG	p.G1011fs → STOP1021		Deleção
P15	Exon 22	c.4076A → G	p.His1291Arg	PHD	Missense
P10	Exon 24	c.4225C → T	p.Arg1341X		Nonsense
P18	Exon 27	c.4696C → T	p.Arg1498X	KAT11	Nonsense
P19	Exon 27	c.4696C → T	p.Arg1498X	KAT11	Nonsense
P18	Exon 31	c.5874C → T	p.Pro1890Pro		Silenciosa
P11	Exon 31	c.5923G → A	p.Arg1907Trp		Missense

4.2 Relação entre as manifestações clínicas e achados moleculares

Segundo os critérios adotados na seleção, 100% dos pacientes apresentam fácies típico, baixa estatura, presença de háluces e polegares alargados com membrana interdigital e deficiência intelectual. Desta forma, as características clínicas “maiores” não puderam ser usadas para diferenciar os pacientes com deleção e sem deleção. Analisando outras características fenotípicas frequentemente descritas nos portadores de RTSs, foi observada maior frequência de epicanto entre os portadores de alterações moleculares no gene *CBP* (Tabela 5).

Tabela 5 - Aspectos clínicos dos pacientes com alteração e sem alteração no gene *CPB*

Aspectos clínicos	Com alteração		Sem alteração		p
	pacientes	%	pacientes	%	
Atraso de desenvolvimento neuropsicomor/ deficiência intelectual	11/11	100,0	9/9	100,0	--
Fácies típico	11/11	100,0	9/9	100,0	--
Baixa estatura (<5%)	11/11	100,0	9/9	100,0	--
Microcefalia	10/11	90,9	8/9	88,9	1,00
Alterações cardiovasculares					
Cardiopatia congênita	1/11	9,1	1/9	11,1	1,00
Sopro cardíaco	2/11	18,1	5/9	55,5	0,16
Alterações no sist. respiratório					
Crises de sibilância	8/11	72,7	6/9	66,7	1,00
Infecções respiratórias recorrentes	8/11	72,7	8/9	88,9	0,60

“Continua”

Tabela 5 - Aspectos clínicos dos pacientes com alteração e sem alteração no gene *CPB* “continuação”

Aspectos clínicos	Com alteração		Sem alteração		p
	pacientes	%	pacientes	%	
Broncopneumonia de repetição	7/11	63,6	5/9	55,5	1,0
Alterações da musculatura esquelética					
Falanges alargadas polegares e háluces	11/11	100	9/9	100	--
Falanges proximais triangulares	7/11	66,6	3/9	33,3	0,37
Artelhos com clinodactilia	4/11	36,4	4/9	44,4	1,00
Clinodactilias nos dedos	6/11	54,5	7/9	77,8	0,37
Membrana interdigital	11/11	100	9/9	100	--
Deformidades da angulação do hálux	8/11	72,7	6/9	66,7	1,00
Anormalidades das falanges distais dos artelhos	10/11	90,9	7/9	77,8	0,57
Sobreposição dos artelhos	9/11	81,8	7/9	77,8	1,00
Cifose	8/11	72,7	7/9	77,8	1,00
Escoliose	8/11	72,7	6/9	66,7	1,00
Pés planos	10/11	90,9	9/9	100	1,00
Hiperextensibilidade articular	11/11	100	9/9	100	--
Alterações gastrointestinais					
Refluxo gastroesofágico	8/11	72,7	7/9	77,8	1,00
Obstipação	8/11	72,7	5/9	55,5	0,64
Alterações oftalmológicas					
Estrabismo	5/11	45,4	5/9	55,5	1,00
Cílios longos	11/11	100	6/9	66,7	0,07
Epicanto	10/11	90,9	4/9	44,4	0,05
Ptose palpebral	9/11	81,8	7/9	77,8	0,58
Erros de refração	7/11	66,6	6/9	66,7	1,00
Obstrução do ducto	6/11	54,5	4/9	44,4	1,00
Coloboma	2/11	18,2	0/9	-	0,48
Fendas palpebrais para baixo	9/11	81,8	4/9	44,4	0,16
Catarata	2/11	18,2	0/9	-	0,48
História natural					
Choro fraco	9/11	81,8	5/9	55,5	0,34

“continua”

Tabela 5 - Aspectos clínicos dos pacientes com alteração e sem alteração no gene *CPB* “conclusão”

Aspectos clínicos	Com alteração		Sem alteração		p
	pacientes	%	pacientes	%	
OMAs	7/11	63,6	5/9	55,5	1,00
Alterações em pele e anexos					
Sulco plantar profundo	7/11	63,6	7/9	77,8	0,64
Persistência dos coxins fetais	11/11	100	8/9	88,9	0,45
Hemangiomas	3/11	27,7	2/9	22,2	1,00
Quelóides	3/11	27,7	3/9	33,3	1,00
Hipertricose	9/11	81,8	7/9	77,8	1,00
Alterações no SNC					
Marcha rígida	10/11	90,9	7/9	77,8	0,57
Apnéia do sono	4/11	36,4	2/9	22,2	0,64
Deficiência de linguagem	11/11	100	8/9	88,9	0,45

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, o primeiro com casuística brasileira significativa (20 pacientes) investigada do ponto de vista molecular, nós encontramos seis novas alterações no gene *CBP* e um tipo de alteração molecular encontrada em dois de nossos pacientes já foram descrita na literatura (c.4696C → T). Os principais achados foram representados: i) uma alteração *nonsense* (c.4225C → T no exon24); ii) duas deleções (c.2444del8bpfs no exon 12 e c.3236delGfs no exon 15); iii) 3 alterações *missense* (c.2015T → C no exon 8; c.4076A → G no exon 22 e c.5923G → A no exon 31).

Foi visualizada uma alteração em dois de nossos pacientes já descrita na literatura (c.4696C → T) e um polimorfismo catalogado no banco de *SNPs* (c.5874C → T) iv) um polimorfismo catalogado no banco de *SNPs*, (c.5874C → T). Não encontramos correlações genótipo-fenótipo significativas, exceto a maior frequência da presença de epicanto entre os portadores de alterações moleculares no gene *CBP*.

Em outros estudos realizados pelo nosso grupo, mas que faziam parte da mesma casuística, dois dos pacientes (P3 e p8) apresentaram deleção do gene *CBP*, identificadas pelo método de array-CGH e uma paciente (P13) apresentou uma translocação aparentemente equilibrada t(2;16). Na análise subsequente com FISH revelou um cariótipo 46,XX.ish t(2;16)(p11.2;p13.3)(RT100+,RT166-;RT100+;RT166-), o que mostrou uma quebra exatamente na região do gene *CBP*.

Em relação aos 9 pacientes nos quais não foram encontradas alterações nos exons avaliados do gene *CBP*, podem ser levantadas as hipóteses que os mesmos apresentam mutações nas regiões intrônicas, como já descrita na literatura (Sharma et al., 2010) ou que possuam mutações em outros genes, incluindo o *EP300*, que tem incidência rara na RTSs (Roelfsema et al. , 2005; Gervasini et al., 2010).

Pelo método de sequenciamento genômico, a taxa de detecção de mutações no gene *CBP* no presente estudo foi de 40% (8/20). Comparável ao estudo de Couprie et al. (2002) que em uma casuística maior obtiveram uma taxa de 36,7% (22/60). Já Sharma et al. (2010) em estudo recente obtiveram uma taxa de 76,9% (10/13), porém analisaram além dos exons, as regiões intrônicas, onde também encontraram alterações. Considerando a combinação das diferentes técnicas utilizadas para detecção de alteração no gene *CBP* (sequenciamento, FISH e *array*-CGH), a taxa de detecção foi de 55% (11/20). Em outros estudos que utilizaram sequenciamento genômico e também outras técnicas para detecção de alteração no *CBP* foi observado os valores percentuais de 57% (12/21) (Udaka et al.,2005), e de 61,3% (19/31) (Bentivegna et al.,2006).

Em relação à distribuição das alterações nucleotídicas nos domínios do gene, nosso estudo seguiu padrão semelhante àqueles descritos na literatura (Bartsch et al 2002, Bartsch et al 2005; Couprie et al. 2002; Kalkhoven et al. 2003; Roelfsema et al. 2005; Udaka et al. 2005; Bentivegna et al. 2006; Sharma et al. 2010). Cinco alterações no gene *CBP* dos pacientes foram encontradas nos domínios PHD (1/7), PAT1(1/7), KIX (1/7)

e KAT11 (2/7), as demais alterações no gene são encontradas nas regiões entre os domínios do *CBP*. O banco de dados de mutações no *CBP* mostra que a maioria das alterações moleculares, como deleções, inserções, mutações *missense* e *nonsense*, concentram-se no domínio KAT11, também conhecido como domínio HAT. Sharma et al. (2010) demonstraram que existe uma predominância de alterações na região PHD ou CH2, localizada dentro do domínio KAT11.

No domínio HAT encontram-se duas regiões funcionalmente importantes, sendo que uma delas é parcialmente conservada entre subfamílias HAT que posteriormente foi chamada de sítio de ligação de coenzima A e a outra região está inserida no núcleo enzimático do domínio HAT do *CBP* chamado *plant homeodomain* (PHD) que é um tipo de *zinc-finger* caracterizado por cys4-his-cys3 predominantemente encontrado nas proteínas que interagem com a cromatina (Figura 9) (Aasland et al., 1995).

FONTE: Modificado de Kalkhoven et al, 2002.

Figura 9 - Representação esquemática da CBP, indicando a posição do domínio acetiltransferase (HAT) e PHD dentro desse domínio (PHD), o domínio KIX, o bromodomain (BD), a região CH3, o sítio de ligação p160 com o N-terminal e C-terminal domínios de transativação (TAD). Os números referem-se às posições de aminoácidos na *CBP* humana.

As regiões *zinc-finger* do gene *CBP*, que está localizado na parte N-terminal do domínio HAT, são essenciais para a sua atividade (Bordoli et al., 2001; Kalkhoven et al., 2002). Kalkhoven et al. (2003) supõem que a inativação da função HAT por presença de mutações nessas regiões *zinc-finger*, poderia dar origem ao fenótipo dos pacientes com RTSs. Estes autores observaram que pacientes com RTSs apresentavam mutação especificamente na região HAT do *CBP* e isso resultou em perda de atividade da acetiltransferase. Em nosso estudo, identificamos uma mutação *missense* (c.4076A → G) na mesma região do gene descrita por Kalkhoven et al. (2003), como mostra a figura 10. Portanto, a mutação no gene *CBP* no paciente 15 (P15) transcreve Arginina no lugar de Histidina (p.His1291Arg), que pode afetar a região PHD envolvida na coordenação de zinco, inativando a atividade da acetiltransferase.

FONTE: Modificado de Kalkhoven et al, 2003

Figura 10 - Estrutura PHD em *CBP* humano. As cisteínas (C), histidina(H) e os átomos de zinco (Zn) estão indicados. A seta indica a Histidina 1291 que foi alterada para Arginina em P16.

Kalkhoven et al. (2003) analisaram a RTSs associada a mutações na região PHD do gene *CBP* e sugeriram que nos pacientes com mutação nessa região, o principal efeito seria a alteração da atividade HAT. Estes autores com base na avaliação das proteínas mutantes verificaram que estas apresentavam redução no potencial coativador de CREB, função extremamente dependente do domínio HAT. Murata et al. (2001) também verificaram a supressão *in vitro* da atividade HAT em um paciente com RTSs com mutação missense nessa região.

A maioria das alterações encontradas no *CBP* promove a transcrição de proteínas truncadas instáveis com perda da região C-terminal e/ou domínio HAT, que parece ser essencial na patogênese da RTSs (Kalkhoven et al., 2002; Bannister e Kouzarides, 1996). Deste modo, a mutação c.4076A → G identificada no paciente P15 desse estudo podem ter gerado proteínas truncadas com perda de função específica do domínio HAT.

Por sua vez, a mutação c.4696C → T localizada no exon 27, identificada em dois pacientes (P18 e P19), foi do tipo *nonsense* e encontra-se no domínio HAT. A mesma mutação foi também descrita por Udaka et al. (2005) em 20 pacientes japoneses e um espanhol com RTSs e por Coupry et al. (2002) em 63 pacientes com RTSs da França, Bélgica e Suíça. Pela frequência de aparecimento de mutações nesse mesmo ponto em populações de etnias diferentes, isso sugere que possa ser uma região *hot spot*.

A mutação c.2015T → C identificada no paciente P14, é do tipo *missense* e está localizada no domínio KIX que é altamente conservado

(Radhakrishnan et al., 1997). Na superfície desse domínio existem resíduos hidrofóbicos específicos importantes para a ligação da alfa hélice de ativação dos domínios da CREB e c-Myb. Alteração dessa região, crucial para a interação da CREB e c-Myb, teoricamente pode elevar a predisposição a neoplasias hematológicas deste paciente, como demonstrado em modelos experimentais (Parker et al., 1998; Parker et al., 1999).

Estudos demonstraram o envolvimento do *CBP* com a resposta imune e na diferenciação de células, em que a falha no gene leva a formação de tumores benignos e malignos, bem como neoplasias hematológicas (Vilella et al., 2002; Baldwin et al., 1996; Chen e Greene, 2004). Além disso, outros estudos demonstraram a interação e regulação da proteína CREB na atividade transcripcional de p53, sugerindo que a perda do gene *CBP* possa contribuir para tumorigênese por meio da falha na indução da expressão e atividade de p53 (Ozdog et al., 2002; Kung et al. 2000; Kang-Decker et al., 2004; Cavalcanti, 2005). Ward et al. (2005) observaram desenvolvimento de tumores em ovários em camundongos com mutações específicas no *CBP* (Asn1978Asp). No entanto, Couprie et al. (2002) detectaram em paciente com RTSs uma mutação missense nessa mesma localização com troca dos aminoácidos Asparagina por Serina (Asn1978Ser). Isso sugere que diferentes trocas de aminoácidos, na mesma localização, podem gerar diferentes defeitos funcionais do CBP, o que pode ser causa da RTSs ou da predisposição a câncer de mama e/ou ovário (Ward et al., 2005).

Apesar das alterações envolvendo o *CBP* têm sido correlacionadas a

neoplasias hematológicas e a predisposição a tumores malignos, não foram observadas tais patologias em nossos pacientes até o momento. Contudo, pacientes com mutações no *CBP* devem ter acompanhamento clínico de vigilância em relação a desenvolvimento de neoplasias, principalmente hematológicas e de ovários, pois os estudos sobre os efeitos das mutações nos domínios do *CBP* não são conclusivos e não existem dados que correlacionam os tipos de neoplasias com as alterações gênicas encontradas no *CBP* (Ozdag et al., 2002; Kung et al. 2000; Kang-Decker et al., 2004; Ward et al., 2005).

Além das mutações nonsense e missense detectadas nesse estudo, foi observado uma deleção de oito pares de bases no exon 12 no paciente 7 (P7) que pode levar a formação de proteína truncada, pois a deleção leva a um desemparelhamento no quadro de leitura gerando a um codon de parada. Esta deleção está localizada no domínio PAT1 e não há descrição na literatura. Sabe-se que o domínio PAT1 está associado à proteína PAT1-*CBP* e essa interação é importante para divisão celular e transmissão precisa dos cromossomos durante a divisão celular (Marchler-Bauer et al., 2011). Atualmente não existe na literatura estudos da região PAT1 em pacientes com RTSs. A paciente P7 apresenta atraso mais grave de desenvolvimento intelectual e da linguagem quando comparados aos outros pacientes com mutação no gene *CBP*. Na primeira década de vida, ela apresentou infecções respiratórias recorrentes, com vários episódios de tonsilites e pneumonias.

Como bem descrito na literatura, pacientes com RTSs apresentam

translocações cromossômicas (Petrij et al., 1995; Tommerup et al., 1992), inversões (Petrij et al., 1995, Murata et al., 2001, Lamcobe et al., 1992), mutações de ponto no gene *CBP* (Petrij et al., 1995, Murata et al., 2001; Bartsch et al., 1999; Coupry et al., 2002; Sharma et al., 2010). Bartsch et al. (1999) sugeriram que o fenótipo mais grave de RTS, caracterizada por anormalidades viscerais e morte prematura, pode estar associado com grandes deleções. Entretanto, Coupry et al. (2002) não observaram a relação de grandes deleções (560kb) com mortalidade precoce nos pacientes com RTSs. Dois pacientes (P3 e P8) apresentaram deleções do gene *CBP*, identificadas por array-CGH, semelhantes aos estudos de Bartsch et al. (1999) e Coupry et al. (2002), porém as deleções grandes no gene não foram associadas à morte prematura e ao fenótipo mais grave neste estudo. Por outro lado, Bartsch et al. (2002) observaram que quando o gene é completamente deletado em um dos cromossomos, os pacientes apresentam um fenótipo clínico atípico e geralmente mais grave. Isso sugere que outros genes próximos ao *CBP*, possivelmente são afetados por efeito de mudança de posição do *locus* causado pela deleção (Robyr et al., 2011).

A paciente 13 que apresentou o cariótipo 46,XX,ish t(2;16)(p11.2;p13.3)(RT100+,RT166-;RT100+;RT166-), com quebra na região do gene *CBP* foi avaliada do ponto de vista genético-clínico aos 19 anos, na qual apresentava os principais sinais clínicos da síndrome e deficiência intelectual profunda, a mesma evoluiu com sinais de mielodisplasia após a segunda década de vida.

Neste trabalho, o emprego das técnicas de cariótipo, FISH, *array*-CGH e sequenciamento permitiram a identificação de alterações no gene *CBP* em 11 dos 20 pacientes avaliados (55%). Os nove pacientes que não apresentaram diagnóstico molecular esclarecido há a perspectiva de serem estudados com a seguinte proposta: i) Sequenciamento dos *íntrons* do gene *CBP* ii) Sequenciamento do gene *EP300*.

Como relatamos anteriormente, não foi possível realizar o sequenciamento do exon 1 do *CBP*. Entretanto, buscamos na literatura a frequência de mutações no exon 1 dos pacientes com RTSs e apenas os autores Bentivegna et al. (2005) e Couptry et al. (2002), identificaram um paciente em suas casuísticas cuja mutação no gene *CBP* se localizou neste exon. Por outro lado, Sharma et al. (2010) desenhou seus primers afim de compreender maior parte dos exons do *CBP* e encontrou dificuldades para amplificar a região de fronteira entre *íntron-exon* do exon 2, por ser uma região rica em citosina-guanina (CG) e também não sequenciou o exon 1, talvez pelas mesmas dificuldades que encontramos no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com a realização do sequenciamento do *CBP*, foi possível confirmar o diagnóstico molecular de RTSs em 8 pacientes. Neste pacientes, encontramos seis novas alterações: i) uma alteração *nonsense* (c.4225C → T no exon24); ii) duas deleções (c.2444del8bpfs no exon 12 e c.3236delGfs no exon 15); iii) três alterações *missense* (c.2015T → C no exon 8; c.4076A → G no exon 22 e c.5923G → A no exon 31). Foi visualizada uma alteração em dois de nossos pacientes já descrita na literatura (c.4696C → T) e um polimorfismo catalogado no banco de *SNPs* (c.5874C → T).

No presente trabalho, a taxa de detecção de alteração molecular no *CBP* por sequenciamento direto foi de 40% (08/20). Porém, considerando a combinação das diferentes técnicas utilizadas (FISH, sequenciamento direto e array-CGH), a taxa de detecção total das alterações moleculares no *CBP* foi de 55% (11/20). Não houve correlação genótipo-fenótipo, exceto por uma maior frequência da presença de epicanto nos pacientes com alteração no *CBP*. A raridade da síndrome, o amplo espectro de variabilidade na expressão clínica e a subestimação da deficiência intelectual nos pacientes com RTSs frequentemente dificultam o diagnóstico clínico. Os estudos moleculares podem auxiliar na confirmação da suspeita diagnóstica da RTSs. Além disso, poderemos proceder à prevenção das complicações médicas, tratamento e aconselhamento genético apropriado aos familiares dos propósitos.

Keli Tieko Suzuki

ANEXOS

Anexo A

Tabela Suplementar 1 – Distribuição de mutações existentes no banco de dados de RTSs

Alteração Nucleotídica	Domínios CBP	Referências
p.R14G		Bentivegna et al. 2005
p.S23X	NHRD	Coupry et al. 2002
p.Asp35Ala	NHRD	Sharma et al., 2010
p.G79fsX86		Roeltsema et al. 2005
p.Q102X		Roeltsema et al. 2005
p.138delA+ins13bp	NHRD	Coupry et al. 2002
p.Q158fsX173		Bartsch et al. 2005
p.Val189Gly	NHRD	Sharma et al., 2010
p.Leu243Gly	NTAD	Sharma et al., 2010
p.S302fsX348		Roeltsema et al. 2005
p.Arg370X	BROMO	Coupry et al. 2002
p.Arg370X		Bentivegna et al. 2005
p.Arg370X	BROMO	Bartsch et al. 2002
p.Arg370X	BROMO	Bartsch et al. 2002
p.Val406Gly	Zf-TAZ	Sharma et al., 2010
p.R413X	NTAD	Roeltsema et al. 2005
p.R413X	NTAD	Coupry et al. 2002
p.R424X		Bentivegna et al. 2005
p.R424X		Bartsch et al. 2005
p.Asp426Gly	Zf-TAZ	Sharma et al., 2010
p. Cys427Gly	Zf-TAZ	Sharma et al., 2010
p.Asn435Lys	Zf-TAZ	Sharma et al., 2010
p.Lys439Asn	Zf-TAZ	Sharma et al., 2010
p.G461fsX469		Roeltsema et al. 2005
p.N494fsX527		Roeltsema et al. 2005
p.A581fsX586		Roeltsema et al. 2005
p.A631fsX632		Bartsch et al. 2005
p.Q662X		Bentivegna et al. 2005
p.840insT	NTAD	Coupry et al. 2002
p.Ala981Thr	-	Coupry et al. 2002
p.E996X		Bartsch et al. 2005
p.Q1118fsX1130		Bentivegna et al. 2005
p.P1132fsX1166		Roeltsema et al. 2005
p.T1144fsX1168		Roeltsema et al. 2005
p.R1173X		Bentivegna et al. 2005
p.Tyr1175Cys	KAT11	Bartsch et al. 2002
p.C1213X		Bartsch et al. 2005
p.His1235Gln	PHD	Sharma et al., 2010
p.K1239fsX1252		Bentivegna et al. 2005
p.S1256X		Bartsch et al. 2005
p.K1269X	KAT11	Coupry et al. 2002
p.F1275fsX		Roeltsema et al. 2005
p.Glu1278Lys	KAT11	Kalkhoven et al. 2003
p.Glu1278Lys	KAT11	Roeltsema et al. 2005

“continua”

Tabela Suplementar 1 – Distribuição de mutações existentes no banco de dados de RTSs “continuação”

Alteração Nucleotídica	Domínios CBP	Referencias
p.Glu1278Gly	KAT11	Udaka et al 2005
p.G1335R		Li, 2010
p.Asp1340Ala	PHD	Sharma et al., 2010
p. Arg1378Pro	PHD	Murata et al. 2001
p.Glu1384Gly	PHD	Sharma et al., 2010
p.His1413Pro	PHD	Udaka et al 2005
p.Asp1435Val	PHD	Bartsch et al. 2005
p.F1440fsX1451		Murata et al. 2001
p.R1441fsX1452		Bartsch et al. 2005
p.Thr1447Ile	PHD	Roeltsema et al. 2005
p.Tyr1450His	PHD	Roeltsema et al. 2005
p.Glu1459Asp	PHD	Sharma et al., 2010
p.Y1466X	KAT11	Coupry et al. 2002
p.V1467fsX1467		Roeltsema et al. 2005
p.His1470Arg	PHD	Roeltsema et al. 2005
p.G1479X		Bentivegna et al. 2005
p.Tyr1482Cys	PHD	Bentivegna et al. 2005
p.1498X	KAT11	Coupry et al. 2002
p.D1543Y		Bentivegna et al. 2005
p.Ser1533Cus	KAT11	Sharma et al., 2010
p.Val1613Met	KAT11	Sharma et al., 2010
p.K1627X		Roeltsema et al. 2005
p.F1633fsX1655		Murata et al. 2001
p.Asp1651His	KAT11	Murata et al. 2001
p.L1655fsX1743		Bentivegna et al. 2005
p.Arg1664His	KAT11	Bartsch et al. 2005
p.Arg1664His	KAT11	Roeltsema et al. 2005
p.Leu1668His	KAT11	Sharma et al., 2010
p.Glu1724Lys	ZZ_CBP	Sharma et al., 2010
p.Thr1735Arg	ZZ_CBP	Sharma et al., 2010
p.H1738fsX1748		Murata et al. 2001
p.K1741fs1749		Murata et al. 2001
p.Gln1765His	ZZ_CBP	Sharma et al., 2010
p.Q1879X		Bartsch et al. 2005
p.Asn1978Ser	KAT11	Coupry et al. 2002
p.R2004X		Roeltsema et al. 2005
p.Q2007X		Bartsch et al. 2005
p.S2015fsX2039		Bentivegna et al. 2005
p.P2017fsX2342		Bartsch et al. 2005
p.Q2022fsX2037		Bentivegna et al. 2005
p.Q2043X	CTD	Coupry et al. 2002
p.Q2045X	CREB	Roeltsema et al. 2005
p.Q2045X	CREB	Roeltsema et al. 2005
p.2045insA	CREB	Coupry et al. 2002
p.M2221L	GR	Coupry et al. 2002
p.Ala2243Val	GR	Coupry et al. 2002
p.2827delC		Coupry et al. 2002

“continuação”

Tabela Suplementar 1 – Distribuição de mutações existentes no banco de dados de RTSS “conclusão”

Alteração Nucleotídica	Domínios <i>CBP</i>	Referencias
p.3096insT		Coupry et al. 2002
p.4945delA	E1ABD	Coupry et al. 2002

NRBD: domínio de ligação do receptor nuclear; NTD: domínio de transativação N-terminal; BR: domínio Bromo; KIX: domínio de ligação de CREB; Zf-TAZ: região rica em Cys/His; PHD: região rica em Cys/His; KAT11: domínio Histona acetiltransferase; ZZ_CBP: região rica em Cys/His; CTD: domínio de transativação C-terminal; GR: Região rica em Gln; E1ABD: domínio de ligação E1A;

Anexo B

Protocolo clínico de avaliação dos pacientes com SRT

Nome:

Data de Nascimento:

Endereço:

Telefone:

Nome da Mãe: () anos

Nome do Pai: () anos

sexo do paciente: 1= Masculino 2= Feminino

Idade atual (anos e meses):

Raça: 1= Caucasiana 2=Africana 3= Oriental 4= Outras 5=Desconhecida

País no qual reside: Estado no qual reside:

Número total de crianças na família:

Antecedentes obstétricos da mãe: () G () P () A

Idade materna na gestação do paciente: anos

Idade paterna na gestação do paciente: anos

Dados de Pré-Natal:

Realizou pré-natal: não () sim () Local: a partir de:

Intercorrências:

Polidrâmnio: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

sangramento () hipertensão arterial () febre () diabetes () ganho de peso:

Uso de medicamentos () quais:

época:

Outras complicações pré-natais: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Dados do Parto: normal () cesáreo () Indicação do parto cesáreo:

fórceps ()

Duração da gestação em semanas: termo () pré-termo ()

apresentação: cefálica () pélvica () situação transversa ()

História de sofrimento ou complicações ao nascimento: 1= Notável 2=Não notável

3=Indeterminado

Dados de nascimento:

Peso de nascimento: g (p)

Comprimento: cm (p) PC: cm (p)

Intercorrências no berçário: icterícia () desconforto respiratório ()

Outras:

Alta do berçário: () dias

DNPM:

sustentou cabeça: sentou: andou sem apoio:

primeiras palavras: controle esfinteriano. Início escolar:

hipotonia () atraso motor ()

Exame físico: Idade:

data da avaliação:

Peso: 1= Percentil 6th-50th 2=Abaixo do percentil 6th
3=Acima do percentil 50 4= Indeterminado

Estatura: 1= Percentil 6th-50th 2=Abaixo do percentil 6th
3=Acima do percentil 50 4= Indeterminado

Perímetro cefálico: 1= Percentil 3-50 2=Abaixo do percentil 3
3=Acima do percentil 50 4= Indeterminado

Crânio:

História de fontanela ampla: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Fronte proeminente: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Forame magno proeminente: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Forame parietal no RX: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Face:

Sorriso característico (*grimacing smile*): 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Sobrancelhas arqueadas: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Sobrancelhas espessas: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Olhos

Ptose palpebral: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Cílios longos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Epicanto: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Fendas palpebrais p/ baixo: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Epicanto: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Obstrução do duto lacrimal: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Dici: cm (p) **Dice:** cm (p) Hipertelorismo: 1= Presente 2= Ausente

3= Indeterminado

Outras anormalidades oculares: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

tipo:

Eso ou exotropia: 1= Esotropia 2= Exotropia 3= Sem estrabismo 4= Indeterminado

5= Estrabismo presente mas não especificado de outro modo

Erros de refração: 1= Miopia 2= Hiperopia 3= Astigmatismo 4= Sem erro de refração

5= Indeterminado 6= Erro de refração presente mas não especificado de outro

modo

7= Combinação de erros de refração

Catarata: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Lesões coriônicas: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Coloboma: 1= Íris 2= Cristalino 3= Retina 4= Nervo óptico

5= Outro ou combinação 6= Sem coloboma 7= Indeterminado

Nariz

Ponte nasal baixa: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Ponta nasal encurvada p/ baixo: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Septo nasal estendendo-se 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

para as narinas

Orelhas

Orelhas de formato anormal: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Orelhas de rotação anormal: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Depressões anormais: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

nas linhas auriculares

Deficiência auditiva: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Boca

Retrognatia: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Lábio superior fino: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Abertura bucal pequena: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Palato ogival: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Anormalidades dentárias: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Sistema cardiovascular:

Sopro cardíaco: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

época da ausculta:

Doença cardíaca adquirida: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Cardiopatia congênita: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

tipo:

Hipertensão arterial: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Alterações no ECG: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Aparelho respiratório:

Estridor e/ou ronco: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Lobulação anômala pulmonar: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Sistema renal e urinário:

Anomalias do trato urinário: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

tipo:

Infecções do trato urinário: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Outras doenças renais adquiridas: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Sistema genital:

Descida incompleta dos testículos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Problemas ginecológicos/obstétricos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Desenvolvimento sexual: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Anomalias músculo-esqueléticas:

Falanges alargadas (polegares e háluces): 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Falanges proximais dos polegares triangulares: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Outros dedos com as pontas alargadas: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Clinodactilia dos dedos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Clinodactilia dos artelhos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Membrana interdigital entre os dedos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Membrana interdigital entre os artelhos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Anormalidade das falanges proximais dos artelhos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

(duplicação?)

Anormalidade das falanges distais dos artelhos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

(duplicação?)

Deformidade de angulação do hálux: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Sobreposição de artelhos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Hiperextensibilidade articular: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Luxação patelar: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Luxação da cabeça do rádio: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Idade óssea atrasada: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Anormalidades do esterno: 1=Fusão precoce 2=Pectus excavatum 3= Pectus carinatum
4=Outros 5=Indeterminado 6=Ausente

Fusão de costelas: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Anomalias de arco de C1: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Anomalias de coluna: 1= Cifose 2= Escoliose 3=Espondilolistes
4=Outras anomalias vertebrais 5= Ausente 6= Indeterminado

Meningomielocèle: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Bacia (acetábulo angulado, ilíaco achatado) : 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Anomalias de quadril: 1= Luxação congênita 2=Legg-Perthes

3= Outras combinações inclusa 4=Ausente 5=Indeterminado

Pés planos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Sulco plantar profundo entre o hálux e o 2º artelho: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Pele e anexos:

Prega palmar única: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Coxins fetais persistentes: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Nevus flammeus: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
(hemangioma)

Quelóides: 1=Presente (descreva a causa e a região, eg pós-lesão, queimadura, pós-operatório, espontâneo, outros)

2= Ausente 3= Indeterminado

Hirsutismo: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Mancha café-au-lait: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Mamilos extranumerários: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Sistema Nervoso Central

Reflexos patelares hiperativos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Marcha rígida (tight heel cords): 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Convulsões: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 Anormalidades no EEG: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 Anormalidades na imagem cerebral (US, TC, RNM): 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 tipo:
 Deficiência auditiva: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 Apnéia de sono: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
Deficiência mental: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 Avaliação da Higiene Mental: não () sim () idade: data:
 QI: idade: data:
 1= Abaixo do percentil 50
 2= DM leve (50th-75th)
 3= Acima do percentil 75
 4= Indeterminado
 Deficiência da linguagem expressiva 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 (mais gravemente acometido que o QI):
História natural:
 Choro fraco: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 Dificuldades alimentares: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 Refluxo gastroesofágico: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 Obstipação: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 Infecções respiratórias recorrentes: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 tipos:

 Otite média: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado
 época:
 nº de episódios:

Problemas anestésicos: 1= Presente 2= Ausente 3= Indeterminado

Fraturas: 1= Presente (especificar o local)
 2= Ausente 3= Indeterminado
Tumores: 1= Presente (especificar o local)
 2= Ausente 3= Indeterminado

Anexo C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. NOME DO PACIENTE :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDERECO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *Investigação molecular por sequenciamento do gene CBP em portadores da Síndrome de Rubinstein- Taybi*

2. PESQUISADORES: Profa. Dra. Magda Carneiro Sampaio e Dra. Leuridan Cavalcante Torres

CARGO/FUNÇÃO: Professora Titular. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL (CRM):

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto da Criança

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO x

X

RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

1. Gostaríamos de convidar seu filho (a) para participar de nossa pesquisa. Existe um gene chamado CBP que pode estar alterado em pacientes com a mesma doença do seu filho (a). O objetivo deste trabalho é estudar o DNA para saber se conseguimos achar algum problema no gene CBP que explique porque seu filho (a) tem a síndrome de Rubinstein-Taybi. Caso encontremos alguma alteração, saberemos se a doença pode se repetir caso vocês resolvam ter outros filhos, e também se o problema encontrado está relacionado com a gravidade, por exemplo, dos problemas de infecção respiratória que o seu filho (a) apresenta.

2. Os procedimentos realizados serão testes laboratoriais de DNA, que investigará as causas associadas à síndrome.

3. Serão feitas coletas de 10 mL de sangue periférico para realização dos testes laboratoriais. Nas crianças com peso inferior a 10 Kg, serão coletadas quantidades menores de sangue (5 mL); Será realizada uma única coleta de sangue.

Keli Tieko Suzuki

4. Existe um risco mínimo para o paciente. A coleta poderá provocar hematoma no local da picada da agulha. Os pais dos pacientes serão orientados de como tratar, caso ocorra hematoma no local.
5. O sangue colhido será usado para extração de DNA. Esta amostra de DNA será usada para os testes do gene CBP e pretendemos guarda-las para análises posteriores, uma vez que existem outros genes que estão envolvidos com a síndrome, por exemplo, o EP300. Sendo assim, gostaríamos de solicitar autorização para armazenar essas amostras para pesquisas futuras.
6. Não existe benefício direto para o paciente, No final do estudo, teremos um melhor conhecimento das causas que provocaram a síndrome de Rubinstein-Taybi nos pacientes.
7. Os pesquisadores envolvidos com este projeto estarão disponíveis para esclarecer as dúvidas que surgirão durante o desenvolvimento do projeto. Os principais investigadores são Profa. Dra. Magda Carneiro Sampaio, Dra. Leuridan Cavalcante Torres e Keli Tieko Suzuki que são encontradas na Av. Dr. Éneas Carvalho Aguiar, 647. Instituto da Criança, FMUSP (Telefones: 3069-8790 ou 3069-8606). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 255 – 5º Andar = tel: 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. Fax: 3069-6442, ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.up.br
8. Os pais ou responsáveis legais dos portadores da síndrome de Rubinstein-Taybi poderão desistir da participação na pesquisa, sem nenhum prejuízo no atendimento do paciente pelo Instituto da Criança – FMUSP.
9. Não serão divulgados os nomes dos pacientes.
10. Os pais ou responsáveis poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.
11. Os pacientes e seus pais não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os pais ou pacientes.
12. Em caso de dano físico, diretamente causado pelos procedimentos, o participante tem direito a tratamento médico no Instituto da Criança-FMUSP, sem indenizações.
13. Os pesquisadores deste trabalho se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa, ou outras que se destinarem a elucidação das causas genéticas da síndrome.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os procedimentos que serão realizados neste trabalho. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que meu filho (a) é isento de despesas e que ele tem a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente que meu filho (a) participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento do meu filho (a) neste serviço.

Keli Tieko Suzuki

Assinatura do paciente ou responsável legal.

Assinatura da testemunha

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência mental ou auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do paciente ou representante legal para participação neste Estudo.

São Paulo, _____ 2008

Keli Tieko Suzuki (Pesquisadora Executante)

Profª Dra. Magda Carneiro Sampaio e Dra. Leuridan Cavalcante Torres
(Pesquisadores responsáveis)

Anexo D – Aprovação

Carta datada de 01.12.09

Ao

Departamento de Pediatria

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24.03.10, tomou conhecimento das solicitações abaixo relacionadas do Protocolo de Pesquisa nº 0473/08, intitulado: "Estudo molecular em portadores da Síndrome de Rubinstein-Taybi."

- Alteração da Pesquisadora Responsável de Dra. Thelma Svelly Okay para Dra. Magda Carneiro Sampaio, que atualmente é orientadora oficial da aluna de Mestrado Keli Tieko Suzuki

- Relatório de Andamento do estudo:

- Mudança de Título para "Investigação Molecular por meio do seqüenciamento do gene CREB binding protein (CBP) em portadores da síndrome de Rubinstein-Taybi."

CAPPesq, 24 de Março de 2010.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFAUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 1995;20:56–9.

Bordoli L, Husser S, Luthi U, Netsch M, Osmani H, Eckner R. Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity. *Nucl. Acids Res.* 2001;29:4462–71.

Baldwin AS jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights Review. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83.

Bannister AJ, Kouzarides T. The CBP coactivator is a histone acetyltransferase. *Nature.* 1996;384:641-3.

Bartholdi D, Roelfsema JH, Papadia F, Breuning MH, Niedrist D, Hennekam RC, et al. Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: delineation of the phenotype of the first patients carrying mutations in EP300. *J Med Genet.* 2007;44:327-33.

Bartsch O, Labonté J, Albrecht B, Wieczorek D, Lechno S, Zechner U, Haaf T. Two patients with EP300 mutations and facial dysmorphism different from the classic Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(1):181-4.

Bartsch O, Locher K, Meinecke P, Kress W, Seemanová E, Wagner A, Ostermann K, Rödel G. Molecular studies in 10 cases of Rubinstein-Taybi syndrome, including a mild variant showing a missense mutation in codon 1175 of CREBBP. *J Med Genet.* 2002;39:496–501

Bartsch O, Schmidt S, Richter M, Morlot S, Seemanová E, Wiebe G, Rasi S. DNA sequencing of CREBBP demonstrates mutations in 56% of patients with Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS) and in another patient with incomplete RSTS. *Hum Genet.* 2005;117:485-93.

Bartsch O, Wagner A, Hikel G, Krebs P, Stumm M, Schmalenberger B, Böhm S, Balci S, Majewski F. FISH studies in 45 patients with Rubinstein-Taybi syndrome: deletions associated with polysplenia, hypoplastic left heart and death in infancy. *Europ J Hum Genet.* 1999;7:748-56

Bentivegna A, Milani D, Gervasini C, Castronovo P, Mottadelli F, Manzini S, Colapietro P, Giordano L, Atzeri F, Divizia M, Giovannucci M, Uzielli, Neri G, Bedeschi M, Faravelli F, Selicorni A, Larizza L. Rubinstein-Taybi Syndrome: spectrum of CREBBP mutations in Italian patients. *BMC Medical Genetics.* 2006; 7:77

Blough RI, Petrij F, Dauwerse JG, Milatovich-Cherry A, Weiss L, Saal HM, Rubinstein JH. Variation in microdeletions of the cyclic AMP-responsive element-binding protein gene at chromosome band 16p13.3 in the Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet.* 2000;90:29-34.

Breuning MH, Dauwerse HG, Fugazza G, Saris JJ, Spruit L, Wijnen H, Tommerup N, van der Hagen CB, Imaizumi K, Kuriki Y, van den Boogaard M-J, de Pater JM, Mariman ECM, Hamel BCJ, Himmelbauer H, Frischauf A-M, Stallings RL, Beverstock G C, van Ommen G-JB, Hennekam RCM. Rubinstein-Taybi syndrome caused by submicroscopic deletions within 16p13.3. *Am J Hum Genet.* 1993;52:249-54.

Cavalcanti Júnior Geraldo B. Relevância clínica e biológica das alterações do gene e proteína p53 nas leucemias. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2005;27(1): 75-6.

Chen LF, Greene WC, Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;3:392-401.

Chrivia JC, Kwok RPS, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein. *Nature.* 1993;365:855-9.

Ciacchi G, D'amore I, Fabrizi G, Rocchi R, Volpi N, Federico A. Rubinstein-Taybi Syndrome: report of two cases. *Acta Neurologica (Naples).* 1988;43:335-42.

Coffin GS. Brachydactyly, peculiar facies and mental retardation. *Am J Dis Child.* 1964;108: 351-9.

Coupry I, Roudaut C, Stef M, Delrue M-A, Marche M, Burgelin I, Taine L, Cruaud C, Lacombe D, Arveiler B. Molecular analysis of the CBP gene in 60 patients with Rubinstein-Taybi syndrome. *J med genet.* 2002; 39:415-21.

Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 2009; 459(7243):113-7.

El Hafidi N, Ghanimi Z, Gaouzi A, Benhamou B, Alaoui-M'sseffer F. Syndrome de Rubinstein-Taybi: à propôs d'une forme familiere. *Arch Pédiatrie.* 2004;11:978-9.

Filipp G. The Rubinstein-Taybi syndrome: report of 7 cases. *Clin Genet.* 1972;3:303-18.

Foley P, Bunyan D, Stratton J, Dillon M, Lynch SA: Further case of Rubinstein-Taybi syndrome due to a deletion in EP300. *Am J Med Genet A* 2009;149A:997–1000.

Gervasini C, Mottadelli F, Ciccone R, Castronovo P, Milani D, Scarano G, Bedeschi MF , Belli S, Pilotta A, Selicorni A, Zuffardi O, Larizza L. High frequency of copy number imbalances in Rubinstein–Taybi patients negative to CREBBP mutational analysis *European Journal of Human Genetics* 2010; 18:768–75;

Giles RH, Petrij F, Dauwerse HG, Den Hollander AI, Lushnikova T, Van Ommen G-JB, Goodman RH, Deaven LL, Doggett NA, Peters DJM, Breuning MH. Construction of a 1,2- Mb contig surrounding, and molecular analysis of, the human CREB-binding protein (CBP/CREBBP) gene on chromosome 16p13.3. *Genomics* 1997;42:96-114.

Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 2000;14:1553-77.

Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell.* 1997;90:595-606.

Hennekam RCM. Rubinstein–Taybi syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2006;14:981–5.

Hennekam RCM, Stevens CA, Van De Kamp JJP. Etiology and recurrence risk in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet Suppl*. 1990;6:56-64.

Hennekam RCM, Iommen EJP, Strengers JLM, Van Spijker HG, Jansen-Kokx TM G. Rubinstein-Taybi syndrome in a mother and son. *Eur J Pediatr*. 1989;148:439-41.

Imaizumi K, Kuroki Y. Rubinstein-Taybi syndrome with de novo reciprocal translocation t(2; 16)(p13.3; p13.3). *Am J Med Genet*. 1991;38:636-39.

Janknecht R. The versatile functions of the transcriptional co activators p300 and CBP and their roles in disease. *Histol Histopathol*. 2002;17:657-68.

Kalkhoven E, Roelfsema JH, Teunissen H, den Boer A, Ariyürek Y, Zantema A, Breuning M, Hennekam RCM, Peters DJM. Loss of CBP acetyltransferase activity by PHD finger mutations in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet*. 2003;12:441-50.

Kalkhoven E, Teunissen H, Houweling A., Verrijzer CP, Zantema A. The PHD type zinc finger is an integral part of the CBP acetyltransferase domain. *Mol. Cell Biol*. 2002; 22:1961–70.

Kang-Decker N, Tong CL, BoussouarF, Baker DJ, Xu W, Leontovich AA, Taylor WR, Brindle PK, van Deursen JMA. Loss of CBP causes T cell lymphomagenesis in synergy with p27(Kip1) insufficiency. *Câncer Cell*. 2004;5:177-89.

Kung AI, Rebel VI, Bronson RT, Ch'Ng LE, Sieff CA, Livingston DM, Yao TP. Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev*. 2000;14:272-7.

Lacombe D, Saura R, Taine L, Battin J. Confirmation on assignment of a locus for Rubinstein-Taybi syndrome gene to 16p13.3. *Am J Med Genet*. 1992;44:126-8.

Li C, Szybowska M. 2010. A novel mutation c.4003 G>C in the CREBBP gene in an adult female with Rubinstein–Taybi syndrome presenting with subtle dysmorphic features. *Am J Med Genet Part A* 152A:2939–41.

Lundblad JR, Kwok RP, Lurance ME, Harter ML, Goodman RH. Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature*. 1995;374:85-8.

Masuno M, Iamizumi K, Kurosawa K, Makita Y, Petrij F, Dauwerse HG, Breuning MH, Kuroki Y. Submicroscopic deletion of the chromosome region 16p13.3 in a Japanese patient with Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet*. 1994;53:352-4.

Marchler-Bauer A et al. "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins." *Nucleic Acids Res*. 2011;39(D)225-9.

McGaughan JM, Gaunt L, Dore J, Petrij F, Dauwerse HG, Donnai D. Rubinstein-Taybi syndrome with deletions of FISH probe RT1 at 16p13.3: two UK patients. *J Med Genet*. 1996;33:82-3.

Miller R W, Rubinstein J. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* 1995;56: 112-15.

Murata T, Kurokawa R, Krones A, Tatsumi K, Ishii M, Taki T, Masuno M, Ohashi H, Yanagisawa M, Rosenfeld MG, Glass CK, Hayashi Y. Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1071-6.

Ozdag H, Batley SJ, Forst A, Iver NG, Daigo Y, Bautell J, Arends MJ, Ponder BAJ, Kouzarides T, Caldas C. Mutation analysis of CBP and PCAF reveals rare inactivating mutations in cancer cell lines but not in primary tumors. *BR J Cancer*. 2002; 87:1162-5.

Parker D, Jhala US, Radhakrishnan I et al. Analysis of an activator: coactivator complex reveals an essential role for secondary structure in transcriptional activation. *Mol. Cell*. 1998;2: 353-9

Parker D, Rivera M, Brindle PK. Role of secondary structure in discrimination between constitutive and inducible activators. *Mol Cell Biol* 1999;19:5601-5607.

Petrij F, Dauwesr HG, Blough RI, Giles RH, Van Der Smagt JJ, Wallerstein R, Maaswinkel-Mooy PD, Van Karnebeek CD, Van Ommen G-JB, Van Haeringen A, Rubinstein J, Saal HM, Hennekam RCM, Peters DJM, Breuning MH. Diagnostic analysis of the Rubinstein-Taybi syndrome: five cosmidis should be used for microdeletion and low number of protein truncating mutations. *J Med Genet*. 2000;37:168-76.

Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RCM, Masuno M, Tommerup N, Van Ommen G-JB, Goodman RH, Peters DJM, Breuning MH. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature*. 1995;376:348-51.

Parker D et al. Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator: coactivator interactions. *Cell* 1997;91(6):741-752

Radhakrishnan, I. et al. Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator: coactivator interactions. *Cell* 91. 1997;741-52

Robyr D, Friedli M, Gehrig C, Arcangeli M, Marin M, Guipponi, Farinelli L, Barde I, Verp S, Trono D, Antonarakis SE. Chromosome conformation capture uncovers potential genome-wide interactions between human conserved non-coding sequences. *PLoS One*. 2011;6(3):e17634

Roelfsema JH, White SJ, Ariyürek Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, Bacino CA, den Dunnen JT, van Ommen G-J B, Breuning MH, Hennekam RC, Peters DJM. Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet*. 2005;76:17-23.

Rohlfing B, Lewis K, Singleton EB. Rubinstein-Taybi syndrome. Report of an unusual case. *Am J Dis Child*. 1971;121:71-4.

Rubinstein JH. Broad thumbs-hallux (Rubinstein-Taybi) Syndrome 1957-1988. *Am J Med Genet Supplement* 1990;6:3-16.

Rubinstein JH, Taybi H. Broad thumbs and toes and facial abnormalities. A possible mental retardation syndrome. *Am J Dis Child*. 1963;105:588-608.

Sharma N, Mali A M and Bapat S A. Spectrum of CREBBP mutations in Indian patients with Rubinstein–Taybi syndrome. *J. Biosci*. 2010;35:187–202

Siraganian PA, Rubinstein JH, Miller RW. Keloids and neoplasms in the Rubinstein-Taybi syndrome. *Med Pediatr Oncol*. 1989;17(6):485-91.

Stevens CA, Carey JC, Blackburn BL. Rubinstein-Taybi syndrome: a natural history study. *Am J Med Genet Suppl*. 1990;6:30-7.

Stevens CA. Patellar dislocation in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet*. 1997;72:188-90.

Taine I, Goizet C, Wen ZQ, Petrij F, Breuning MH, Aymé S, Saura R, Arveiler B, Lacombe D. Submicroscopic deletion of chromosome 16p13.3 in patients with Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet*. 1998;78:267-70.

Tommerup N, Van Der Hagen CB, Heiberg A. Tentative assignment of a locus for Rubinstein-Taybi syndrome to 16p13.3 by a de novo reciprocal translocation, t(7;16)(q34;p13.3). *Am J Med Genet*. 1992;44:237-41.

Torres LC. Avaliação da Imunocopetência dos portadores da Síndrome de Rubinstein Taybi. [Tese] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Tsai A, Dosset C, Walton C, Cramer A, Eng P, Nowakowska B, Pursley A, Stankiewicz P, Wiszniewska J, Cheung S. Exon deletions of the EP300 and CREBBP genes in two children with Rubinstein Taybi syndrome detected by aCGH. *Eu J of Human Genetics* 2010;19:43-9

Udaka T, Samejima H, Kosaki R, Kurosawa K, Okamoto N, Mizuno S, Makita Y, Numabe H, Toral JF, Takahashi T, Kosaki K. Comprehensive screening of CREB-binding protein gene mutations among patients with Rubinstein-Taybi syndrome using denaturing high-performance liquid chromatography. *Cong*

Anomalies. 2005;45:125-31.

Villella A, Bialostocky D, Lori E, Meyerson H, Hostoffer RW. Rubinstein-Taybi syndrome with humoral and cellular defects: a case report. Arch. Dis. Child. 2000;83:360-1.

Wallerstein R, Anderson CE, Hay B, Gupta P, Gibas L, Ansari K, Cowchock FS, Weinblatt V, Reid C, Levitas A, Jackson L. Submicroscopic deletion at 16p13.3 in Rubinstein-Taybi syndrome: frequency and clinical manifestations in a North American population. J Med Genet. 1997;34:203-6.

Ward R, Johnson M, Shridhar V, deursen van J, Couch. CBP truncating mutations in ovarian câncer. J. Med. Genet. 2005;42:514-8.

Wiley S, Swayne S, Rubinstein JH, Lanphear NE, Stevens CA. Rubinstein-Taybi syndrome medical guidelines. Am J Med Genet. 2003;119A:101-10.

Zimmermann N, Acosta AM, Kohlhase J, Barstch O. Confirmation of EP300 gene mutations as a rare cause of Rubinstein-Taybi syndrome. Eur J Hum Genet. 2007; 15(8):837-42.

8.1 Referências eletrônicas

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Gene – Genes and mapped phenotypes, disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>

NCBI - National Center for Biotechnology Information, disponível em:
[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

OMIM: McKusick VA On line mendelian inheritance in man. Center for Medical Genetics, John Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National library of Medicine (Bethesda, MD), 2002. World Wide Web URL: (Online), disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&itool=-toolbar;>

UniSTS – Integrating Markers and Maps, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>

Vocabulário inglês-português de termos correntemente utilizados em biologia molecular

Termo em inglês	Tradução
Frameshift	modificação na grade, seqüência, matriz ou quadro de leitura
in frame	Toda alteração que não acarreta mudança na grade, seqüência, matriz ou quadro de leitura
missense	troca de sentido substituição de um determinado aminoácido por outro diferente
nonsense	sem sentido, substituição de aminoácido por códon de terminação
primer	oligonucleotídeo iniciador
splicing	processamento
splicing junction	sítio de processamento no RNAm

Glossário

Acido nucléico: macromolécula formada por polímero de nucleotídeo. As formas encontradas são em DNA e RNA podendo ser lineares ou circulares, em fita simples ou fita dupla.

Alelo: parte do cromossomo existente em mesmo locus (posição nas duas formas alternativas do mesmo gene).

Brometo de etídio: corante capaz de intercalar entre as fendas existentes na torção da dupla hélice do DNA. É utilizado para corar géis, permitindo, através da fluorescência em luz ultra violeta (UV), visualização indireta do DNA. É potente mutagênico possivelmente carcinogênico e teratogênico.

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina é uma molécula importante na transdução de sinal em uma célula. É um tipo de mensageiro secundário celular.

Códon: trinca de bases em uma molécula de DNA ou RNA, cada trinca origina um aminoácido específico. A combinação das quatro bases nitrogenadas (ATCG) geram 64 códons capazes de codificar 20 aminoácidos, além dos 3 códons de termino de leitura (TAA, TAG, TGA).

Congênito: presente no nascimento, mas não necessariamente genético.

Cromossomo: estrutura filamentar existente no núcleo da célula. Portador da informação genética.

Deleção: perda de uma sequência de DNA de um cromossomo. A deleção pode ser desde uma base até uma grande parte da sequência do DNA.

Deleção *in frame*: deleção que não destrói a grade, sequência, matriz ou quadro de leitura normal do gene.

Denaturação do DNA: conversão do DNA de bifilamentar e/ou fita dupla em estado unifilamentar ou fita simples, geralmente feita por aquecimento a 94°C para destruir as pontes de hidrogênio envolvidas no pareamentos de bases.

Desequilíbrio de ligação: ocorrência de combinações específicas de alelos com mais frequência, maior do que se poderia esperar ao acaso.

DNA (ácido desoxirribonucléico): molécula que codifica os genes responsáveis pela estrutura e funcionamento dos organismos vivos e permite a transmissão da informação genética de geração a geração.

DNA complementar (cDNA): DNA sintetizado de um molde de RNA mensageiro, pela ação da enzima transcriptase reversa.

DNA de cópia única: tipo de DNA que constitui a maioria do genoma.

DNA genômico: sequência de DNA de um gene ou segmento de um gene, incluindo a sequência de DNA de regiões não codificantes.

DNA polimerase: enzima que pode sintetizar uma cópia de filamento de DNA a partir de um filamento de DNA molde.

Dominante: uma característica expressa fenotipicamente nos heterozigotos.

Eletroforese: técnica utilizada para a separação de moléculas de DNA, RNA ou proteínas por diferenças de peso molecular gerando campo elétrico em gel (agarose, acrilamida etc.) onde estão as amostras.

Exon: região transcrita de um gene que está presente em um RNA mensageiro.

Gene: unidade hereditária, que em termos moleculares corresponde a sequência de DNA necessária para a produção de uma proteína.

Heterozigoto: um indivíduo ou genótipo com alelos diferentes em um determinado locus em um par de cromossomos homólogos.

Homozigoto: um indivíduo ou genótipo com alelos idênticos em um determinado locus em um par de cromossomos homólogos.

Íntron: um segmento do gene que é inicialmente transcrito, mas é removido do RNA primário transcrito, havendo recomposição das sequências chamadas exons.

Locus: a posição ocupada por um gene em um cromossomo.

Microdeleção: uma pequena deleção cromossômica, podendo ser no nível de um nucleotídeo.

Motivo: padrão de aminoácidos que é encontrado e um grupo de proteínas com atividade bioquímica similar e que freqüentemente é próximo do sítio ativo de proteína.

Mutação: qualquer alteração herdada permanentemente na sequência do DNA genômico.

Mutação com mudança na grade de leitura (*frameshift*): uma inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos, em número diferente de 3 ou qualquer

de seus múltiplos, causando a alteração na grade, sequência, matriz ou quadro de leitura da tradução.

Mutação de sentido trocado (*missense*): uma mutação que altera um códon finalizador ou stop códon (TAA, TGA, TAG), impedindo assim a continuação da síntese da cadeia polipeptídica. Resulta em proteína truncada que pode ser não funcional ou ter uma função alterada.

Mutação silenciosa: mutação que resulta na ausência completa da função de um gene.

Nucleotídeo: uma molécula composta de uma base nitrogenada, um açúcar de 5 carbonos e um grupo fosfato. Um ácido nucleico é um polímero de muitos nucleotídeos.

Oligonucleotídeo iniciador (*primer*): um oligonucleotídeo sintético curto destinado a hibridizar-se a um molde unifilamentar de DNA e criar uma ponta livre em 3', à qual a DNA polimerase pode adicionar nucleotídeos e sintetizar uma fita de DNA complementar; são utilizados como sondas ou para uso na reação em cadeia da polimerase.

Polimorfismo: a ocorrência conjunta em uma população de dois ou mais genótipos alternativos, cada um com uma frequência maior que a que pode ser mantida apenas pela mutação recorrente. Um locus é arbitrariamente considerado como sendo polimórfico se o alelo mais raro tiver uma frequência de 0,01, de modo que a frequência de heterozigotos seja de pelo menos 0,02. Qualquer alelo mais raro que 0,02 é considerado uma variante rara.

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): variação na sequência de DNA que consiste em uma única base.

Portador: um indivíduo heterozigoto para um determinado alelo mutante.

Primer: ver definição de oligonucleotídeo iniciador.

Processamento (*Splicing*): processo que remove os íntrons (seqüências não codificadoras de proteínas) dos RNAs transcritos. Alguns exons (seqüências codificadoras de proteínas) podem ser removidos juntamente com os íntrons. Dependendo de quais exons são removidos, podem ser formadas diferentes proteínas a partir do mesmo gene ou RNA inicial. As proteínas produzidas dessa forma são chamadas de “variantes de *splicing*” ou isoformas.

Reação em cadeia da polimerase (PCR): técnica de biologia molecular pela qual uma sequência alvo (ou template) de DNA é copiada com o auxílio de dois oligonucleotídeos flanqueadores da sequência alvo auxiliados por enzima do tipo polimerase.

Recessiva: gene ou característica que é expressa apenas em homozigose.

Resíduo: termo utilizado para cada aminoácido de uma proteína.

RNA (ácido ribonucléico): um ácido nucléico formado sobre um molde de DNA, contendo ribose em vez de desoxirribose.

RNA mensageiro (RNAm): um RNA, transcrito do DNA de um gene, que determina a seqüência de aminoácidos no polipeptídeo codificado.

Splicing: ver processamento.

SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism): polimorfismo conformacional de fita simples – baseia-se no fato de que fitas simples de DNA assumem conformação específica na dependência de sua seqüência de nucleotídeos, migrando de forma diferente em eletroforese não-denaturante; a metodologia é utilizada no rastreamento de alterações na seqüência do DNA.

(Mir, 2004; Thompson & Thompson, 2002).