

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Luana Oliveira dos Santos

**Estudo do gene *SHOX* em pacientes com
baixa estatura associada ou não a malformações
esqueléticas encaminhadas com suspeita clínica da
síndrome de Turner**

Recife

2013

Luana Oliveira dos Santos

**Estudo do gene *SHOX* em pacientes com
baixa estatura associada ou não a malformações
esqueléticas encaminhadas com suspeita clínica da
síndrome de Turner**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof^a Dr^a Neide Santos

Coorientador: Prof^a Dr^a Maria Tereza Cartaxo Muniz

**Recife
2013**

Luana Oliveira dos Santos

**Estudo do gene *SHOX* em pacientes com
baixa estatura associada ou não a malformações esqueléticas
encaminhadas com suspeita clínica da síndrome de Turner**

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora:

Dra. Neide Santos

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Paula Sandrin Garcia

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Anna Theresa de Souza Liberal

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2013

A Luiz e Ana, dedico...

Agradecimentos

Aos meus pais, Luiz e Ana, agradeço o amor, o apoio, o reconhecimento e a compreensão. Agradeço por abrirem as portas do meu futuro e por trabalharem dobrado, para que pudesse levar adiante a efetivação do meu ideal.

Aos meus irmãos, Luciane, Lúcio, Luiz Carlos e Marta, e sobrinhos, Carlinhos, Tavinho, Vitória e Vitinho, pelos incontáveis momentos compartilhados! Amo...!

À Prof^a Neide Santos, pela orientação e grande apoio! Obrigada por acreditar na realização deste trabalho e por estar sempre à frente na resolução dos problemas que surgiram no decorrer dos experimentos. Muitíssimo obrigada!!!

À Dr^a Theresa Liberal, pelas orientações e ajudas para a interpretação dos resultados, sem os quais seria muito mais difícil a realização dos experimentos.

À Prof^a Maria Tereza Cartaxo Muniz, pela co-orientação.

Ao Prof^o Marcos André, que além de disponibilizar seu laboratório para a realização das extrações de DNA, ajudou a solucionar dúvidas referentes ao projeto.

À Prof^a Maria José, pelo exemplo e à Prof^a Vilma, pelo apoio!

À equipe da Citogenética Humana, pelo companheirismo, carinho e trabalho dividido. À Adriana, que além de ser minha co-orientadora na graduação, auxiliou na parte experimental deste trabalho! À Juliana Vieira, que aprendeu e “sofreu” junto comigo ao executar a análise molecular! À Juliana Maria e Izabella, pela convivência.

À todos que fazem ou fizeram parte do LGCA e que de formas diferentes contribuíram para a realização desta dissertação! Allison, Amanda, Andrezza, Ana Catarina, Arnôldo, Ayda, Camila, Carol, Cirlene, Jefferson, Helen, Izaquiel,

Kalyne, Kleison, Lucas, Luiz, Marcos, Meri, Myrella, Rafael, Santelmo, Suellen e Tyago. Obrigada pela convivência e amizade!

À Raysa e Rayssa, do LabGen, que me mostraram todo o processo de extração de DNA. Adorei conhecer vocês!

Aos amigos Alice, Carol, Cinho, Clara, Cris, Fravinha e Milla pelos incontáveis momentos compartilhados ao longo destes anos. Obrigada pela amizade!!

À minha turma do Mestrado, em especial à Aleide e Priscila. Obrigada pela companhia nos momentos difíceis. A ajuda e apoio de vocês foram fundamentais!!

À Dr^a Gabriela Ferraz e Dr^a Andrea Resende do IMIP e Dr^a Jacqueline Araújo e Dr^a Barbara Gomes do HC, pela indicação dos pacientes para a realização deste trabalho.

Às enfermeiras, Kiara do HC e Ana Maria do IMIP, por coletarem o sangue dos pais e pacientes. Muito obrigada pela ajuda!

Aos pacientes e pais que aceitaram participar deste estudo e “deram o sangue” por este trabalho.

Aos componentes da banca examinadora pela gentileza ao aceitarem o convite para avaliarem esta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a FACEPE pelo auxílio financeiro.

E aos demais, que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho.

“O que a gente tem que aprender é, a cada instante, afinar-se como uma linhazinha para saber passar no furo de agulha que cada momento exige.”

(Guimarães Rosa)

Resumo

A baixa estatura é uma das maiores causas de encaminhamento de pacientes à uma unidade pediátrica, sendo uma indicação comum para avaliação genética. Um dos mais importantes genes analisados em pacientes com déficit estatural é o *SHOX* (*Short stature HOmeobox-cotainig gene*), relacionado com a baixa estatura e deformidades esqueléticas. Este estudo teve como objetivo definir o cariótipo das pacientes com suspeita clínica da síndrome de Turner (ST) e investigar a haploinsuficiência do gene *SHOX* em pacientes com cariótipo normal (46,XX) que apresentaram sinais clínicos de baixa estatura associada ou não a malformações esqueléticas. As pacientes foram atendidas no Serviço de Genética Médica do IMIP e no Serviço de Endocrinologia Pediátrica do HC. A análise citogenética foi realizada em linfócitos de sangue periférico e a investigação de deleções foi realizada através de marcadores de microssatélites. A análise citogenética realizada em 168 pacientes revelou alterações cromossômicas compatíveis com a ST em 68 pacientes (40,48%), 20 pacientes (11,90%) apresentaram outras constituições cariotípicas e 80 pacientes (47,62%) apresentaram cariótipo 46,XX, sendo 28 destas inseridas no estudo molecular. A análise citogenética nas pacientes com suspeita clínica da ST permitiu definir seus cariótipos e a investigação do gene *SHOX* permitiu descartar a haploinsuficiência do gene em 46,43% da amostra de pacientes citogeneticamente normais. Assim, a baixa estatura nestas pacientes não possui etiologia genética para os marcadores moleculares utilizados no presente estudo.

Palavras-chave: baixa estatura; gene *SHOX*; microssatélites

Abstract

Short stature is a major cause of referral of patient to a pediatric unit, a common indication for genetic evaluation. One of the most important genes analyzed in patients with short stature is the *SHOX* (*Short stature homeobox gene*) related with short stature and skeletal deformities. The aim of this study was define the karyotype of the patients with suspicion of the Turner syndrome (TS) and investigate *SHOX* haploinsufficiency in patients with normal karyotype (46,XX) who showed clinical signs of the short stature associated or not with skeletal deformities. The patients were evaluated at Medical Genetic Service of the IMIP and Pediatric Endocrinology Service of the HC. Cytogenetic analysis was performed on peripheral blood lymphocytes and investigation of deletions was performed using microsatellites markers. Cytogenetic analysis performed on 168 patients showed chromosomal defects compatible with TS on 68 patients (40,48%), 20 patients (11,90%) had others karyotypic alterations and 80 patients (47,62%) showed 46,XX karyotypes, 28 out of them were included in the molecular study. Cytogenetic analysis in patients with clinical suspicion of TS allowed to define their karyotypes and research of the *SHOX* gene excluded haploinsufficiency of the gene in 46,43% of the sample of patients cytogenetically normal. Thus, short stature in these patients has not genetic etiology for the molecular markers used in this study.

Key words: short stature; *SHOX* gene; microsatellites

Lista de Ilustrações

Figura 1. A. Curva de distribuição normal, onde os números se referem a fração da população fora do score de desvio padrão indicado. B. Gráfico de referência para altura, em meninas de 5 a 19 anos de idade. Fonte: Adaptado de Rosenfeld, 2005; http://www.who.int/growthref/cht_hfa_girls_perc_5_19years.pdf .	4
Figura 2. Gráfico de referência para altura, em percentil, em meninas de 5 a 19 anos de idade. Fonte: Adaptado de http://www.who.int/growthref/cht_hfa_girls_perc_5_19years.pdf .	4
Quadro 1 Causas endócrinas de baixa estatura.	6
Quadro 2 Causas não endócrinas de baixa estatura.	6
Figura 3. Fluxograma da análise molecular de baixa estatura. Fonte: Adaptado de Quinteiro García <i>et al.</i> (2004).	9
Figura 4. Localização do gene <i>SHOX</i> na região pseudoautosômica 1 (PAR1). Fonte: Adaptado de Oliveira & Alves (2011).	11
Figura 5. Localização cromossômica, estrutura genômica e as formas de cDNA. Fonte: Adaptado de Oliveira & Alves. (2011).	11
Figura 6. A transcrição do gene <i>SHOX</i> é regulada por promotores alternativos, P1 e P2, gerando diferentes transcritos, tipo 1 e tipo 2, com distintos 5'-UTRs. Fonte: Adaptado de Blaschke <i>et al.</i> (2003).	12
Figura 7. Deformidade de Madelung. a) Encurtamento do antebraço com pseudoluxação dorsal da porção distal da ulna; b) Radiografia de antebraço e punho com desvio ulnar do rádio e fusão da borda ulnar do rádio. Fonte: Jorge <i>et al.</i> (2008).	17
Figura 8. Aspecto geral de cinco indivíduos com Displasia mesomélica de Langer. Fonte: Zinn <i>et al.</i> (2002).	18
Quadro 3 A haploinsuficiência do gene <i>SHOX</i> .	24
Figura 9. Funções/efeitos dos microssatélites. Fonte: Modificado de Li <i>et al.</i> (2002).	25
Figura 10. O modelo <i>slippage</i> durante replicação. As fitas moldes estão desenhadas em vermelho, enquanto que as fitas recém-	28

sintetizadas estão traçadas em azul. Durante a replicação da sequência que possui a repetição (A), a maquinaria de replicação pode parar na fita *lagging*, devido a estruturas secundárias ou outros tipos de lesões (B). (C) Parcial desenrolamento da fita *lagging* pode levar a deslizamento na replicação quando esta reinicia, dando origem a uma inserção ou deleção da repetição (D), a depender sobre qual fita (recém sintetizada ou molde) o deslizamento ocorre. Fonte: Modificado de Richard *et al.* (2008).

- Figura 11.** Crossing-over desigual entre cromossomos homólogos. As regiões em preto e amarelo correspondem a sequências de microssatélites. Fonte: Modificado de Oliveira *et al.* (2006). 29
- Figura 12.** Cariótipo de uma paciente citogeneticamente normal (46,XX) com bandeamento G. 42

Lista de Tabelas

Tabela 1. <i>Primers</i> usados na amplificação dos marcadores de microssatélites.	35
Tabela 2. Distribuição dos cariótipos das pacientes com ST e das pacientes com outras constituições cariotípicas.	39
Tabela 3. Altura, idade e dados clínicos das pacientes citogeneticamente normais (46,XX) inseridas no estudo molecular.	40
Tabela 4. Resultados da análise dos marcadores de microssatélites de Repetições CA, DXYS10092 e DXYS10093. Os números indicam o tamanho dos picos (pb) referentes aos fragmentos dos marcadores de STR (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).	44
Tabela 5. Análise do tamanho dos alelos dos microssatélites (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).	45
Tabela 6. Análise do tamanho dos alelos dos microssatélites (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).	45

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

aa	aminoácidos
BEF	baixa estatura familiar
BEI	baixa estatura Idiopática
BENF	baixa estatura não familiar
BPN	peptídeo natriurético cerebral
chMM	<i>chicken micromass</i>
Cm	centímetro
DLW	discondostreose de Leri Weill
DML	displasia mesomélica de Langer
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
<i>FGFR3</i>	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
FISH	hibridação <i>in situ</i> fluorescente
FSH	hormônio folículo-estimulante
G	grama
GB	gonadoblastoma
GH	hormônio do crescimento
<i>GH1</i>	<i>growth hormone 1</i>
<i>GHR</i>	<i>growth hormone receptor</i>
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IC	idade cronológica
IO	idade óssea

ISCN	sistema internacional de nomenclatura em citogenética humana
<i>IGFALS</i>	<i>insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit</i>
Kb	kilobase
KCL	cloreto de potássio
M	molar
Mb	megabases
μL	microlitro
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
μM	micromolar
mL	mililitro
ng	nanograma
<i>NPPB</i>	<i>natriuretic peptide B</i>
OAR	<i>orthopedia aristaless rax</i>
PAR1	região pseudoautossômica 1
Pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pEf	previsão de estatura final
<i>PHOG</i>	<i>pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene</i>
PIG	pequeno para a idade gestacional
RCCP	retardo constitucional do crescimento e puberdade
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
<i>SHOX</i>	<i>short stature homeobox-containing gene</i>
<i>SHOX2</i>	<i>short stature homeobox 2</i>
<i>STAT5B</i>	<i>signal transducer and activator of transcription 5B</i>
ST	síndrome de Turner

SSRs	<i>simple sequence repeats</i>
STRs	<i>short tandem repeats</i>
TBE	tampão tris-ácido bórico e EDTA
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
UTR	região não traduzida
VC	velocidade de crescimento

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de ilustrações

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 O crescimento e a baixa estatura	3
2.2 O gene <i>SHOX</i>	10
2.3 Microssatélites	25
3. Objetivos	31
4. Material e Métodos	32
5. Resultados	38
6. Discussão	47
7. Conclusões	53
8. Referências Bibliográficas	55
9. Anexos	
10. Currículo Lattes atualizado	

1. Introdução

O crescimento é um processo dinâmico e contínuo que ocorre desde a concepção até o final da vida, influenciado e regulado por fatores intrínsecos, como os genéticos, e por fatores extrínsecos, que incluem uma variedade de características ambientais. O seu acompanhamento deve sempre ser realizado uma vez que ajuda a compreender o estado de saúde do indivíduo.

O crescimento longitudinal ocorre devido à proliferação e diferenciação dos condrócitos na placa de crescimento, e estando sob o controle de fatores genéticos e ambientais, qualquer desregulação pode levar ao desenvolvimento de baixa estatura, bem como as displasias esqueléticas. Quando uma criança apresenta estatura abaixo da considerada normal para a idade e sexo, o déficit de crescimento se torna motivo de preocupação por parte dos familiares. Assim, a baixa estatura é uma das maiores causas de encaminhamento à uma unidade pediátrica, sendo uma indicação comum para avaliação genética.

Cerca de 50% das pacientes encaminhadas ao Laboratório de Genética e Citogenética Animal do Departamento de Genética/CCB/UFPE para análise cromossômica tem revelado cariótipos normais (46,XX) em sangue periférico apesar de apresentarem achados clínicos compatíveis com a ST, como baixa estatura e/ou malformações esqueléticas.

Um dos mais importantes genes analisados em pacientes com déficit estatural é o gene *SHOX* (*Short stature HOmeobox-cotainig gene*). Alterações neste gene resultam em baixa estatura e deformidades esqueléticas em pacientes portadoras da síndrome de Turner (ST). Além disso, a sua haploinsuficiência tem sido detectada em indivíduos com Discondostreose de Leri Weill (DLW), uma displasia óssea, em pacientes com baixa estatura idiopática (BEI) e em crianças

pequenas para a idade gestacional (PIG). Uma forma mais grave de displasia óssea, a Síndrome de Langer, ocorre devido à deleção completa deste gene.

Uma investigação da haploinsuficiência do gene *SHOX* em pacientes com suspeita clínica de ST, porém com baixa estatura e cariótipo normal (46,XX), proporciona um diagnóstico molecular preciso para uma conduta médica diferenciada e fornece à família aconselhamento genético.

2. Revisão da Literatura

2.1 O crescimento e a baixa estatura

O padrão de crescimento é um dos melhores indicadores do estado de saúde da criança, sendo fundamental para a formação de um indivíduo adulto saudável. O crescimento pode ser dividido em diferentes estágios: o intra-uterino, a lactância, a infância e a adolescência (Diago Cabezudo *et al.*, 2006; Jorge *et al.*, 2006; Rosenbloom & Vilar, 2006).

O processo que leva um indivíduo a alcançar sua altura final continua sendo pouco conhecido devido ao grau de complexidade. O crescimento longitudinal é influenciado por diversos fatores, sendo assim uma condição multifatorial, em que os aspectos genéticos e neuroendócrinos assim como as questões ambientais (nutricionais, psicossociais, atividade física) influenciam no aumento corporal em altura de cada indivíduo (Quinteiro García *et al.*, 2004; Torres & Silva, 2007).

O processo de crescimento é a expressão fenotípica do potencial genético de cada indivíduo que pode ser modulada por fatores específicos e externos a ele, em que o alcance da estatura final vai depender do ambiente no qual o indivíduo está inserido (Cabezudo *et al.*, 2006; Torres & Silva, 2007). Assim, do ponto de vista nutricional, uma dieta de qualidade, rica em minerais e vitaminas, interfere no crescimento, da mesma forma que a interação mãe-filho e a prática regular de atividade física são indispensáveis para a promoção de um crescimento saudável (Torres & Silva, 2007).

Desvios de crescimento em relação ao padrão de normalidade pode ser um indicativo de uma doença específica, embora nem todas as variantes do padrão normal sejam consideradas patológicas. A baixa estatura, por definição, é altura

inferior a 2 desvios padrões (DP) abaixo da média para o sexo e idade, que é demonstrada na curva padrão de crescimento como um comprimento ou altura inferior ao percentil 3 (Fig. 1 e 2) (Cabezudo *et al.*, 2006; Seaver & Irons, 2009).

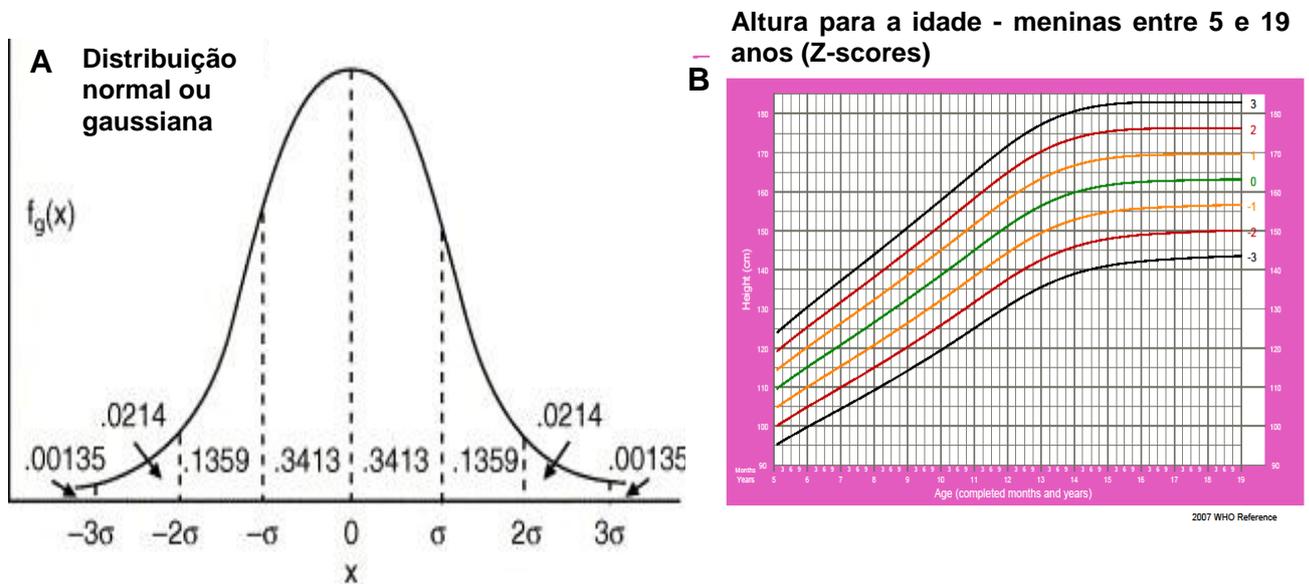


Figura 1. A. Curva de distribuição normal, onde os números se referem a fração da população fora do score de desvio padrão indicado. B. Gráfico de referência para altura, em meninas de 5 a 19 anos de idade. Fonte: Adaptado de Rosenfeld. (2005); http://www.who.int/growthref/cht_hfa_girls_perc_5_19years.pdf.

Altura para a idade – meninas entre 5 a 19 anos (em percentil)

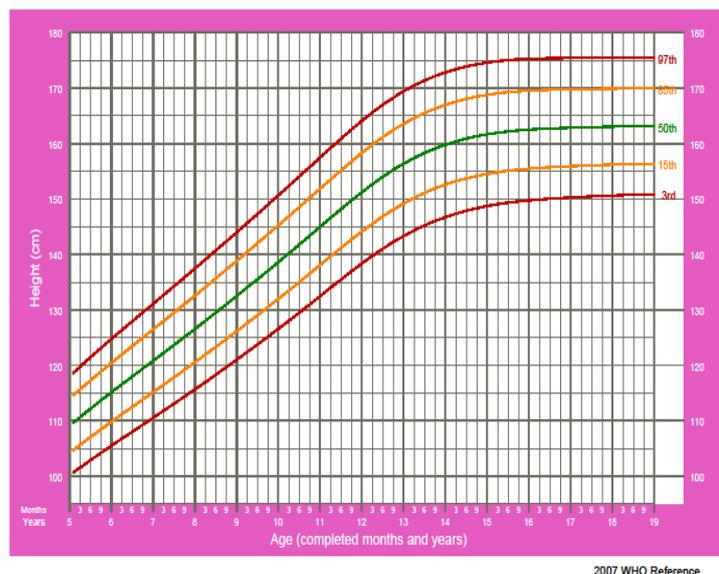


Figura 2. Gráfico de referência para altura, em percentil, em meninas de 5 a 19 anos de idade. Fonte: Adaptado de http://www.who.int/growthref/cht_hfa_girls_perc_5_19years.pdf.

Os distúrbios do crescimento podem ser reunidos em três grupos: os primários, secundários e a baixa estatura idiopática (BEI) (Kant *et al.*, 2003; Will *et al.*, 2008). Os distúrbios primários do crescimento são causados por anomalias nos ossos e/ou no tecido conjuntivo (condições intrínsecas da placa de crescimento), em que geralmente os pacientes apresentam estatura desproporcionada. Essas alterações incluem: distúrbios genéticos (síndrome de Noonan, síndrome de Silver-Russel, síndrome de Laurence-Moon, síndrome de Bardet-Biedl), distúrbios cromossômicos (síndrome de Turner, síndrome de Down), displasias ósseas (acondroplasia, hipocondroplasia, síndrome de Leri-Weil) e retardo do crescimento intra-uterino (Kant *et al.*, 2003; Jorge *et al.*, 2006; Rosenbloom & Vilar, 2006).

Nas alterações secundárias do crescimento o potencial ósseo é normal, porém há condições que modificam a fisiologia da placa de crescimento, ou seja, os fatores são extrínsecos ao tecido ósseo e conjuntivo. Nesse grupo estão inseridas diferentes doenças sistêmicas, em que a idade óssea frequentemente se encontra atrasada. Incluem as causas endócrinas de baixa estatura (Quadro 1) e as causas não endócrinas (Quadro 2) (Kant *et al.*, 2003; Jorge *et al.*, 2006; Rosenbloom & Vilar, 2006; Will *et al.*, 2008).

Quadro 1 Causas endócrinas de baixa estatura

Hipotiroidismo primário (congenito ou adquirido)
Síndrome de Cushing (endógena ou exógena)
Deficiência congênita de GH (isolada ou associada a outras deficiências de hormônios hipofisários)
Deficiência adquirida de GH
Tumores hipotalâmicos-hipofisários
Histiocitose X
Infecções do sistema nervoso central
Traumatismo craniano
Irradiação craniana
Acidentes vasculares cerebrais
Hidrocefalia
Síndrome da sela vazia
Distúrbios do metabolismo da vitamina D
<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 (mal controlado)
Diabetes insípido (não-tratado)
Resistência ao GH
Deficiência de IGF-I

Fonte: Rosenbloom & Vilar (2006).

Quadro 2 Causas não endócrinas de baixa estatura

Desnutrição
Patologias renais (insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica e acidose tubular)
Patologias cardiovasculares (cardiopatias congênitas e insuficiência cardíaca congestiva)
Doenças hematológicas (talassemia e anemia falciforme)
Doenças gastrointestinais (doença inflamatória intestinal, doenças hepáticas crônicas, doença celíaca, fibrose cística)
Doenças respiratórias (asma, fibrose cística)
Distúrbios imunológicos (doenças do tecido conjuntivo, artrite reumatoide juvenil, infecções crônicas)
Baixa estatura psicossocial

Fonte: Adaptado de Rosenbloom & Vilar (2006).

A BEI é um diagnóstico de exclusão, no qual se considera a história clínica e o exame físico detalhado, que agrupa diversas condições clínicas, em que há alteração do crescimento sendo este de etiologia desconhecida. Representa uma condição na qual o paciente possui altura -2 desvios padrão (DP) abaixo da média da população normal de mesmo sexo e idade, sem evidências de anormalidades cromossômicas, nutricionais, endócrinas e doenças sistêmicas. De modo geral, a

BEI representa cerca de 80% de todos os pacientes com baixa estatura que procuram atendimento (Longui, 2008; Carrascosa *et al.*, 2011; Wit, 2011).

A BEI é dividida em dois grupos: a baixa estatura familiar (BEF) e a baixa estatura não familiar (BENF) (Pedicelli *et al.*, 2009; Poyrazoglu *et al.*, 2009). Nos pacientes com BEF, os indivíduos são pequenos quando comparados à população de referência, mas permanecem dentro do intervalo esperado para a família (Pedicelli *et al.*, 2009). Nestes pacientes, a velocidade de crescimento (VC) é normal ou no limite inferior do normal, a idade óssea (IO) compatível com a idade cronológica (IC) e a previsão de estatura final (pEf) é abaixo do normal para a população geral (Longui, 2008).

A segunda classe, BENF, inclui crianças pequenas quando comparadas à população com estatura normal, apresentando-se também, abaixo do percentil dos pais (Longui, 2008; Pedicelli *et al.*, 2009). Na BENF estão incluídos indivíduos com retardo constitucional do crescimento e puberdade (RCCP), em que crianças e adolescentes são pequenos para um intervalo esperado e apresentam puberdade tardia, sendo esse diagnóstico de RCCP sempre de exclusão (Longui, 2008; Wit *et al.*, 2008; Poyrazoglu *et al.*, 2009).

A história clínica e exame físico de cada paciente são fundamentais para a realização de um diagnóstico preciso de baixa estatura, o qual é importante para o prognóstico e avaliação das possibilidades de tratamento, culminando com uma terapia adequada. Em diferentes casos, a perda da estatura é o resultado de uma desordem monogênica. Entretanto, devido ao grande número de genes candidatos, é fundamental escolher o mais apropriado a ser investigado (Quinteiro García *et al.*, 2004; Caliebe *et al.*, 2012).

Um dos mais importantes genes candidato para investigação em indivíduos com baixa estatura é o gene *SHOX* (*short-stature homeobox gene*). A perda de uma das cópias do *SHOX* resulta em uma variedade de fenótipos associados à baixa estatura e alterações esqueléticas, como observado na baixa estatura idiopática (BEI) onde as mutações de ponto ou deleção do *SHOX* têm sido observadas (Rao *et al.*, 1997; Rappold *et al.*, 2007). Outros genes candidatos como o *GH1* (*Growth hormone 1*), *GHR* (*growth hormone receptor*), *STAT5B* (*signal transducer and activator of transcription 5B*) e *IGFALS* (*insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit*) podem ser analisados, porém alterações nesses genes são bastante raras. A escolha dos genes a serem analisados dependerá das condições clínicas de cada paciente, visando reduzir o tempo e custo das análises (Fig. 3) (Quinteiro García *et al.*, 2004; Caliebe *et al.*, 2012).

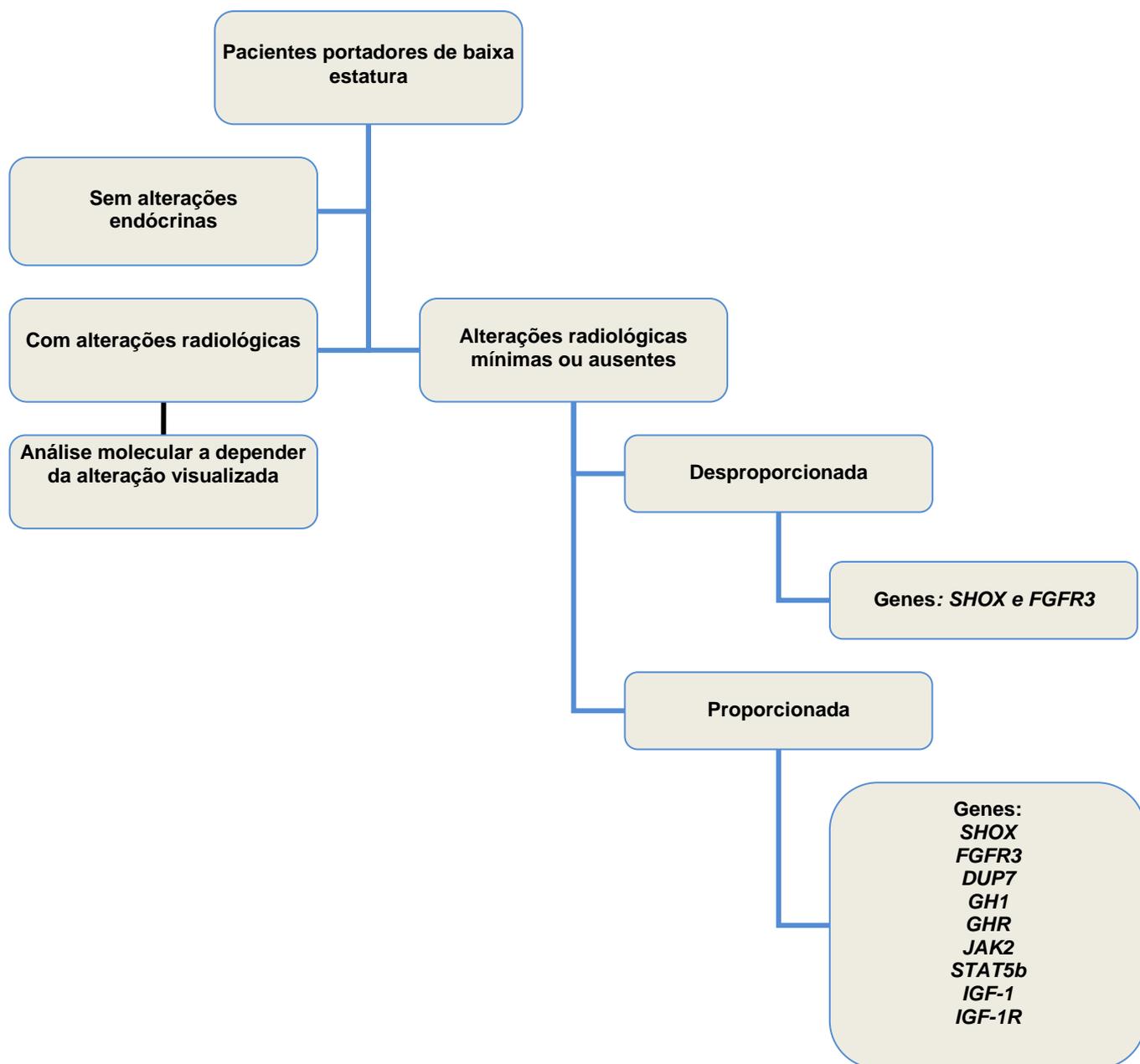


Figura 3. Fluxograma da análise molecular de baixa estatura.
 Fonte: Adaptado de Quinteiro García *et al.*(2004).

2.2 O gene *SHOX*

O intervalo crítico para a baixa estatura (uma região de 700 Kb) foi reduzido à um segmento de DNA de 170 Kb, onde nesta região, o gene *SHOX* foi identificado (Rao *et al.*, 1997). No mesmo ano, Elisson *et al.* identificaram um gene, nomeado *PHOG* (*Pseudoautosomal Homeobox-containing Osteogenic gene*), e constataram que a sua haploinsuficiência seria responsável pela baixa estatura visível na ST. Embora o gene isolado por Rao *et al.* (1997) e o gene descrito por Elisson *et al.* (1997) se tratassem do mesmo gene, a denominação atribuída por Rao *et al.* (1997) se tornou amplamente utilizada.

O gene *SHOX* reside na região pseudoautossômica 1(PAR1), que possui cerca de 2,6 Mb, nos cromossomos sexuais X (Xp22.3) e Y (Yp11.3) (Fig. 4). Este gene ocupa uma região genômica de cerca 40 kb e compreende 7 éxons (Fig. 5), sendo os éxons 1 e 2 constituídos por 262 e 708 pb, os éxons 3 e 4 possuem 209 e 58 pb, respectivamente. O éxon 5 possui 89 pb e os éxons 6a e 6b são constituídos por 1.166 e 625 pb, respectivamente, e possuem grande região 3' não traduzida (Jorge *et al.*, 2008; Binder, 2011).

A expressão do gene *SHOX* é regulada ao nível transcricional por duas regiões promotoras alternativas, P₁ e P₂, estando a primeira localizada à montante do éxon 1, e a segunda residindo no éxon 2, e que geram duas classes de transcritos, o transcrito tipo 1 e tipo 2, respectivamente. Os RNA mensageiros (RNAm) gerados diferem quanto ao tamanho da região 5' não traduzida (5' UTR), sendo que o transcrito tipo 1 é menos traduzido, embora apresente uma região 5' UTR maior, havendo dessa forma uma correlação inversa entre comprimento e o processo de tradução (Fig. 6). Esses dados sugerem que o promotor P₂ seja

utilizado em situações que necessitem de quantidades elevadas da proteína (Blaschke *et al.*, 2003).

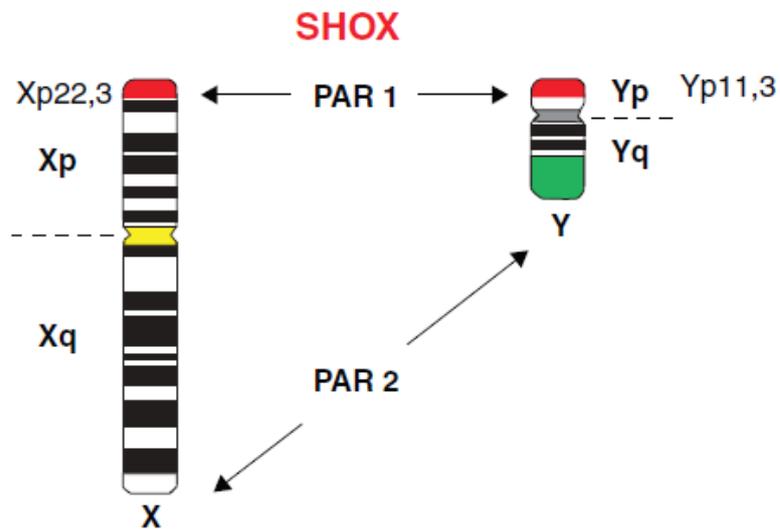


Figura 4. Localização do gene *SHOX* na região pseudoautossômica 1 (PAR1). Fonte: Adaptado de Oliveira & Alves (2011).

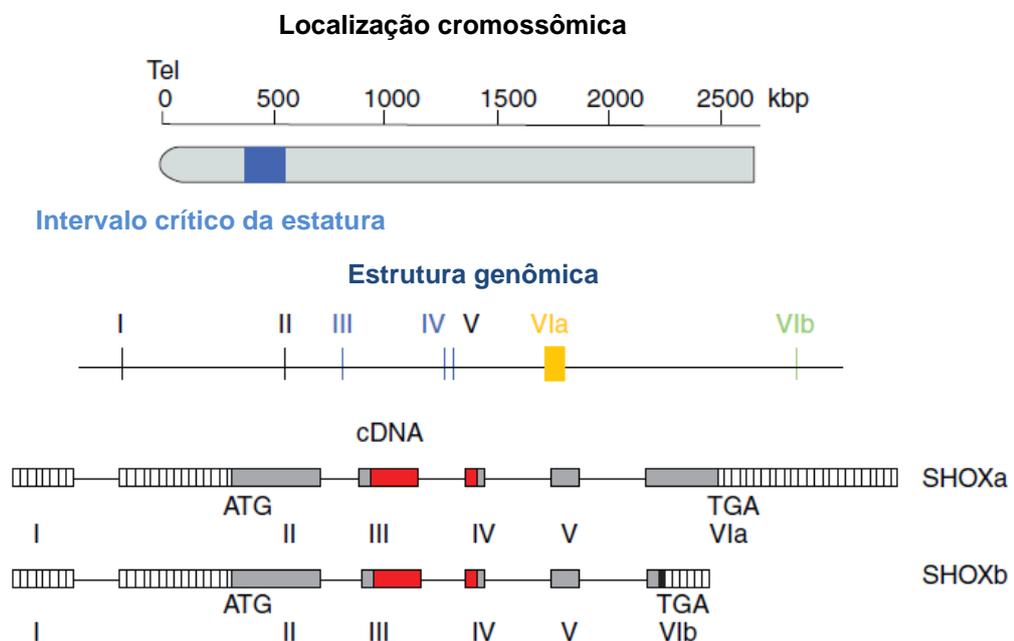


Figura 5. Localização cromossômica, estrutura genômica e as formas de cDNA. Fonte: Adaptado de Oliveira & Alves. (2011).

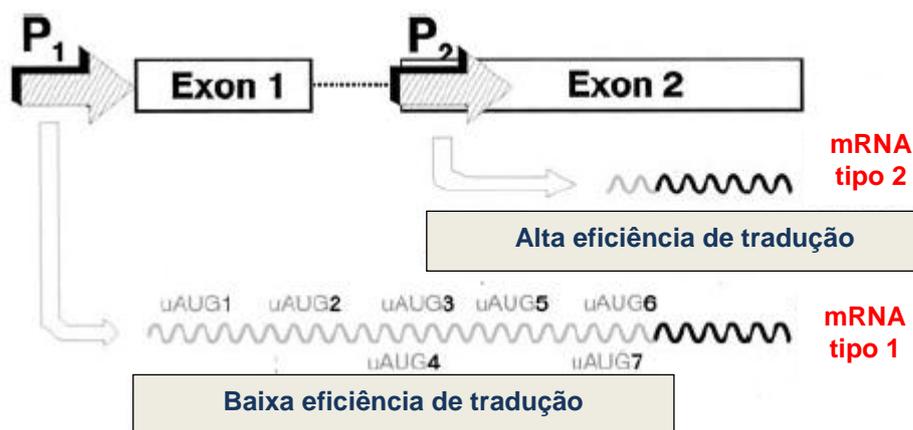


Figura 6. A transcrição do gene *SHOX* é regulada por promotores alternativos, P1 e P2, gerando diferentes transcritos, tipo 1 e tipo 2, com distintos 5'-UTRs. Fonte: Adaptado de Blaschke *et al.* (2003).

O gene *SHOX* faz parte de uma família de genes conhecidos como “homeobox gene”, os quais estão relacionados com a regulação do desenvolvimento e embriogênese. A região *homeobox* com 180 pb é porção do gene que codifica o homeodomínio, um motivo altamente conservado entre as espécies o qual compreende 60 aminoácidos (aa). Esta região desempenha a função de se ligar a sequências específicas de DNA, culminando com a regulação transcricional de genes alvos. Além disso, o domínio é importante para translocação nuclear bem como dimerização. No gene *SHOX*, os éxons 3 e 4 codificam este domínio (Svingen & Tonissen, 2006; Binder, 2011).

O gene *SHOX* dá origem a dois tipos de transcritos, gerados a partir do *splicing* alternativo dos éxons 6a e 6b: o SHOXa e o SHOXb, sendo idênticos a 5' e diferem devido a porção 3' no último éxon. A tradução gera dois tipos de proteínas: a proteína SHOXa, com 292 aa e a proteína SHOXb, com 225 aa (Rao *et al.*, 1997; Binder, 2011). As duas isoformas apresentam o homeodomínio de 60 aminoácidos, entretanto, apenas SHOXa possui o domínio OAR (*orthopedia aristaless rax*). Sendo assim, apenas o SHOXa atua como ativador transcricional,

uma vez que o domínio OAR é responsável pela transativação gênica (Binder, 2011; Oliveira & Alves, 2011).

As duas isoformas geradas a partir do *SHOX* revelam distribuição tecidual diferenciada, uma vez que, a proteína SHOXa é amplamente expressa enquanto que a expressão de SHOXb é mais restrita e predominantemente encontrada em fibroblastos da medula óssea (Rao *et al.*, 1997). Enquanto o SHOXa atua como ativador transcricional, SHOXb atua modulando a atividade de SHOXa, em que o heterodímero SHOXa-SHOXb apresenta atividade diferenciada de homodímeros SHOXa. A proteína SHOX2 codificada pelo gene *SHOX2* (*short stature homeobox 2*) localizado no cromossomo 3q25-q26.1 é paróloga ao SHOX, e acredita-se que SHOX2 e SHOX formem heterodímeros, podendo competir pelo mesmo sítio de ligação (Blaschke *et al.*, 1998; Oliveira & Alves, 2011).

Altos níveis de expressão do *SHOX* têm sido detectados em células ósseas trabeculares durante a fase adulta (Marchini *et al.*, 2007). A expressão foi também detectada nos músculos esquelético e cardíaco e nos fibroblastos da medula óssea. Durante a vida fetal, a expressão deste gene é restrita ao desenvolvimento dos membros bem como dos 1º e 2º arcos faríngeos (Oliveira & Alves, 2011). O gene *SHOX* é expresso na placa de crescimento a partir da 12ª semana de gestação e na infância, suportando a ideia que este gene tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento esquelético (Munns *et al.*, 2004).

A expressão do gene *SHOX* ocorre principalmente em condrócitos hipertróficos, indicando que este gene está envolvido na regulação da diferenciação e apoptose dessas células (Marchini *et al.*, 2004). O crescimento longitudinal ocorre na placa de crescimento através da ossificação endocondral. Neste processo, os condrócitos iniciam a proliferação (zona proliferativa) e, em

seguida, sofrem diferenciação, seguida por apoptose (zona hipertrófica) e mineralização. Assim, a expressão desse gene desempenha um efeito regulador positivo no desenvolvimento ósseo, uma vez que os condrócitos apoptóticos são substituídos por osteoblastos, ocorrendo o processo de ossificação (Munns *et al.*, 2004).

A proteína SHOX2 é idêntica ao SHOX em 83% ao nível de aminoácido e ambas apresentam um mesmo homeodomínio. Além disso, SHOX2 também é expresso no desenvolvimento dos membros, e sua expressão também tem sido detectada nos 1º e 2º arcos faríngeos, processo nasal, coração, sistema nervoso central e tubérculo genital. Entretanto, até o momento, SHOX2 não tem sido relacionado a nenhuma síndrome específica (Blaschke *et al.*, 1998; Oliveira & Alves, 2011). O gene *SHOX* está presente em várias espécies de vertebrados, entretanto não possui um ortólogo em roedores. Desta forma, diferentes estudos têm sido realizados utilizando embriões de galinhas, que possui um ortólogo do *SHOX*, para aumentar o entendimento do papel do *SHOX* no desenvolvimento dos membros (Sabherwal *et al.*, 2007; Decker *et al.*, 2011).

Para ativação transcricional, proteínas contendo o homeodomínio controlam a expressão de genes alvo através de suas ligações a sítios específicos de DNA na região promotora do gene alvo, que consistem de sequências palindrômicas TAAT(N)ATTA (Schneider *et al.*, 2005; Binder, 2011). O gene *NPPB* (*natriuretic peptide B*), que codifica o peptídeo natriurético cerebral (BPN) e regula a ossificação endocondral, tem sua região promotora reconhecida pela proteína SHOX, sendo influenciado e controlado pela expressão deste gene (Marchini *et al.*, 2007).

O gene *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*), que codifica um membro da família do receptor do fator de crescimento de fibroblastos, é regulado pela expressão do gene *SHOX*, atuando como repressor ou ativador gênico (Decker *et al.*, 2011). De fato, as proteínas HOX atuam como repressoras ou como ativadoras, dependendo dos cofatores tecido-específicos e dos sítios de ligação no promotor do gene alvo no qual a proteína se liga. Um papel importante é desempenhado por *FGFR3* no desenvolvimento dos membros, inibindo a proliferação e promovendo a diferenciação dos condrócitos, desempenhando um efeito regulador negativo do crescimento ósseo (Svingen & Tonissen, 2006; Decker *et al.*, 2011).

Uma regulação positiva foi detectada em U2OS (células de osteosarcoma humano) e em NHDF (fibroblastos humano) enquanto que um efeito repressivo de *shox* sobre *fgfr3* ocorreu em culturas chMM (*chicken micromass*). O efeito repressivo em culturas chMM seria considerado um sistema modelo que permitiria postular hipóteses que explicassem os diferentes fenótipos encontrados em indivíduos com defeitos no gene *SHOX*. Assim, as alterações no gene *SHOX* provavelmente aumentariam a expressão do gene *FGFR3* em ossos como a ulna, rádio, tíbia e fíbula, acelerando a fusão da placa de crescimento e culminando com encurtamento dos ossos. Por outro lado, mutações no gene *FGFR3* resultariam em maiores efeitos no fêmur e úmero, uma vez que o *FGFR3* não é regulado pelo *SHOX* nessas regiões. O parálogo do *SHOX*, o *SHOX2*, expresso nos segmentos rizoméricos não é capaz de regular o gene *FGFR3* (Decker *et al.*, 2011).

A proteína *SHOX* é fosforilada em vários resíduos de serina, entretanto o Ser106 é o maior sítio, sendo a fosforilação um mecanismo importante que regula

a atividade de muitos fatores de transcrição. Essa modificação pós-traducional pode interferir na estabilidade da proteína, localização, afinidade de ligação ao DNA bem como o potencial de transativação. A substituição *in vitro* e *in vivo* de Ser106 por Ala, não altera a localização nuclear e habilidade de ligação ao DNA, porém elimina a capacidade da proteína atuar como ativador transcricional e induzir a parada do ciclo celular e apoptose. Esses dados sugerem que a fosforilação é essencial para as funções biológicas de SHOX, modulando sua atividade (Marchini *et al.*, 2006).

Níveis normais da proteína SHOX são associados com crescimento ósseo e crescimento corpóreo longitudinal e a haploinsuficiência do gene *SHOX* está relacionada a um espectro clínico variado, onde mutações em um mesmo gene geram diferentes fenótipos. Apesar do cromossomo X sofrer inativação durante o início da embriogênese, cerca de 15% dos genes deste cromossomo escapam deste processo, sendo o gene *SHOX* um destes. Assim, este gene é herdado como duas cópias funcionais e a perda de função de um dos alelos origina alterações na sua atividade resultando em desordens do crescimento. Alterações no gene *SHOX* desencadeiam baixa estatura e malformações esqueléticas em indivíduos com Discondrosteose de Leri-Weill (DLW), Displasia Mesomélica de Langer (DML), Síndrome de Turner e indivíduos com baixa estatura idiopática (Binder, 2011; Oliveira & Alves, 2011; Álvarez-Mora *et al.*, 2012).

2.2.1 Doenças relacionadas ao gene *SHOX*

2.2.1.1 Discondrosteose de Leri-Weill

Discondrosteose de Leri-Weill (DLW) é uma displasia óssea caracterizada por baixa estatura e encurtamento mesomélico dos membros (antebraços e

pernas curtos). Essa condição é acompanhada por uma deformidade no punho, visível clinicamente ou através de raio X, correspondendo a uma pseudoluxação dorsal da porção distal do rádio e ulna (deformidade de Madelung). Essa condição clínica se desenvolve na maior parte dos casos, durante a adolescência sendo mais prevalente em mulheres (Fig. 7) (Llano-Rivas *et al.*, 2011; Salmon-Musial *et al.*, 2011). Alguns sinais como micrognatia, encurtamento dos metacarpos, cúbito valgo, palato ogival, geno varo e escoliose são observados em pacientes com DLW. Esta condição ocorre com frequência de 1:2.000 a 1:4.000 (Jorge *et al.*, 2008; Salmon-Musial *et al.*, 2011).

Alterações envolvendo o gene *SHOX* são encontradas em cerca de 60 a 100% dos pacientes com DLW, entretanto, não há uma correlação consistente entre genótipo-fenótipo. A expressão incompleta em famílias com DLW tem sido demonstrada, com pacientes portadores de defeitos do *SHOX*, apresentando apenas baixa estatura, porém sem deformidade de Madelung (Álvarez-Mora *et al.*, 2012).

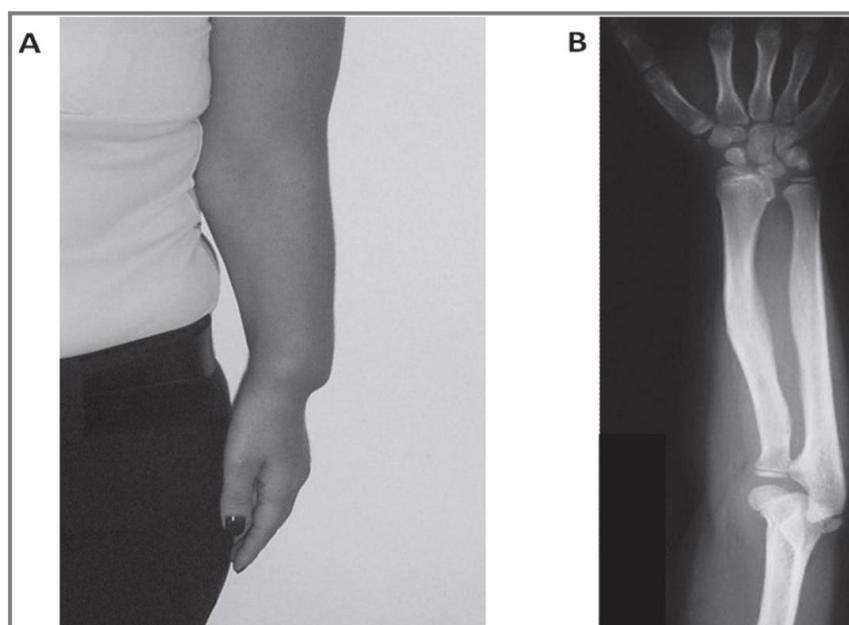


Figura 7. Deformidade de Madelung. a) Encurtamento do antebraço com pseudoluxação dorsal da porção distal da ulna; b) Radiografia de antebraço e punho com desvio ulnar do rádio e fusão da borda ulnar do rádio. Fonte: Jorge *et al.* (2008).

2.2.1.2 Displasia mesomélica de Langer

Displasia Mesomélica de Langer (DML) é uma condição rara caracterizada por baixa estatura e alterações esqueléticas, em que há um severo encurtamento dos ossos longos, deformidade de Mandelung, encurtamento do radio e um dorsal deslocamento da ulna distal (Fig. 8). Outras malformações são raras e comumente o desenvolvimento intelectual é preservado nestes pacientes. DML é uma condição clínica em que há perda de ambos as cópias do gene *SHOX*, sendo considerada uma manifestação homozigótica de DLW (Zinn *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004).



Figura 8. Aspecto geral de cinco indivíduos com Displasia Mesomélica de Langer. Fonte: Zinn *et al.*(2002).

2.2.1.3 Síndrome de Turner

A síndrome de Turner (ST) é uma das cromossomopatias mais frequentes encontradas na prática clínica, ocorrendo numa incidência aproximada de 1:2500 recém-nascidos vivos do sexo feminino (Bianco *et al.*, 2008; Donadile *et al.*, 2012). O número de recém-nascidas corresponde a uma pequena fração do total de conceptos com ST, uma vez que, a maioria dos conceptos humanos 45,X (99%) abortam espontaneamente durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário, usualmente no primeiro trimestre de gravidez (Wolff *et al.*, 2010; Zhong & Layman, 2012).

A ST está associada à baixa estatura e disgenesia gonadal, onde níveis de esteroides sexuais femininos levam ao atraso no desenvolvimento puberal, amenorreia primária e esterilidade. As pacientes com esta síndrome são acometidas por diferentes anormalidades esqueléticas, tais como tórax largo e em escudo, cúbito valgo, geno valgo e encurtamento do quarto metacarpo e metatarso. Estão presentes alguns sinais dismórficos, como face triangular, pescoço curto e alado (*pterygium colli*), micrognatia, palato em ogiva, estrabismo, mamilos hipoplásicos, baixa implantação dos cabelos na nuca, orelhas proeminentes e de implantação baixa, ptose palpebral, pregas epicânticas entre outros, e anomalias em órgãos tais como rins e coração (Baldin *et al.*, 2005; Hjerrild *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010).

Os sinais clínicos mais evidentes que apontam para um diagnóstico de ST estão relacionados à idade do indivíduo. Durante a fase pré-natal a suspeita desta síndrome ocorre devido à visualização, através de avaliação ao ultra-som fetal, de sinais clínicos sugestivos, tais como: higroma cístico, aumento da translucência nugal, coarctação da aorta, anomalias renais e retardo no crescimento. Além

disso, na triagem materna tríplice, níveis anormais das dosagens de gonadotrofina coriônica humana (hCG), estriol não conjugado e α -fetoproteína podem sugerir o diagnóstico de ST (Wolff *et al.*, 2010; Gonzalez & Witchel, 2012).

Cerca de 20 a 33% das pacientes recebem um diagnóstico quando recém-nascidas devido à presença de sinais clínicos como edema nas mãos e pés, *pterygium colli*, cardiopatia congênita, baixa implantação das orelhas, baixa implantação dos cabelos, hipoplasia da mandíbula. Aproximadamente 35% das garotas são diagnosticadas durante a infância através da investigação de baixa estatura, sendo este um sinal clínico constantemente encontrado na ST; cúbito valgo, nevos pigmentados múltiplos, dismorfia facial, 4º metacarpo curto, palato em ogiva, otite média crônica, e níveis aumentados de hormônio folículo-estimulante (FSH) (Lipay *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010; Collett-Solberg *et al.*, 2011; Gonzalez & Witchel, 2012).

O diagnóstico pode ser retardado até a idade adulta em até 10% das mulheres, particularmente naquelas que entram espontaneamente na puberdade e subsequentemente exibem amenorreia secundária ou infertilidade. A cariotipagem a partir de sangue periférico deve ser realizada em todos os indivíduos com suspeita de ST (Elsheikh *et al.*, 2002; Sybert & Mccauley, 2004; Santos *et al.*, 2010; Collett-Solberg *et al.*, 2011; Gonzalez & Witchel, 2012).

A ST é caracterizada citogeneticamente pela presença de um cromossomo X e perda total ou parcial do segundo cromossomo sexual, sendo um evento esporádico dentro de uma família (Wolff *et al.*, 2010; Balakov *et al.*, 2012). Em 70-80% dos casos, o cromossomo X normal é herdado da mãe, ou seja, é o cromossomo X ou Y paterno que é perdido, tanto em uma fase inicial durante a embriogênese como pela não-disjunção do par XY na meiose paterna. O erro na

meiose paterna ocorre, na maioria das vezes, na meiose I da espermatogênese, possivelmente refletindo a ausência de pareamento ao longo do bivalente X-Y com maior vulnerabilidade ao processo de não-disjunção (Hassold & Hunt, 2001; Bakalov *et al.*, 2012).

Uma variedade de alterações cromossômicas ocorre na ST e a cariotipagem, realizada a partir de cultura de linfócitos, tem revelado que cerca de 50% das pacientes com ST apresentam constituição cariotípica 45,X, e mosaicismos ocorrem em cerca de 20-30% das pacientes (Collett-Solberg *et al.*, 2011). Alterações cromossômicas estruturais como deleções, duplicações, translocações e anéis, também são visualizadas, as quais estão associadas a quebras cromossômicas e desequilíbrio gênico (Djordjević *et al.*, 2010; Onal *et al.*, 2012).

Cerca de 10% das pacientes com ST apresentam um isocromossomo do braço longo do X (46,X,i(Xq)) (Agrawal *et al.*, 2009) enquanto que um cromossomo X em anel é encontrado em cerca de 6% das pacientes (Onal *et al.*, 2012). Além disso, material derivado do cromossomo Y está presente em cerca de 5% das pacientes (Gonzalez & Witchel, 2012). As translocações são rearranjos raros em pacientes com ST (Djordjević *et al.*, 2010) assim como as duplicações que envolvem o cromossomo X (Burégio-Frota *et al.*, 2010).

As características clínicas na ST variam amplamente segundo a idade e constituição cromossômica que as pacientes apresentam, existindo correlações entre o cariótipo e o fenótipo das mesmas (Sybert & Mccauley, 2004; Agrawal *et al.*, 2009; Bispo *et al.*, 2012). Malformações congênitas encontradas na ST, como anomalias do coração e do sistema urinário, são mais frequentes nas pacientes com cariótipo 45,X. Nessas pacientes, a dificuldade de aprendizagem é maior

quando comparadas a pacientes mosaicos 45,X/46,XX (Gravhot *et al.*,1998; Hjerrild *et al.*, 2008; Agrawal *et al.*, 2009).

Pacientes com i(Xq) quase sempre apresentam um quadro clínico com gônadas em fita, amenorréia primária e baixa estatura (Rosa *et al.*, 2008). A manutenção ovariana é dependente da presença de dois cromossomos X íntegros, caso contrário os folículos ovarianos degeneram e a gônada torna-se disgenética (Mello *et al.*, 2005). O i(Xq) está associado ao aumento do risco de desenvolver patologias auto-imunes, como a Tireoidite de Hashimoto, um sinal clínico que parece ser mais frequente entre estes indivíduos (Balakov *et al.*, 2012).

Pacientes com ST possuem, geralmente, inteligência normal, com exceção daquelas que apresentam mosaicismo em que uma das linhagens celulares inclui um cromossomo X em anel (Agrawal *et al.*, 2009). Pequenos r(X) são associados a um grave fenótipo, incluindo retardo mental. A ausência do gene *XIST*, localizado dentro do centro de inativação Xq13.2, tem sido relacionada à esta condição atípica na ST. Entretanto, há relatos de portadoras do r(X) sem um grave fenótipo (Turner *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2008).

Pacientes com ST quando em mosaicismo com uma linhagem do cromossomo Y ou quando segmentos Y-específicos estão presentes, exibem um risco aumentado de desenvolverem o tumor gonadoblastoma (GB) (Bianco *et al.*, 2009). O GB é uma neoplasia associada ao desenvolvimento gonadal, sendo histologicamente definida como um tumor composto por dois principais tipos de células: ninhos contendo células germinativas misturadas a células de cordões sexuais, semelhantes às células imaturas de Sertoli ou granulosa. Em cerca de 66% dos casos são encontrados elementos semelhantes às células de Leyding ou

células luteinizadas no estroma. A aparência do tumor pode ser alterada por calcificação, que está presente na maioria dos casos, ou por hialinização (Scully, 1970, 1977; Pauls *et al.*, 2005).

Apesar do GB ser um tumor das células germinativas *in situ*, esta neoplasia apresenta considerável potencial maligno e em metade dos casos as células germinativas infiltram o estroma para formar tumores malignos das gônadas. Sendo assim, embora o gene responsável pelo desenvolvimento desta neoplasia ainda não tenha sido determinado, a detecção de um cromossomo Y por técnicas citogenéticas ou a análise de mosaicismo oculto de sequências Y-específicas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) tem sido estimulada para nortear a indicação da gonadectomia como método profilático (Bianco *et al.*, 2009; Kota *et al.*, 2012).

As alterações fenotípicas associadas a duplicações são geralmente atribuídas ao excesso de dosagem gênica da região duplicada. Esses rearranjos podem ser herdados ou *de novo*, sendo este último, uma condição rara e associada a estigmas de ST (Burégio-Frota *et al.*, 2010). As translocações balanceadas em indivíduos com cariótipos 45,X, translocações entre cromossomos autossomos e sexuais bem como, entre cromossomos sexuais X;Y também são eventos raros, porém estão associados ao fenótipo encontrado em pacientes com ST (Djordjević *et al.*, 2010; Portnoï *et al.*, 2012).

A variedade de características somáticas na ST indica que diferentes genes localizados no cromossomo X são responsáveis pelas características fenotípicas desses indivíduos. Diferentes mecanismos moleculares têm sido propostos para explicar o fenótipo observado na ST, em que algumas condições clínicas seriam ocasionadas pela haploinsuficiência de genes que escapam à

inativação. Desta forma, os fenótipos alterados seriam o resultado da dosagem do gene específico. Outros problemas comuns à ST são provavelmente causados pelo *imprinting* genético no cromossomo X, e haploinsuficiência de outros genes ainda não elucidados (Urbach & Benvenisty, 2009; Davenport, 2010).

A falência ovariana na ST tem sido associada à haploinsuficiência de genes no cromossomo X que escapam à inativação, uma vez que os braços curto e longo contêm genes importantes para função ovariana e a aneuploidia pode levar à redução de oócitos. As regiões do X vitais para um desenvolvimento ovariano normal têm sido descritas como “regiões críticas” compreendendo a parte Xp11, Xq13-25 e Xq26-28 (Elsheikh *et al.*, 2002; Sybert & Mccauley, 2004; Zhong & Layman, 2012). A haploinsuficiência do *SHOX* explica a baixa estatura na ST, associada também a diferentes alterações esqueléticas, tais como, cúbito valgo, genu valgo e encurtamento dos metacarpos, dentre outras características (Quadro 3) (Hjerrild *et al.*, 2008).

Quadro 3 A haploinsuficiência do gene *SHOX*.

<p>Explica:</p> <ul style="list-style-type: none">• Baixa estatura• Encurtamento dos metacarpos• Cúbito valgo• Deformidade de Mandelung• Palato arqueado• Micrognatia <p>Não explica:</p> <ul style="list-style-type: none">• Malformações cardiovasculares congênitas• Distúrbios endócrinos• Deficiência de estrógeno e infertilidade• Aumento da mortalidade?• <i>SHOX</i> é expresso no pâncreas. Isto explica a disfunção das células beta?• Aumento da mortalidade?• Outros estigmas da ST?
--

Fonte: Modificado de Hjerrild *et al.* (2008).

2.3 Microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como *short tandem repeats* (STRs) ou *simple sequence repeats* (SSRs), são sequências de DNA repetidas em tandem formadas por motivos de repetição de 1-6 pb, podendo ser encontrados nos genomas de eucariotos e procaríotos (Kelkar *et al.*, 2008; Leclercq *et al.*, 2010). Essas repetições são encontradas em regiões codificantes e não codificantes, desempenhando um papel importante na organização da cromatina, regulação do DNA e atividade gênica (Fig. 9) (Li *et al.*, 2002), atuando como reguladores da expressão gênica quando presentes em regiões de UTRs, regiões promotoras e em íntrons (Eckert & Hile, 2009; Schaper *et al.*, 2012).

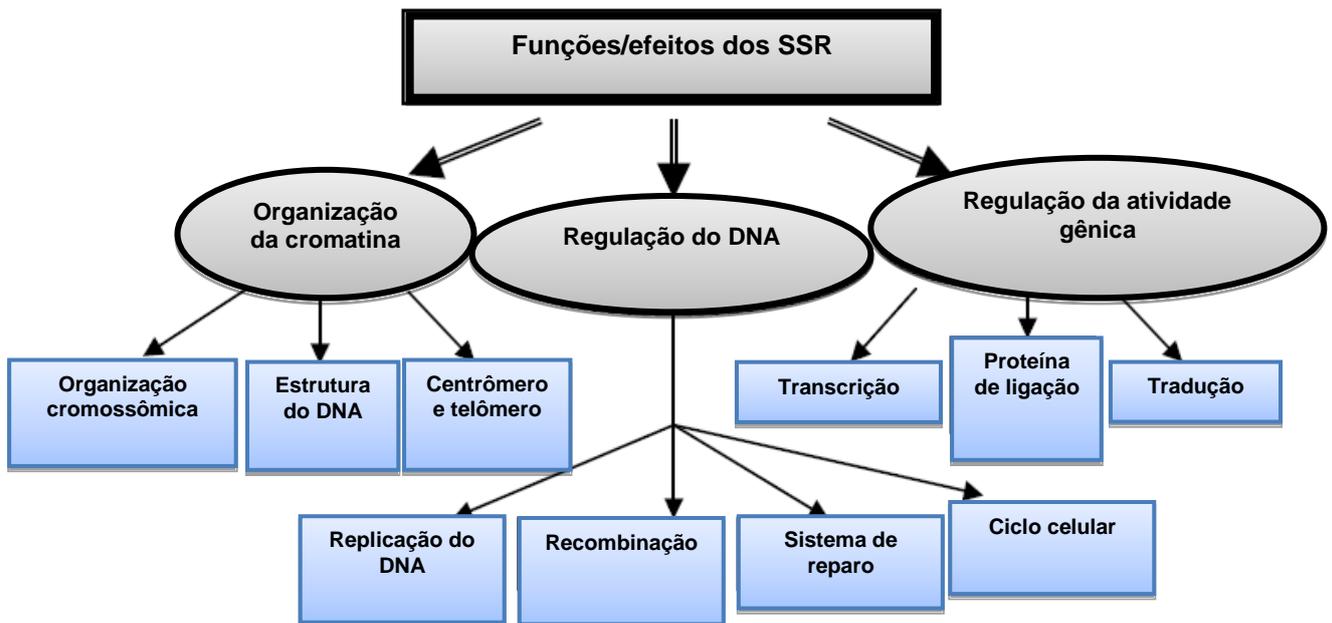


Figura 9. Funções/efeitos dos microssatélites. Fonte: Modificado de Li *et al.* (2002).

Aproximadamente 3% do genoma humano contem sequências de microssatélites, nas quais as repetições de mono-, di-, tri e tetranucleotídeos são as principais, embora as repetições de cinco (penta) e seis (hexa) nucleotídeos também possam ser encontradas. As repetições mononucleotídicas (A/T) são mais frequentes, seguidas por repetições de di- e tetranucleotídeos, sendo os trinucleotídeos menos abundantes que os demais. Entre os dinucleotídeos, os motivos (CA)_n e (AT)_n são os mais prevalentes, seguidos de (GA)_n e (GC)_n (Eckert & Hile, 2009).

De acordo com o tipo de repetição, os microssatélites são classificados em: perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos. Uma sequência de microssatélite perfeita não é interrompida por qualquer base, ou seja, há apenas o motivo de repetição (ex. TATATATATATATATA). Um microssatélite imperfeito é interrompido por um par de bases que não pertence ao motivo de repetição (ex. TATATATACCGTTATA), enquanto que, um microssatélite interrompido apresenta uma pequena sequência dentro do motivo de repetição, que não faz parte deste (ex. TATATACCGTGTTATATATATA). Um microssatélite composto possui duas sequências de repetição diferentes adjacentes (ex. TATATATATAGTGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

Uma importante característica dos microssatélites é que eles são altamente polimórficos, devido à alta taxa de mutação a que são submetidos. As taxas de mutação nos microssatélites são elevadas (10^{-4} – 10^{-2} mutações por locus a cada geração em humanos) e variam muito entre os *loci*. As causas dessas mutações ainda são pouco compreendidas, porém de grande interesse uma vez que, a instabilidade de microssatélites é implicada no desenvolvimento de câncer e

expansões são responsáveis por diferentes desordens neurológicas (Oliveira *et al.*, 2006; Kelkar *et al.*, 2008; Leclercq *et al.*, 2010).

Diferentes mecanismos têm sido propostos na tentativa de explicar essa alta taxa de mutação nos microssatélites, o que inclui *slippage* durante replicação ou reparo do DNA e *crossing-over* desigual. O *slippage* é o principal mecanismo mutacional dos microssatélites, ocorrendo predominantemente durante a replicação (Oliveira *et al.*, 2006; Kelkar *et al.*, 2008; Eckert & Hile, 2009).

No modelo *slippage*, as duas fitas de DNA podem se realinhar de maneira errônea após uma dissociação, devido à homologia entre as repetições de microssatélites. A consequência desse pareamento desigual é a formação de um *loop* em uma das fitas de DNA, ocasionando uma inserção ou deleção da repetição, a depender de qual fita (recém-sintetizada ou molde) ocorre o deslizamento (Fig. 10) (Kelkar *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2008).

A perda ou ganho de um grande número de repetições pode acontecer quando ocorre *crossing-over* desigual. Uma vez que regiões de microssatélites estão presentes, um grampo (a região da Fig. 11 apontada por seta vermelha) pode ser formado durante o emparelhamento de um par de cromossomos homólogos, o que significa que apenas partes, comumente com diferentes tamanhos, de cada cromossomo serão trocadas. Desta forma, um dos homólogos receberá um grande fragmento, enquanto o outro elemento cromossômico do par irá receber um número de repetições menor (Fig. 11) (Oliveira *et al.*, 2006).

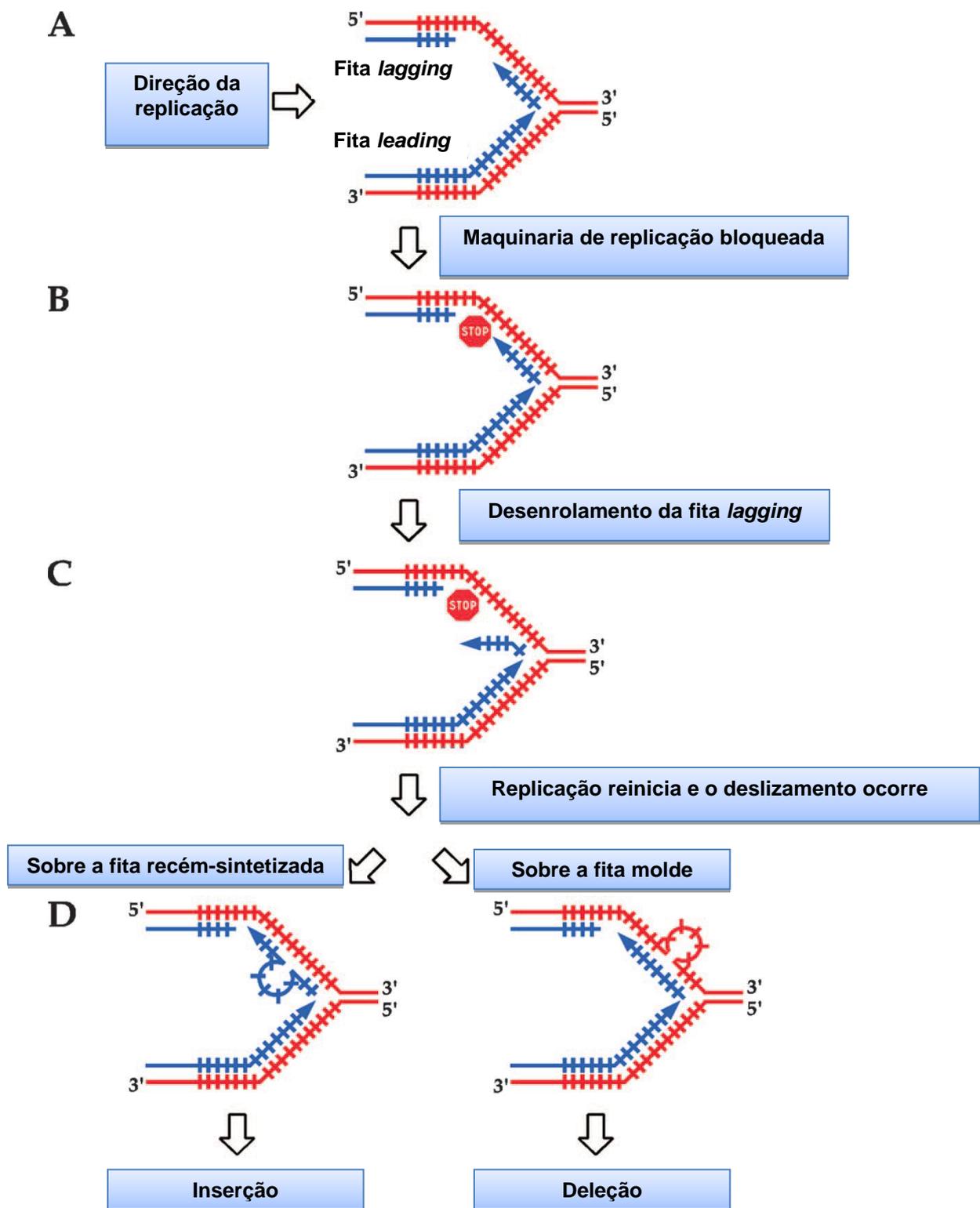


Figura 10. O modelo *slippage* durante replicação. As fitas molde estão desenhadas em vermelho, enquanto que as fitas recém-sintetizadas estão traçadas em azul. Durante a replicação da sequência que possui a repetição (A), a maquinaria de replicação pode parar na fita *lagging*, devido a estruturas secundárias ou outros tipos de lesões (B). (C) Parcial desenrolamento da fita *lagging* pode levar a deslizamento na replicação quando esta reinicia, dando origem a uma inserção ou deleção da repetição (D), a depender sobre qual fita (recém sintetizada ou molde) o deslizamento ocorre. Fonte: Modificado de Richard *et al.* (2008).

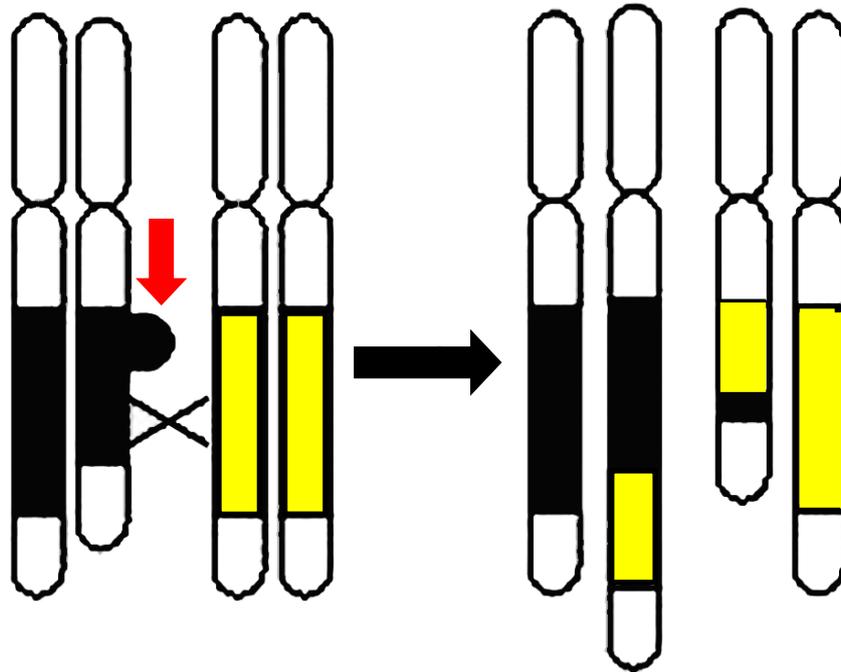


Figura 11. Crossing-over desigual entre cromossomos homólogos. As regiões em preto e amarelo correspondem a sequências de microssatélites. Fonte: Modificado de Oliveira *et al.* (2006).

A maior parte das variações observadas nos microssatélites é decorrente, em parte, de características intrínsecas a essas repetições, incluindo o motivo de repetição, o comprimento (em pares de bases) bem como, o número de unidades repetidas. Além disso, a estabilidade dos microssatélites é conferida pela sua estrutura, ou seja, se as repetições são perfeitas, imperfeitas, interrompidas ou compostas (Eckert & Hile, 2009).

Os microssatélites são multialélicos, pois possuem natureza polimórfica, apresentam modo de herança codominante (Sharma *et al.*, 2007) e possuem regiões de DNA flanqueadoras geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, o que permite a construção de *primers* específicos para ampliações desses locos (Oliveira *et al.*, 2008). Desta forma, o estudo de SSRs é realizado

via PCR, método rápido e sensível, que permite o *screening* de um grande número de amostras, necessitando de pequena quantidade de DNA (Gornik *et al.*, 2011).

Por essas vantagens, os microssatélites têm sido utilizados em diferentes estudos. Dessa forma, incluindo, dentre outras aplicabilidades, a construção de mapas genéticos, estrutura genética de populações, testes de paternidade, medicina forense e associação com doenças genéticas humanas (Girgis & Sheetlin, 2012).

.O estudo de microssatélites tem se mostrado bastante eficiente na detecção de alterações do gene *SHOX*, com alta sensibilidade, sendo a análise da região repetições CA realizada por diversos estudos (Martins *et al.*, 2003, Funari *et al.*, 2010). Este marcador de microssatélite intragênico está localizado na região 5' UTR do gene *SHOX*, apresentando 11 alelos que variam entre 136 e 156 pb e revela um grau de heterozigosidade em torno de 93%, estimado a partir de um estudo com grupo controle de 30 indivíduos para estabelecer sua utilidade na detecção de haploinsuficiência do gene *SHOX* (Belin *et al.*, 1998; Ezquieta *et al.*, 2002).

Benito-Sanz *et al.* (2005) identificaram dois novos marcadores de microssatélites altamente polimórficos no gene *SHOX*, o DXYS10092, localizado a 5' do gene e o DXYS10093, um marcador intragênico. O DXYS10092 constitui unidades de repetição GA e apresenta um grau de heterozigosidade de cerca de 96%, revelando 18 alelos. O marcador DXYS10093 compreende unidades de repetição CT, com 14 alelos e apresenta um grau de heterozigosidade de cerca de 69%. O número de alelos foi estimado a partir de um estudo de 50 indivíduos saudáveis.

3. Objetivos

3.1 Geral

Definir o cariótipo das pacientes com suspeita clínica da síndrome de Turner e investigar a haploinsuficiência do gene *SHOX* em pacientes citogeneticamente normais (46,XX) com baixa estatura associada ou não a malformações esqueléticas

3.2 Específicos

1. Definir o cariótipo das pacientes com achados clínicos compatíveis com a ST;
2. Investigar deleções do gene *SHOX* através do estudo de marcadores de microssatélites em pacientes com cariótipo normal (46,XX) que apresentem sinais clínicos de baixa estatura associada ou não a malformações esqueléticas.

4. Material e Métodos

4.1 Desenho do Estudo

O estudo se constituiu de um braço retrospectivo e outro prospectivo. No braço retrospectivo, no período de maio de 2006 a dezembro de 2010, foram investigadas deleções intragênicas do gene *SHOX* nas pacientes 46,XX e sua relação com a baixa estatura e malformações esqueléticas. No braço prospectivo foram analisadas citogeneticamente as pacientes com suspeita clínica da ST no período de janeiro de 2011 a outubro de 2012 e em seguida foram analisadas as deleções do gene *SHOX* nas pacientes 46,XX.

4.2 Pacientes

Nesse estudo foram analisadas citogeneticamente 168 pacientes com suspeita clínica da ST provenientes do Serviço de Genética Médica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e do Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE, entre maio de 2006 a outubro de 2012.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão das pacientes para estudo molecular

As pacientes que revelaram cariótipo normal (46,XX) após o estudo cromossômico e exibiram sinais clínicos de baixa estatura por apresentarem altura inferior ao percentil 3, da curva de crescimento específica para o sexo feminino, associada ou não a malformações esqueléticas foram incluídas no estudo molecular. Pacientes com baixa estatura que apresentaram hipotireoidismo, desnutrição, patologias cardiovasculares, patologias renais, doença celíaca, deficiência de hormônio do crescimento (GH) foram excluídas da análise

molecular. Os achados clínicos foram obtidos dos prontuários de cada paciente atendida nos Serviços supracitados.

4.4 Coletas das amostras

As amostras de sangue circulante periférico foram colhidas por punção venosa com seringas estéreis e heparinizadas, sendo retirados 5 mL de sangue de cada paciente. Em seguida, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Genética e Citogenética Animal/Departamento de Genética/CCB/UFPE, onde foram devidamente processadas.

4.5 Análise citogenética

4.5.1 Cultura de linfócitos

Para a cultura de linfócitos foram adicionados 0,5mL de sangue periférico nos tubos de cultura contendo 4mL de meio RPMI 1690 suplementado com 1mL de soro bovino fetal (CULTILAB) e 0,2mL de fitohematoglutina (SIGMA). Em seguida, os tubos foram mantidos em estufa a 37 °C, durante 72 horas. Após 70 horas foi adicionado 0,1mL de colchicina 0,0016% (SIGMA). Ao completar 72 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 6 minutos a 1800rpm, o sobrenadante desprezado e adicionado 8mL de KCL previamente aquecido a 37 °C, para a realização do choque hipotônico. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida foram novamente centrifugados, sempre pelo mesmo tempo e velocidade anteriormente descritos e o material devidamente fixado com metanol/ácido acético na proporção 3:1. A partir deste

procedimento, as preparações citológicas para análises cromossômicas foram realizadas.

4.5.2 Bandeamento G

O bandeamento G foi realizado segundo Seabright (1972). As lâminas foram envelhecidas por cinco dias e mergulhadas numa solução de tripsina a 37 °C (0,10 g de tripsina para 100 mL de tampão Dulbecco) por um período entre 4 a 10 segundos. Posteriormente, lavadas com solução salina e coradas com Giemsa a 5% por 7 minutos. Após este procedimento, as lâminas foram analisadas em um microscópio óptico através de uma objetiva com aumento de 100x, sendo analisadas, em média, 20 metáfases por paciente. Os cromossomos foram identificados de acordo com o ISCN (2005).

4.6 Análise Molecular

4.6.1 Extração de DNA

O DNA genômico de sangue periférico das pacientes com cariótipo 46,XX foi extraído utilizando Kit para purificação de DNA Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin (GE Healthcare).

4.6.2 Análise de fragmentos

O DNA genômico foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR), e para este procedimento foram utilizados pares de *primers* específicos para os marcadores de microssatélites (Tabela 1), com o *primer* “sense” marcado com fluoróforo específico (NED, PET e VIC) e *primer* “antisense”

não marcado. A PCR foi realizada em uma reação com volume final de 15 µL, contendo 20 ng de DNA genômico, 10 µM de cada *primer* e 1X Go Taq Colorless Master Mix (Promega).

Tabela 1. *Primers* usados na amplificação dos marcadores de microssatélites.

Marcadores	PRIMERS	Repetições	T(°C)	Fluoróforo
Repetições CA	NED-5' CAT GTC ATA TAT ATA TGT GAT CC 3' 5' GAC ACA GAA ATC CTT CAT AAA 3'	Dinucleotídeo (CA)	55	NED
DXYS10092	PET-5' TTCGTGACAAAGGCCTTTGC 3' 5' CTACAAGTCCTAGTACCTAC 3'	Dinucleotídeo (GA)	53	PET
DXYS10093	VIC-5' GCCCGTGATCCCAGTACTG 3' 5' CAACTTCCTTGAAATCTTC 3'	Dinucleotídeo (CT)	57	VIC

(T) = temperatura de anelamento; (pb) = pares de bases.

O programa de amplificação em termociclador (Biocycler) consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53°-57 °C por 1 minuto e 30 segundos para anelamento dos *primers*, 72°C por 1 minuto e 72 °C por 10-50 minutos para extensão final (Benito-Sanz *et al.*, 2005 com modificações). Além disso, em cada amplificação foi utilizado um controle negativo, sem DNA (branco), permitindo identificar eventuais contaminações.

O produto pós-PCR (5 µL) foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 3% corado com 1 µL de *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia), utilizando-se TBE 1x (0,045M de Tris-borato e 0,001M de EDTA) como tampão de corrida, com o intuito de verificar a presença de DNA amplificado. A aplicação de um marcador de peso molecular conhecido (100 pb *DNA ladder*, Invitrogen) permitiu inferir se os produtos de amplificações se

encontravam dentro da faixa indicada na literatura, a partir da qual a sequência dos *primers* foram retiradas (Ezquieta *et al.*, 2002; Benito-Sanz *et al.*, 2005). Após a eletroforese, com duração de 12 minutos a 120 Volts, foi realizada a leitura através de luz ultravioleta.

Os produtos amplificados da PCR de cada marcador de microssatélite por paciente foram diluídos em água *Milli-Q* (diluição de 1/20), a partir do qual foi produzido um “mix” de 15 µL por paciente (5µL de cada STR amplificado). Deste “mix” foi retirado 1 µL e adicionado à 8,5 µL de Hi-Di formamida (Applied Biosystem) e 0,5 µL de Internal Liz Standard GS600 (Applied Biosystem), em uma placa de reação com 96 poços (Micro Amp - Applied Biosystem). Em seguida, o material foi desnaturado em termociclador (Labnet MultiGene) a uma temperatura de 95 °C durante 5 minutos e posteriormente conservado em gelo pelo tempo anteriormente descrito. Após estas etapas, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático Genetic Analyser 3500 (8 capilares - Applied Biosystems) por um tempo de 40 minutos a partir do qual foram obtidos os eletroferogramas de cada amostra. Os tamanhos dos fragmentos de STR das pacientes foram determinados através do software GENEMAPPER v4.1 (Applied Biosystem), utilizando-se uma escada alélica como referência, que contem fragmentos de tamanhos estabelecidos (Internal Liz Standard GS600 - Applied Biosystem). O “*Bin set*” foi delimitado de acordo com os tamanhos de fragmentos esperados. Para as eletroforeses em sequenciador utilizaram-se capilares com 50 cm de comprimento e polímero POP-7, sendo o equipamento calibrado com G5 e validado com DS33 (Applied Biosystem), que são específicos para os fluoróforos utilizados neste estudo.

4.7 Critérios éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) (Projeto de pesquisa nº 802 – Anexo A e B) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de cada paciente ou familiar responsável (Anexo C e D).

5. Resultados

5.1 Estudo citogenético

Neste trabalho foram analisadas citogeneticamente 168 pacientes com suspeita clínica de síndrome de Turner (Tabela 2). Alterações cromossômicas compatíveis com a ST foram detectadas em 68 pacientes (40,48%) (cariótipos - Anexo E), enquanto que 20 pacientes (11,90%) apresentaram outras constituições cariotípicas, em linfócitos de sangue periférico (cariótipos - Anexo F). Embora todas as pacientes encaminhadas para cariotipagem apresentassem ao exame físico sinais clínicos sugestivos de ST, 80 pacientes (47,62%), revelaram um cariótipo normal (46,XX), em linfócitos de sangue periférico (Tabela 2) (Fig. 12).

Os prontuários foram revisados e atualizados, sendo os dados clínicos obtidos a partir da história, evolução clínica e anamnese de cada paciente. Um total de 37 pacientes 46,XX não foram incluídas no estudo molecular por apresentarem: hipotireoidismo, desnutrição, patologias cardiovasculares, patologias renais, doença celíaca, deficiência de hormônio do crescimento (GH), hipoplasia hipofisária, neurohipófise ectópica. Além disso, não foi possível o acesso aos prontuários de 15 pacientes, as quais não foram selecionadas para investigação da haploinsuficiência do gene *SHOX*. Desta forma, um total de 28 pacientes normais (46,XX) foram inseridas na análise molecular e os dados clínicos estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 2. Distribuição dos cariótipos das pacientes com ST e das pacientes com outras constituições cariotípicas.

Cariótipo	Número de pacientes	%
- Pacientes com ST		
45,X	40	23,81
45,X,inv(9) (p11q13)	1	0,595
45,X,t(11;12)(q22;q22)	1	0,595
45,X/46,X,i(Xq)	12	7,143
46,X,i(Xq)	4	2,381
45,X/46,XY	3	1,786
45,X/46,X,r(X)	2	1,191
45,X /46,X,inv dup(Xq)	1	0,595
45,X/47,XXX	1	0,595
45,X/46,XX	1	0,595
45,X/46,X,+mar	1	0,595
45,X/46,X,del(Xp)	1	0,595
- Outras alterações cariotípicas		
46,XX,inv(9)(p11q13)	6	3,60
46,XX,9qh ⁺	3	1,786
46,XX/47,XX,+mar	2	1,191
46,XX,9qh+,add(22p)	1	0,595
46,XX,add(9q),del(11q)	1	0,595
46,XX/46,XX,del(1q)	1	0,595
46,XX/46,XX,del(5p)	1	0,595
46,XX,add(14q)	1	0,595
46,XX,t(1p;7p)	1	0,595
46,XX,16qh+	1	0,595
46,X,dup(Xq)	1	0,595
46,XY	1	0,595
- Pacientes citogeneticamente normais		
46,XX	80	47,62
TOTAL	168	100,00

Tabela 3. Altura, idade e dados clínicos das pacientes citogeneticamente normais (46,XX) inseridas no estudo molecular.

Paciente	Idade	Altura	Dados clínicos
01	29/01/99	143 cm	Baixa estatura proporcionada, desenvolveu caracteres sexuais, idade óssea menor que idade cronológica, sobrepeso, hipertrofia adenoideana, anemia ferropriva, rinite e asma intermitente, discreta implantação baixa posterior dos cabelos, útero normal, ovários com volume discretamente reduzidos, bexiga normal, rim direito normal, rim esquerdo aumentado de volume, afastado hipotireoidismo e outras causas endócrinas de baixa estatura, macrocrania, fâcias grosseiras, raiz nasal baixa, hipertelorismo mamário, unhas hipoplásicas, leve retardo neuropsicomotor, hipotaxia neonatal importante, RNM do encéfalo normal.
02	02/09/99	112 cm	Baixa estatura, hipertelorismo mamário, implantação baixa posterior dos cabelos, ovários de formas e volumes normais, rins com forma e volumes normais, bexiga normal.
03	26/07/91	148,5 cm	Baixa estatura ($\downarrow p2,5-10$), ausência de pêlos pubianos, assimetria de mamas (a mama D é maior que a E), hipertelorismo mamário, presença de cúbito valgo bilateral, hipoplenia de 4º e 5º metacarpianos, edema no dorso dos pés até 1 ano de idade, orelhas de implantação um pouco baixa, apresenta dificuldade de aprendizagem e retardo mental moderado.
04	-	116 cm	Baixa estatura, pescoço curto e largo, membros curtos e pés chatos, inteligência normal, não desenvolveu puberdade, USG ovários, útero e rins normais.
05	13/07/03	95 cm	Baixa estatura, certas desproporções crânio-torax, bexiga de forma e capacidade normal, rins normais, infecções retroauriculares recorrentes, útero de tamanho reduzido, ovários não visualizados bilateralmente, podendo corresponder a ovários em fita, sem alterações cardiológicas.
06	02/07/02	101 cm	Baixa estatura, clinodactilia de 5º quinodáctilos, útero com volume diminuído para a idade cronológica, ovários não visualizados.
07	23/07/98	138,5 cm	Baixa estatura, baixa velocidade de crescimento, atraso da idade óssea, ausência de mamas ou pêlos pubianos, presença de edema palpebral.
08	16/06/00	126 cm	Baixa estatura, encurtamento do 4º metacarpo, útero normal e ovários não visualizados.
09	22/03/01	135,5 cm	Baixa estatura, hipertelorismo mamário.
10	25/07/94	152,5 cm	Baixa estatura com velocidade de crescimento reduzida, atraso puberal, cúbito valgo, osteoporose. Hipófise aparentemente tópica e com dimensões normais. Ultrassonografia pélvica (11/08/2011) revelou útero e ovários normais. Pele, ouvido, aparelho respiratório e cardiovascular sem alterações significativas. Ressonância magnética do encéfalo (06/12/2011) sem alterações e bulbo olfatório sem alterações.

11	03/01/00	118,3 cm	Baixa estatura, com baixa velocidade de crescimento sem estigmas visíveis.
12	11/12/95	-	Baixa estatura, baixo peso, baixa implantação da orelha, pescoço curto e alado, encurtamento dos quirodáctilos, hipertiroidismo, geno valgo, retardo do desenvolvimento neuropsicoe não desenvolvimento dos caracteres sexuais.
13	10/09/97	145 cm	Baixa estatura, baixo peso, encurtamento dos metacarpos e olhos amendoados. Rins normais, tireoide sem alterações.
14	12/05/94	148,2 cm	Baixa estatura, baixo peso, atraso do desenvolvimento puberal, IO atrasada e teste da cloridina com pico máximo de G4: 6,02ng/ml (30min). Discreto cúbito valgo, tunner M3P4.
15	06/12/1997	129,5 cm	Baixa estatura, baixo peso, hiperteroidismo.
16	26/10/95	137,6 cm	Baixa estatura, nevos disseminados, amenorreia secundária. USG pélvica (07/05/09): bexiga normal, ovários de contornos regulares, ovário esquerdo apresenta lesão hipoecóica, que sugere estrutura cística. Insuficiência tricúspide discreta. USG abdominal: glândulas adrenais normais. Esteatose hepática leve e rins normais.
17	27/03/98	139,7 cm	Baixa estatura e baixo peso, com atraso discreto da idade óssea.
18	08/10/99	119 cm	Baixa estatura e baixo peso, constirpação crônica e idade óssea atrasada, fáceis sindrômicas e implantação baixa dos cabelos, cúbito valgo.
19	26/11/02	112,8 cm	Baixa estatura e baixo peso.
20	06/08/98	-	Baixa estatura, baixo peso.
21	11/08/05	106 cm	Baixa estatura com boa velocidade de crescimento, idade óssea e cronológica compatíveis, baixo peso, pescoço alado, encurtamento do 4º metacarpo. USG das vias urinárias (07/01/09): sem alterações patológicas. USG renal (25/03/10): rins normais. Rinite alérgica intermitente controlada.
22	15/08/03	113,7 cm	Baixa estatura, implantação baixa dos cabelos, olhos amendoados, idade óssea compatível com idade cronológica, tireoide normal, má implantação dentária, sobrepeso.
23	18/01/98	133,3 cm	Baixa estatura, tireoide normal.
24	14/05/98	134,5 cm	Baixa estatura, baixo peso, tireoide normal, tórax escavatum, implantação baixa do cabelo.
25	21/06/04	116,7 cm	Baixa estatura, tireoide normal, presença de fâscies triangular, encurtamento de 4º e 5º dedos da mão direita, e 5º dedo da mão esquerda (falanges), hipertelorismo mamário, discreta implantação baixa das orelhas, rins normal.
26	24/05/01	128 cm	Baixa estatura observada desde os 2 anos, tireoide normal, encurtamento do 3º metacarpo a direita.
27	06/05/01	124,3 cm	Baixa estatura com velocidade de crescimento atrasada e idade óssea avançada, baixo peso.
28	10/03/04	125,1 cm	Baixa estatura e obesidade.

Nota: A altura é referente à última avaliação clínica.

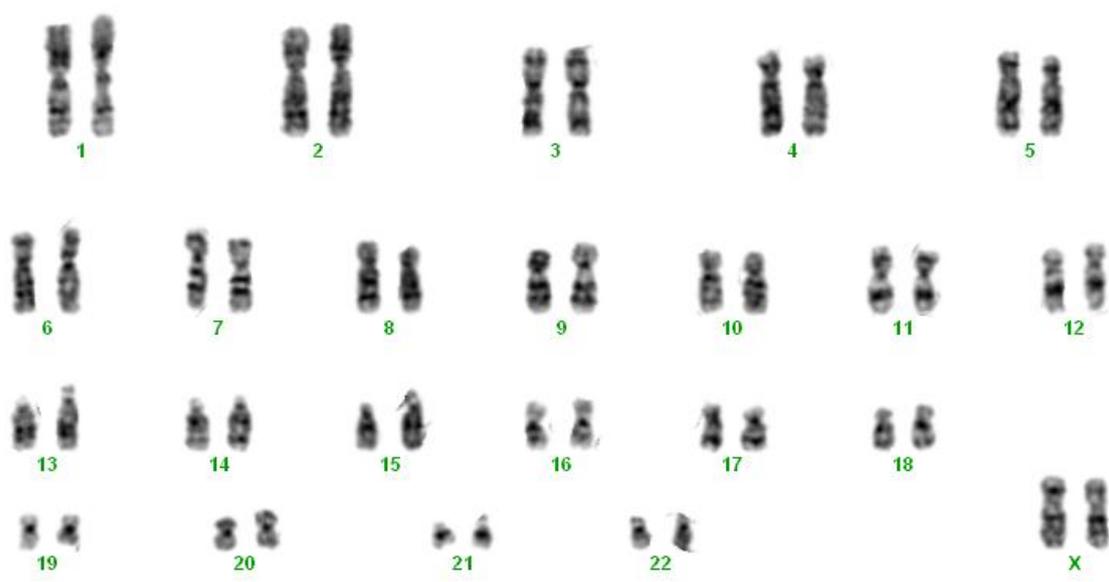


Figura 12. Cariótipo com bandeamento G: 46,XX.

5.2 Estudo molecular

Os resultados das análises dos marcadores de microssatélites das regiões de Repetições CA, DXYS10092 e DXYS10093 obtidos em pacientes com baixa estatura associada ou não a malformações esqueléticas estão sumarizados na tabela 4. Os tamanhos dos fragmentos de SRT detectados estavam dentro das faixas descritas na literatura.

A análise dos fragmentos permitiu confirmar a ausência de deleção das regiões de microssatélite investigadas em 13 pacientes (46,43%): pacientes 02, 03, 06, 08, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 21, 22 e 23. A presença de dois alelos para cada marcador molecular utilizado indica que estas pacientes são heterozigotas e dessa forma, não possuem haploinsuficiência do *SHOX* (Anexo G). Duas pacientes (04 e 17) apresentaram dois alelos para cada STR, entretanto, os alelos de repetições CA se revelaram desbalanceados, com desproporção acentuada entre a altura dos picos (Anexo H).

A genotipagem da paciente 09 indicou a presença de um único alelo para o marcador de repetições CA e DXYS10093, enquanto que a paciente 24 revelou apenas um alelo para o marcador DXYS10092 e para o DXYS10093. Embora com perda de heterozigosidade em duas regiões analisadas, a ausência de estudos moleculares parentais impossibilitou a confirmação de hemizigose. A análise dos genitores não foi possível uma vez que os mesmos não concordaram em participar do estudo.

Tabela 4. Resultados da análise dos marcadores de microssatélites de Repetições CA, DXYS10092 e DXYS10093. Os números indicam o tamanho dos picos (pb) referentes aos fragmentos dos marcadores de STR (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).

PACIENTE	REPETIÇÕES CA	DXYS10092	DXYS10093
01	138/148	314/360	256/-
02	140/152	350/356	252/254
03	140/142	342/346	250/266
04	138/152 (desbalanceados)	334/344	244/252
05	152/-	336/338	234/238
06	142/154	334/336	242/250
07	142/150	334/346	236/-
08	144/148	328/356	236/250
09	148/-	334/356	244/-
10	134/154	314/342	248/266
11	134/150	314/352	246/254
12	142/148	336/358	234/236
13	142/148	338/346	234/236
14	142/-	358/-	242/256
15	140/146	314/358	234/244
16	142/148	338/346	234/256
17	134/144 (desbalanceados)	334/356	248/250
18	146/-	338/340	250/262
19	142/148	344/358	ND
20	134/-	334/354	246/250
21	134/148	314/348	252/254
22	142/148	338/352	234/250
23	142/152	346/350	234/246
24	142/146	334/-	252/-
25	146/152	334/346	ND
26	134/148	334/-	240/254
27	134/142	346/354	ND
28	134/142	334/346	256/-

ND: não determinado

A paciente 14 também foi heterozigota para apenas um marcador de microssatélite, apresentando um único alelo para os marcadores de repetições CA e DXYS10092. A análise parental revelou que o único alelo presente na paciente, para os dois marcadores de STR, também estavam presentes nos pais, o que tornou a análise parental não informativa (Tabela 5).

Tabela 5. Análise do tamanho dos alelos dos microssatélites da paciente 14 (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1)

	REPETIÇÕES CA	DXYS10092	DXYS10093
Mãe	142/-	350/358	234/256
Pai	142/-	356/358	242/250
Paciente 14	142/-	358/-	242/256

A genotipagem dos pais da paciente 26 não foi informativa para o marcador DSYS10092, uma vez que, o único alelo presente na paciente (334), foi detectado em ambos os genitores. Neste caso, não se pode afirmar que o indivíduo é hemizigoto ou homozigoto para este STR (Tabela 6).

Tabela 6. Análise do tamanho dos alelos dos microssatélites da paciente 26 (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1)

	REPETIÇÕES CA	DXYS10092	DXYS10093
Mãe	148/150	334/-	244/254
Pai	134/138	314/334	228/240
Paciente 26	134/148	334/-	240/254

A análise dos fragmentos de três pacientes (05, 18 e 20) indicou heterozigose para os marcadores DXYS10092 e DXYS10093, porém, para o marcador de repetições CA foi detectado apenas um fragmento, o que sugere uma hemizigose (Anexo I). A genotipagem de outras três pacientes (01, 07 e 28) revelou a presença de dois alelos para os marcadores de repetições CA e DXYS10092, porém, para o marcador de DXYS10093, foi detectado apenas um fragmento (Anexo I). Como os genitores destas seis pacientes não foram avaliados, não se pode afirmar que estes indivíduos apresentam uma perda alélica para estes marcadores.

As pacientes 19, 25 e 27 revelaram resultados insatisfatórios para o marcador DXYS10093, uma vez que não foi possível a amplificação com boa reprodutibilidade. Algumas amostras apresentaram picos diferenciados do normal para se estabelecer um resultado exato, assim, os dados para o STR DXYS10093 não foram apresentados para estas pacientes (Tabela 4).

6. Discussão

A baixa estatura é uma das maiores causas de encaminhamento de pacientes a uma unidade pediátrica, sendo uma indicação comum para avaliação genética. Essa condição clínica pode ser um indicativo da presença de uma síndrome específica e tem sido encontrada em pacientes com displasias ósseas, como Discondrosteose de Leri-Well e a Displasia Mesomélica de Langer, em pacientes com Baixa Estatura Idiopática (BEI) e na síndrome de Turner (Bispo *et al.*, 2012; Hirschfeldova *et al.*, 2012; Kaur & Phadke, 2012).

No presente estudo todas as pacientes encaminhadas para cariotipagem apresentavam suspeita clínica de ST. Frente a um quadro clínico sugestivo de ST está indicada a realização do cariótipo em linfócitos de sangue periférico, que permite detectar alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais. Além disso, a cariotipagem deve ser considerada e realizada em meninas com baixa estatura como único sinal clínico, mesmo que não haja outros estigmas que indiquem a presença de ST. A suspeita clínica da ST foi confirmada em 40,48% da amostra total estudada, sendo o cariótipo 45,X o mais prevalente (58,82% ou 40/68 pacientes com ST) corroborando com estudos anteriores (Araújo *et al.*, 2010; Djordjević *et al.*, 2010) ratificando assim, a importância do estudo citogenético em sangue periférico, juntamente com o estudo clínico, para o diagnóstico da ST .

No presente estudo, a baixa estatura foi o principal estigma encontrado entre as portadoras da ST. As alterações cromossômicas numéricas e estruturais, principalmente as que envolvem os cromossomos sexuais estão relacionadas ao déficit estatural e malformações visíveis nessas pacientes. Na ST, a baixa estatura tem sido associada com a haploinsuficiência da região crítica do

cromossomo X (Xp22.2), que escapa à inativação (região pseudoautosômica do X e do Y), onde se localiza o gene *SHOX* (Martins *et al.*, 2003, Ezquieta *et al.*, 2002).

A baixa estatura também foi o principal sinal clínico entre as pacientes com constituição cariotípica 46,XX. Estudos moleculares para o gene *SHOX* tem sido frequentemente indicados durante a investigação da baixa estatura. Esta condição clínica estava presente em 37 pacientes, entretanto, as mesmas possuíam hipotireoidismo, desnutrição, patologias cardiovasculares, patologias renais, doença celíaca, deficiência de hormônio do crescimento (GH). Desta forma, estes indivíduos não foram incluídos na análise molecular uma vez que, estas alterações são consideradas causas endócrinas e não endócrinas que possivelmente estariam associadas ao desenvolvimento da baixa estatura.

Outras 28 pacientes foram inseridas na análise de microdeleções devido à presença de sinais clínicos que indicaram essa análise. O exame clínico revelou baixa estatura e malformações esqueléticas como: cúbito valgo bilateral, palato um pouco alto e estreito, encurtamento de 4^o e 5^o pododáctilo, desalinhamento dentário, tórax escavatum, encurtamento dos 4^{os} quirodáctilos, genu valgo. Estas pacientes que revelaram cariótipo normal (46,XX) foram avaliadas através da biologia molecular com o intuito de verificar alterações no gene *SHOX*, através do estudo de deleções de microssatélites, uma vez que a baixa estatura foi um estigma comum, sendo a principal causa de encaminhamento às unidades pediátricas.

O “*screening*” molecular de pacientes com déficit estatural deve iniciar com a investigação de deleções uma vez que, 2/3 das alterações encontradas nas pacientes com defeitos neste gene são deleções (Funari *et al.*, 2010). Embora

estes defeitos compreendam a maior parte das mutações encontradas no *SHOX* e a pesquisa dessas alterações sejam as primeiras a serem realizadas, os resultados da análise molecular do presente estudo, através de marcadores de microssatélites, não revelaram deleção nas regiões de STR em 13 pacientes. Em contraste com outros estudos previamente reportados (Rappold *et al.*, 2007; Funari *et al.*, 2010), não foi possível estabelecer uma relação entre a haploinsuficiência do *SHOX* e as alterações fenotípicas encontradas nas pacientes.

As taxas variáveis de defeitos no *SHOX* podem estar relacionadas a diferentes metodologias utilizadas e devido à população estudada. No estudo reportado por Martins *et al.* (2003), 10 pacientes com diagnóstico inicial de BEI foram analisadas citogeneticamente e tiveram seus prontuários revisados. Em uma paciente, o estudo molecular de três marcadores de microssatélites (DXYS233, Repetições CA e DXYS234) revelou a presença de um único alelo para os STR de Repetições CA e DXYS234, indicando após o estudo dos genitores, uma perda alélica paterna, confirmando a haploinsuficiência do *SHOX*.

A existência de deleções por meio de estudos de dois marcadores de microssatélites (DXYS201 e CAII) foi analisada em uma amostra de 1534 pacientes com baixa estatura idiopática por Rappold *et al.* (2007) sendo detectada deleção em 25 delas (1,6% da amostra). Quando apenas um único alelo foi detectado, a técnica de FISH foi aplicada para verificar uma possível deleção deste gene, uma vez que a análise parental não foi realizada.

Um painel de três marcadores de microssatélites intragênicos (Repetições CA, DY290 e DXYS10093) para o *SHOX* foram utilizados por Funari *et al.* (2010). Um total de 36 pacientes com baixa estatura desproporcionada foi analisado,

sendo deleções do *SHOX* detectadas em duas pacientes (5,6% da amostra). Entretanto, quando a população estudada foram oito pacientes com DLW, todos eles revelaram deleções para os mesmos marcadores de STR. No mesmo estudo, uma deleção a 3' do gene *SHOX* foi detectada pela técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) em um paciente com baixa estatura desproporcionada, a qual não foi detectada pela análise de microssatélites pois estes marcadores não apresentavam localização na região deletada.

No presente estudo, não foi realizada uma análise da região “downstream” do gene *SHOX*, a qual tem sido associada às alterações fenotípicas encontradas em pacientes com DLW e BEI. Em 2005, Benito-sanz *et al.* demonstraram que a região do gene é de extrema importância e deve ser analisada nestes casos. Em um estudo realizado por Rosilio *et al.* (2012), foi observado que defeitos nesta “área do *SHOX*” foram predominantes em pacientes com BEI, sugerindo que a análise dessa região deve ser realizada em indivíduos com suspeita de defeitos do *SHOX*.

As pacientes 04 e 17 apresentaram dois alelos para o marcador de repetições CA, entretanto os mesmos se mostraram desbalanceados. Esta desproporção entre a altura dos picos pode ser um indicativo da presença de mosaicismo críptico, no qual as pacientes seriam portadoras de uma linhagem celular contendo um único cromossomo sexual ou mesmo uma deleção envolvendo a região Xp22 em algumas células.

Embora as cariotipagens destas pacientes tenham revelado a presença de uma única linhagem (46,XX) em linfócitos de sangue periférico, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de mosaicismo, uma vez que há relatos

de indivíduos portadores de linhagens monossômicas em menor frequência, sendo necessária a investigação de outros tecidos por diferentes técnicas (Martins *et al.*, 2003). A investigação de mosaicismo críptico nestas pacientes com alelos desbalanceados possui um papel fundamental na abordagem terapêutica e acompanhamento clínico das mesmas.

Em um estudo realizado por Ezquieta *et al.* (2002), a presença desses alelos foi detectada em quatro pacientes com ST, as quais apresentaram mosaicismo, em que uma das linhagens era monossômica para o cromossomo X. As demais pacientes com ST revelaram apenas um alelo para o marcador de repetições CA. Neste mesmo estudo, 12% das pacientes com baixa estatura e alterações esqueléticas apresentaram alelos desbalanceados. Em contraste, as pacientes com BEI revelaram apenas alelos balanceados. A presença de alelos desbalanceados também foi detectada por Reish *et al.* (2010) ao estudar uma paciente com cariótipo mosaico, com 34% das células monossômicas (45,X).

O estudo molecular não se mostrou informativo em dois casos (pacientes 14 e 26). Apesar da análise de microssatélites detectar pequenas deleções, em alguns casos a análise parental é fundamental para diferenciar os indivíduos homozigotos, que revelam dois alelos idênticos, daqueles hemizigotos, que possuem uma perda alélica. Ainda assim, mesmo após o estudo parental, as pacientes 14 e 26 revelaram um alelo que estava presente em ambos os pais, não sendo possível afirmar a presença de deleção de um dos alelos ou se a paciente é homozigota para aquele marcador. Em seis pacientes houve perda alélica para um único marcador de STR. Nestes casos, uma técnica alternativa pode ser empregada para detecção de haploinsuficiência, devido à

impossibilidade de se determinar homozigose ou hemizigose por este conjunto de microssatélites.

A ausência de deleções do gene *SHOX* em 13 pacientes (46,43%) incluídas no estudo molecular descarta a possibilidade de indicação à uma terapia de reposição hormonal com o hormônio de crescimento (GH), levando em consideração os marcadores de microssatélites utilizados neste estudo. Entretanto, o monitoramento do déficit estatural deve continuar sendo realizado através de exames detalhados com intervalos regulares. Por outro lado, a investigação genética utilizando outros marcadores moleculares localizados à jusante do gene *SHOX* e/ou outras técnicas (MLPA e PCR em tempo real) para detectar possíveis alterações no gene *SHOX* devem ser consideradas.

7. Conclusões

1. A cariotipagem permitiu identificar alterações cromossômicas compatíveis com a ST em 40,48% da amostra estudada, devendo desta forma, as pacientes serem encaminhadas a um tratamento adequado, o que implicará na melhoria da qualidade de vida das mesmas;
2. A definição do cariótipo, nos indivíduos que revelaram alterações cromossômicas não relacionadas a ST, proporcionou um diagnóstico complementar, que aliado à uma avaliação clínica e outros exames laboratoriais, apontará para uma conduta terapêutica diferenciada;
3. A cariotipagem deve ser realizada em todos os casos em que há presença de baixa estatura seguida ou não de malformações esqueléticas, independente da presença de sinais dismórficos, uma vez que esta condição clínica foi o principal motivo de encaminhamento aos serviços pediátricos;
4. A investigação do gene *SHOX* permitiu descartar a haploinsuficiência do gene em 46,43% da amostra de pacientes citogeneticamente normais. Assim, a baixa estatura nestas pacientes não possui etiologia genética para os marcadores moleculares (Repetições CA, DXYS10092 e DXYS10093) utilizados no presente estudo;
5. Embora não tenha sido estabelecida uma relação entre as alterações fenotípicas e deleções dos microssatélites no presente estudo, deve-se considerar análises adicionais futuras como a investigação de mutações nas

regiões exônicas bem como o uso de marcadores de microssatélites na região “downstream” do gene *SHOX* devido a grande heterogeneidade de alterações encontradas nesse gene;

6. A avaliação clínica aliada ao cariótipo e a análise de marcadores moleculares de microssatélites em pacientes com baixa estatura associada ou não a malformações esqueléticas foram essenciais para o diagnóstico genético realizado neste trabalho.

8. Referências Bibliográficas

- Agrawal N, Gupta M and Wangnoo S K (2009) Turner's syndrome. *Apollo Medicine* 6(4):335-339.
- Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L, Mur A, Calvo D, Pascual I Bardají J and Milà M (2012) A170P mutation in SHOX gene in a patient not presenting with Madelung deformity. *J Clin Pathol* 65(9):844-6.
- Araújo C, Galera BB, Galera MF and Medeiros SF (2010) Características clínicas e citogenéticas da síndrome de Turner na região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 32(8): 381-5.
- Bakalov VK, Gutin L, Cheng CM, Zhou J, Sheth P, Shah K, Arepalli S, Vanderhoof V, Nelson LM and Bondy CA (2012) Autoimmune disorders in women with turner syndrome and women with karyotypically normal primary ovarian insufficiency. *J Autoimmun* 38(4):315-21.
- Baldin AD, Armani MC, Morcillo AM, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Maciel-Guerra AT and Guerra GJ (2005) Proporções corporais em um grupo de pacientes com Síndrome de Turner. *Arq Brás Endoc Metab* 49:529-535.
- Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A and Cormier-Daire V (1998) SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* 19(1): 67-9.
- Benito-Sanz S, Thomas ST, Huber C, Del Blanco DG, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Argente J, Campos-Barros A, Cormier-Daire V and Heath KE (2005) A Novel Class of Pseudoautosomal Region1 Deletions Downstream of Shos Is Associated with Léri-Weill Dyscondrosteosis. *Am J Hum Genet* 77:533-544.
- Bianco B, Nunes Lipay MV, Guedes AD and Verreschi IT (2008) Clinical implications of the mosaicism in Turner's syndrome: report of the 3 cases. *Fertility and sterility* 90:17-20.
- Bianco B, Lipay M, Guedes A, Oliveira K and Verreschi IT (2009) SRY Gene Increases the Risk of Developing Gonadoblastoma and/or Nontumoral Gonadal Lesions in Turner Syndrome. *Int J Gynecol Pathol* 28(2): 197-202.
- Binder G (2011) Short Stature due to SHOX Deficiency: Genotype, Phenotype, and Therapy. *Horm Res Paediatr* 75:81–89.
- Bispo AVS, Santos LO, Burégio-Frota P, Galdino MB, Duarte AR, Leal GF, Araújo J, Gomes B, Soares-Ventura EM, Muniz MTC and Santos N (2012) Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype. Manuscrito aceito para publicação no periódico *Genetics and Molecular Research*.
- Blaschke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, Padilla-nash H, Ried T and Rappold GA (1998) SHOX, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2406–2411.
- Blaschke RJ, Topfer C, Marchini A, Steinbeisser H, Janssen J WG and Rappold GA (2003) Transcriptional and Translational Regulation of the Léri-Weill and Turner Syndrome Homeobox Gene SHOX. *The Journal of Biological Chemistry* 278(48): 47820–47826.
- Burégio-Frota P, Valença L, Leal GF, Duarte AR, Bispo-Brito AV, Soares-Ventura EM, Marques-Salles TJ, Nogueira MT, Muniz MT, Silva ML, Hunstig F, Liehr T and Santos N (2010) Identification of a de novo inv dup(X)(pter--> q22)

- by multicolor banding in a girl with Turnersyndrome. *Genetics and Molecular Research* 9 (2): 780-784.
- Caliebe J, Broekman S, Boogaard M, Bosch CA, Ruivenkamp CA, Oostdijk W, Kant SG, Binder G, Ranke MB, Wit JM and Losekoot M (2012) IGF1, IGF1R and SHOX mutation analysis in short children born small for gestational age and short children with normal birth size (idiopathic short stature). *Horm Res Paediatr.* 77(4):250-60.
- Carrascosa A, Fernández Longás A, Gracia Bouthelier R, López Siguero JP, Pombo Arias M and Yturriaga R (2011) Talla baja idiopática. *An Pediatr (Barc)* 75(3):204.e1-204.e11.
- Carvalho AB, Guerra Júnior G, Baptista MTM, Faria APM, Marini SHVL and Guerra ATM (2010) Cardiovascular and renal anomalies in turner syndrome. *Rev Assoc Med Bras;* 56(6): 655-9.
- Collett-Solberg PF, Gallicchio CT, Coelho SC, Siqueira RA, Alves ST and Guimarães MM (2011) Endocrine diseases, perspectives and care in Turner syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 55(8):550-8.
- Davenport ML (2010) Approach to the Patient with Turner Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 95(4):1487–1495.
- Decker E, Durand C, Bender S, Rödelsperger C, Glaser A, Hecht J, Schneider KU and Rappold G (2011) FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet.* 20(8):1524-35.
- Diago Cabezudo JI, Carrascosa Lezcano A, Del Valle Núñez CJ, Ferrández Longás A, Gracia Bouthelier R and Pombo Arias M (2006) Talla baja idiopática: definición y tratamiento. *An Pediatr (Barc)* 64(4):360-4.
- Djordjević VA, Jovanović JV, Pavković-Lučić SB, Drakulić DD, Djurović MM and Gotić MD (2010) Cytogenetic findings in Serbian patients with Turner's syndrome stigmata. *Genet Mol Res* 9: 2213-2221.
- Donadille B, Rousseau A, Zenaty D, Cabrol S, Courtillot C, Samara-Boustani D, Salenave S, Monnier-Cholley L, Meuleman C, Jondeau G, Iserin L, Duranteau L, Cabanes L, Bourcigaux N, Bonnet D, Bouchard P, Chanson P, Polak M, Touraine P, Lebouc Y, Carel JC, Léger J and Christin-Maitre S (2012) Cardiovascular findings and management in Turner syndrome: insights from a French cohort. *European Journal of Endocrinology* 167:517–522.
- Eckert KA and Hile SE (2009) Every Microsatellite is Different: Intrinsic DNA Features Dictate Mutagenesis of Common Microsatellites Present in the Human Genome. *Mol Carcinog* 48(4): 379–388.
- Ellison JW, Wadak Z, Yong MF, Robey PG, Laig-webster M and Chiong W (1997) PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet,* 6(8):1341-1347.
- Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS and Wass JA (2002) Turner's syndrome in Adulthood. *Endocrine Reviews* 23:120-140.
- Ezquieta B, Cueva E, Oliver A and Gracia R (2002) SHOX Intragenic Microsatellite Analysis in Patients with Short Stature. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 15:139-148.
- Funari MF, Jorge AA, Souza SC, Billerbeck AE, Arnhold IJ, Mendonca BB and Nishi MY (2010) Usefulness of MLPA in the detection of SHOX deletions. *European Journal of Medical Genetics* 53: 234-238.
- Girgis HZ and Sheetlin SL (2012) MsDetector: toward a standard computational tool for DNA microsatellites detection. *Nucleic Acids Research* 1–13.

- Gonzalez L and Witchel SF (2012) The patient with Turner syndrome: puberty and medical management concerns. *Fertil Steril* 98(4):780-6.
- Gornik KC, Grubić Z, Stingl K, Tonković Durisević I and Begović D (2011) Application of microsatellite loci on the chromosome X for rapid prenatal detection of the chromosome X numerical abnormalities. *Croat Med J* 52: 392-5.
- Gravholt CH, Juul S, Naeraa RW and Hansen J (1998) Morbidity in Turner Syndrome. *J Clin Epidemiol* 51: 147-158.
- Hassold T and Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews* 2:280-291.
- Hirschfeldova K, Solc R, Baxova A, Zapletalova J, Kebrdlova V, Gaillyova R, Prasilova S, Soukalova J, Mihalova R, Lnenicka P, Florianova M and Stekrova J (2012) SHOX gene defects and selected dysmorphic signs in patients of idiopathic short stature and Léri–Weill dyschondrosteosis. *Gene* 491: 123–127.
- Hjerrild BE, Mortensen KH and Gravholt CH (2008) Turner syndrome and clinical treatment. *British Medical Bulletin* 86:77–93.
- ISCN (2005) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Cytogenetic & Genome Research). Ed. Karger.
- Jorge AA, Nishi MY, Funari MFA, Arnhold IJP and Mendonça PP (2008) Baixa estatura por haploinsuficiência do gene SHOX: do diagnóstico ao tratamento. *Arq Bras Endoc Metab* 52: 765-773.
- Jorge AAL, Mendonça BB and Arnhold (2006) Crescimento normal e baixa estatura. In: Lopes AC (editor) *Tratado de Clínica Médica*. Ed. Roca, p 3486-3504.
- Kant SG, Wit JM and Breuning MH (2003) Genetic Analysis of Short Stature. *Horm Res* 60:157–165.
- Kaur A and Phadke SR (2012) Analysis of Short Stature Cases Referred for Genetic Evaluation. *Indian J Pediatr.* 79(12):1597-600.
- Kelkar YD, Tyekucheva S, Chiaromonte F and Makova KD (2008) The genome-wide determinants of human and chimpanzee microsatellite evolution. *Genome Res* 18(1):30-8.
- Kota SK, Gayatri K, Pani JP, Kota SK, Meher LK and Modi KD (2012) Dysgerminoma in a female with turner syndrome and Y chromosome material: A case-based review of literature. *Indian J Endocrinol Metab.* 16(3): 436–440.
- Leclercq S, Rivals E and Jarne P (2010) DNA Slippage Occurs at Microsatellite Loci without Minimal Threshold Length in Humans: A Comparative Genomic Approach. *Genome Biol. Evol* 2:325–335.
- Lipay MVN, Bianco B and Verreschi ITN (2005) Disgenesias Gonadais e Tumores: Aspectos Genéticos e Clínicos. *Arq Brás Endocrinol Metab* 49: 60-70.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A and Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453-2465.
- Llano-rivas I, Fernández-toral J and Navarro-vera I (2011) Discondrosteosis de Leri-Weill. Mutación en gen SHOX y expresividad variable. *An Pediatr (Barc).* 74(6):405-408.
- Longui CA (2008) Uso de GH em Pacientes com Baixa Estatura Idiopática. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52(5):750-756).

- Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, Häcker B, Rao E, Karperien M, Wit JM, Richter W, Tommasino M and Rappold GA (2004) The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 279(35):37103-14.
- Marchini A, Daeffler L, Marttila T, Schneider KU, Blaschke RJ, Schnölzer M, Rommelaere J and Rappold G (2006) Phosphorylation on Ser106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein. *J Mol Biol.* 355(3):590-603.
- Marchini A, Häcker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, Karperien M and Rappold G (2007) BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet.* 16(24):3081-7.
- Martins RRS, Ramos HIB, Llerena JCH and Almeida JCC (2003) Investigação Clínica e Genética em meninas com baixa estatura idiopática. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47: 684-694.
- Mello MP, Assumpção JG and Hackel C (2005) Genes envolvidos na Determinação e diferenciação do Sexo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 49: 14-25.
- Munns CJ, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, Rappold G, Glass IA and Batch JA (2004) Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J. Clinical Endocrinology.* 89(8):4130-4135.
- Oliveira CS and Alves C (2011) The role of the *SHOX* gene in the pathophysiology of Turner Syndrome. *Endocrinol Nutr.* 58(8):433-442.
- Oliveira EJ, Dantas JLL, Castellen MS and Machado MD (2008) identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio da exploração do banco de dados de dna. *Rev. Bras. Frutic* 30(3): 841-845.
- Onal H, Adal E, Ersen A and Onal Z (2012) Turner syndrome with a ring X chromosome and atypical skin manifestation: port wine stain. *Int J Dermatol* 51(2):207-10.
- Pauls K et al (2005) Gonadoblastoma: evidence for a stepwise progression to dysgerminoma in a dysgenetic ovary. *Virchows Arch* 447: 603–609.
- Portnoï MF, Chantot-Bastaraud S, Christin-Maitre S, Carbonne B, Beaujard MP, Keren B, Lévy J, Dommergues M, Cabrol S, Hyon C and Siffroi JP (2012) Familial Turner syndrome with an X;Y translocation mosaicism: Implications for genetic counseling. *European Journal of Medical Genetics* 55: 635-640.
- Quinteiro García C, Castro-Feijóo L, De Trocóniz LF, Barrero Conde J, Domínguez Puente F and Pombo M (2004) Análisis Genético de la talla baja. *An Pediatr* 60: 9-14.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T and Rappold GA (1997) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat genet* 16: 54-63.
- Rappold GA, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL and Niesler B (2007) Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 44:306-313.

- Richard GF, Kerrest A and Dujon B (2008) Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes *Microbiology and Molecular Biology reviews* 72(4): 686–727.
- Rosa RFM, Dibi RP, Picetti JS, Rosa RCM, Zen PRG, Graziadio C and Paskulin GA (2008) Amenorréia e anormalidades do cromossomo X. *Rev Bras Ginecol Obstet* 30: 511-517.
- Rosenbloom AL and Vilar L (2006) Investigação da Criança com baixa estatura. In: Vilar L (editor) *Endocrinologia Clínica*. Ed. Guanabara, p 155-177.
- Rosilio M, Huber-Lequesne C, Sapin H, Carel JC, Blum WF, Cormier-Daire (2012) Genotypes and phenotypes of children with SHOX deficiency in France. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(7):E1257-65.
- Sabherwal N, Bangs F, Röth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, Van der kamp H, Kapeller J, Tickle C and Rappold G (2007) Longrange conserved noncoding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet.* 16(2):210-22.
- Salmon-musial AS, Rosilio M, David M, Huber C, Pichot E, Cormier-daire V and Nicolino M (2011) Clinical and radiological characteristics of 22 children with SHOX anomalies an familial short stature suggestive of Léri-Weill Dyschondrosteosis. *Horm Res Paediatr.* 76(3):178-85.
- Santos V, Marçal M, Amaral D, Pina R, Lopes L and Fonseca G (2010) SINDROMA DE TURNER DA CRIANÇA AO ADULTO...Uma Abordagem Multidisciplinar. *Acta Med Port* 23: 873-882.
- Schneider KU, Marchini A, Sabherwal N, Röth R, Niesler B, Marttila T, Blaschke RJ, Lawson M, Dumic M and Rappold G (2005) Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Léri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat.* 26(1):44-52.
- Seaver LH and Irons M (2009) Genetic evaluation of short stature. *Genetics in Medicine* 11(6): 465-470.
- Sharma PC, Grover A and Gunter Kahl G (2007) Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *TRENDS in Biotechnology* 25(11): 490-498.
- Schaper E, Kajava AV, Hauser A and Anisimova M (2012) Repeat or not repeat?—Statistical validation of tandem repeat prediction in genomic sequences. *Nucleic Acids Research* 1-13.
- Seabright M (1972) The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma.* 36: 2004-210.
- Scully RE (1970) Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 25: 1340–1356.
- Scully RE (1977) Ovarian Tumors. *American Journal of Pathology* 87(3):685-720.
- Stuppia L, Calabrese G, Gatta V, Pintor S, Morizio E, Fantasia D, Guanciali Franchi P, Rinaldi MM, Scarano G, Concolino D, Giannotti A, Petreschi F, Anzellotti MT, Pomilio M, Chiarelli F, Tumini S and Palka G (2003) SHOX mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature. *J Med Genet* 40: E11.
- Svingen T and Tonissen KF (2006) Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* 97: 88–96.
- Sybert VP and McCauley E (2004) Turner's Syndrome. *The New England Journal of Medicine* 351(12):1227-1238.

- Thomas NS, Maloney V, Bass P, Mulik V, Wellesley D and Castle B (2004) SHOX mutations in a family and a fetus with Langer mesomelic dwarfism. *Am J Med Genet A*. 128(2):179-84.
- Torres IHB and Silva GAP (2007) Crescimento da criança. In: Lima M, Motta ME and Alves G (editores) *Saúde da criança: para entender o normal*. Ed. Universitária, p 21-31.
- Turner C, Dennis NR, Skuse DH and Jacobs PA (2000) Seven ring (X) chromosomes lacking the XIST locus, six with an unexpectedly mild phenotype. *Hum Genet* 106:93–100.
- Urbach A and Benvenisty N (2009) Studying Early Lethality of 45,XO (Turner's Syndrome) Embryos Using Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 4(1):e4175.
- Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH and Cohen P (2008) Idiopathic short stature: Definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Hormone & IGF Research* 18: 89–110.
- Wit (2011) Definition and Subcategorization of Idiopathic Short Stature: Between Consensus and Controversy. *Horm Res Paediatr* 76:3–6.
- Wolff DJ, Van Dyke DL and Powell CM (2010) Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genet Med* 12(1):52-5.
- Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott CI JR, Marttila P and Ross JL (2002) Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet*. 110(2):158-63.
- Zhong Q and Layman LC (2012) Genetic considerations in the patient with Turner syndrome—45,X with or without mosaicism. *Fertility and Sterility* 98(4):775-779.

9. ANEXOS

**ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira– IMIP**

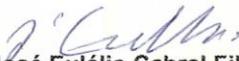
Instituto Materno Infantil
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o Projeto de pesquisa nº. 802 intitulado **"Investigação cromossômica e molecular em pacientes com Síndrome de Turner"**, apresentado pela Pesquisadora Gabriela Ferraz Leal foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira – IMIP, em Reunião Ordinária 03 de agosto de 2006. .

Recife, 04 de agosto de 2006.


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
e Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira

**ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP.**

Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a solicitação de Inclusão da investigação molecular do gene SHOX apresentada pela pesquisadora **Gabriela Ferraz Leal** para o projeto de pesquisa intitulado **“Investigação cromossômica e molecular em pacientes com Síndrome de Turner”**, foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira em 24 de novembro de 2011

Recife, 28 de novembro de 2011.


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES MAIORES DE 21 ANOS

Convido o Sr(a). _____ a participar da pesquisa sob o título “Investigação molecular em pacientes com suspeita clínica da Síndrome de Turner: deleções do gene *SHOX*”. Declaro que fui devidamente esclarecido (a) pela Dra. Neide Santos e que:

1. Concordo em participar da pesquisa sem receber qualquer pressão dos pesquisadores ou médicos que estão me atendendo;
2. Foi-me assegurado que continuarei a ser atendido no IMIP independentemente de continuar participando ou não da pesquisa;
3. Concordo em prestar informações pessoais à equipe responsável pela pesquisa, contudo estas informações deverão ser confidenciais;
4. Autorizo a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de deleções no gene *SHOX*. Declaro ainda que fui informado sobre o objetivo destes exames e que terei livre acesso aos seus resultados;
5. Posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo depois de ter assinado este termo, sem que isto comprometa o meu atendimento no IMIP;
6. Ao participar desta pesquisa, o indivíduo se expõe ao risco de desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue. O hematoma deve desaparecer dentro de poucos dias.
7. Quanto ao benefício, alguns pacientes podem ser beneficiados pelo conhecimento adquiridos neste estudo.

Recife,

Assinatura do responsável pela paciente

Assinatura do pesquisador

Testemunha

Testemunha

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES MENORES DE 21 ANOS

Convido o Sr(a). _____ a participar da pesquisa sob o título “Investigação molecular em pacientes com suspeita clínica da Síndrome de Turner: deleções do gene *SHOX*”. Declaro que fui devidamente esclarecido (a) pela Dra. Neide Santos e que:

1. Concordo em participar da pesquisa sem receber qualquer pressão dos pesquisadores ou médicos que estão me atendendo;
2. Foi-me assegurado que continuarei a ser atendido no IMIP independentemente de continuar participando ou não da pesquisa;
3. Concordo em prestar informações pessoais à equipe responsável pela pesquisa, contudo estas informações deverão ser confidenciais;
4. Autorizo a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de deleções no gene *SHOX*. Declaro ainda que fui informado sobre o objetivo destes exames e que terei livre acesso aos seus resultados;
5. Posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo depois de ter assinado este termo, sem que isto comprometa o meu atendimento no IMIP;
6. Ao participar desta pesquisa, o indivíduo se expõe ao risco de desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue. O hematoma deve desaparecer dentro de poucos dias.
7. Quanto ao benefício, alguns pacientes podem ser beneficiados pelo conhecimento adquirido neste estudo.

Recife,

Assinatura do responsável pela paciente

Assinatura do pesquisador

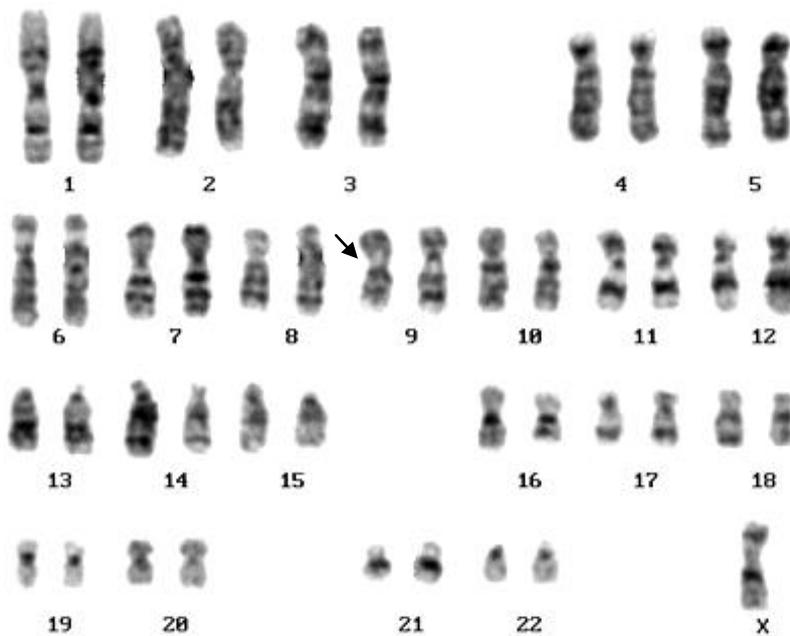
Testemunha

Testemunha

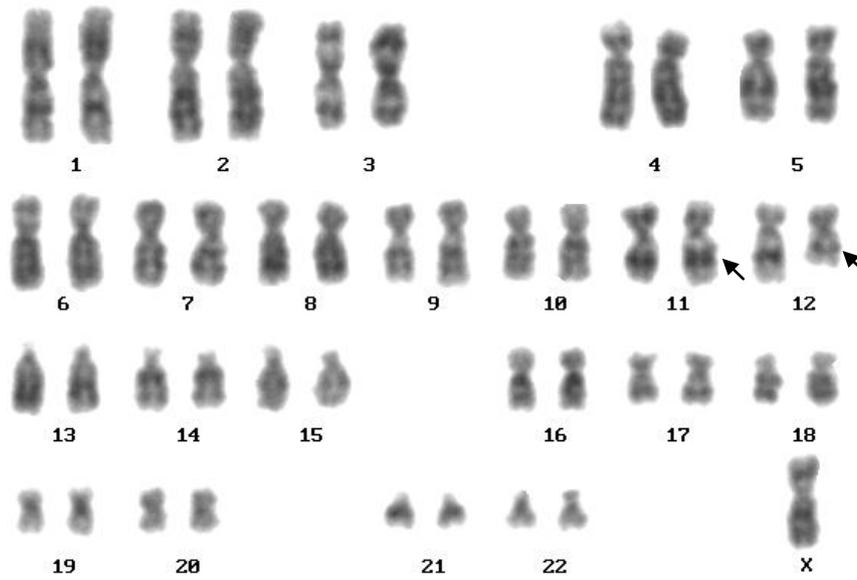
ANEXO E - Cariótipos visualizados nas pacientes com síndrome de Turner



Cariótipo com bandeamento G: 45,X



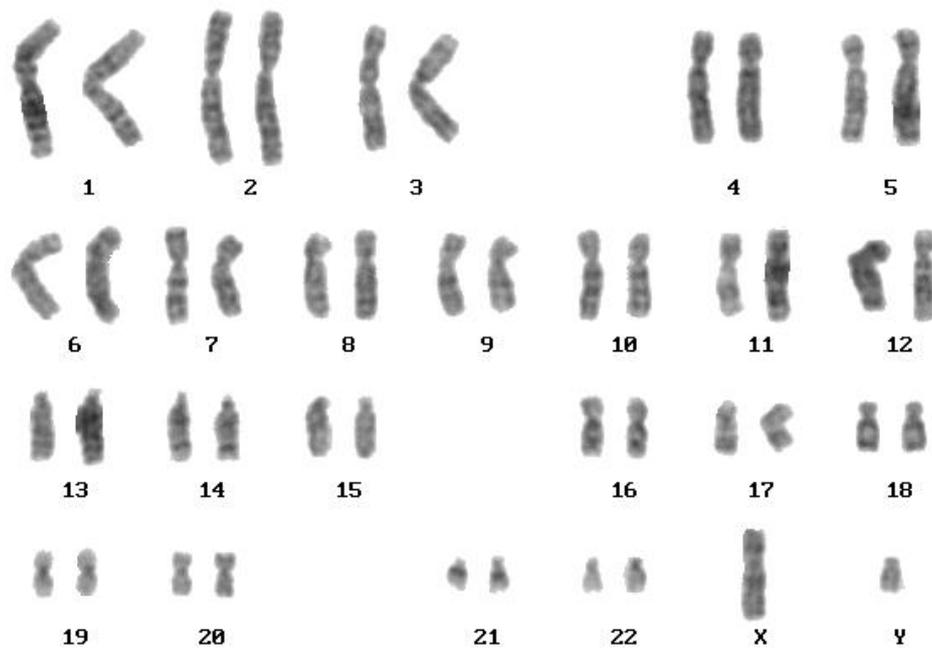
Cariótipo com bandeamento G: 45,X,inv(9)(p11q13)



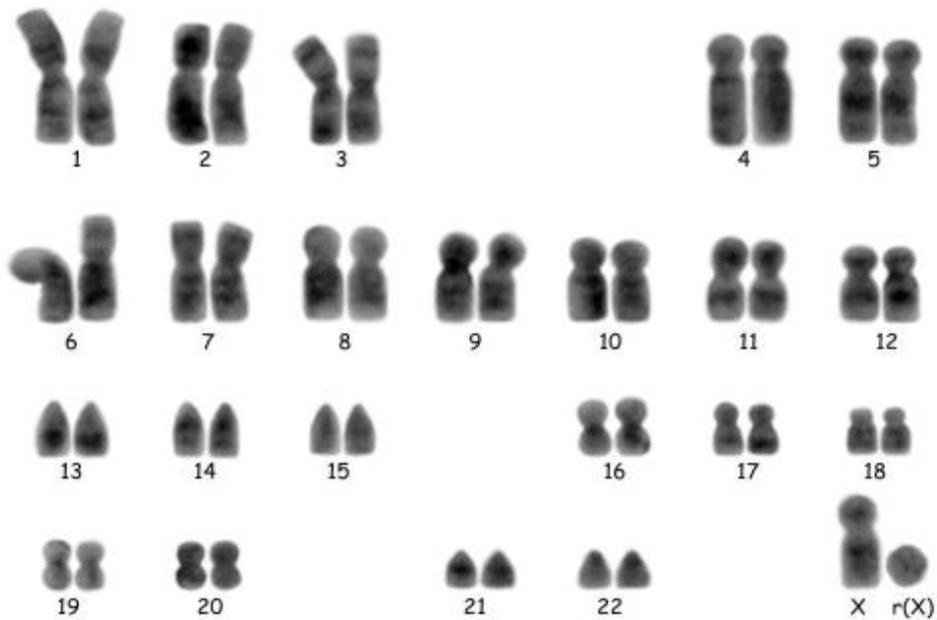
Cariótipo com bandeamento G: 45,X,t(11q;12q). As setas indicam os cromossomos translocados



Cariótipo com bandeamento G: 46,X,i(Xq)



Cariótipo com bandeamento G: Paciente mosaico 45,X/46,XY. Na figura, a linhagem celular 46,XY



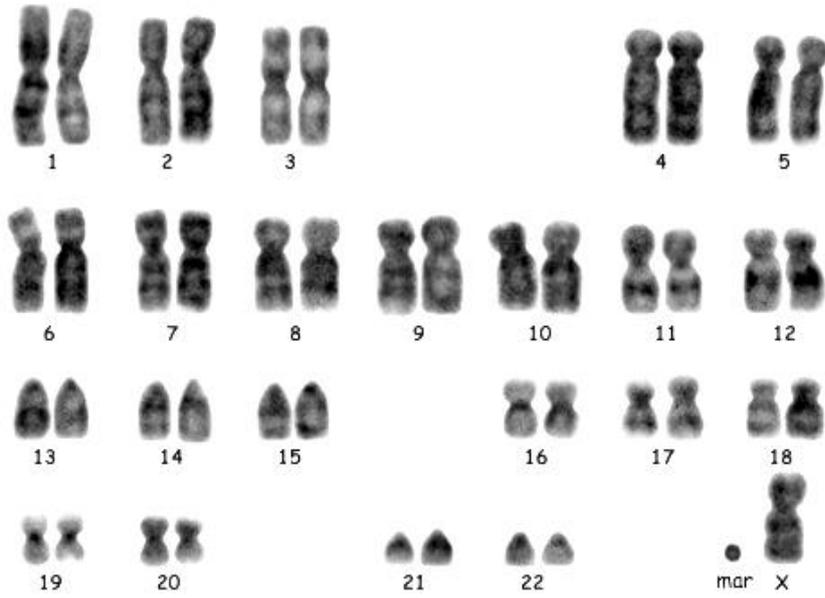
Cariótipo com bandeamento G: Paciente mosaico 45,X/46,X,r(X). Na figura, a linhagem celular 46,X,r(X)



Cariótipo com bandeamento G: Paciente mosaico 45,X/46,X,inv dup(Xq). Na figura, a linhagem celular 46,X,inv dup(Xq)



Cariótipo com bandeamento G: Paciente mosaico 45,X/47,XXX. Na figura, a linhagem celular 47,XXX

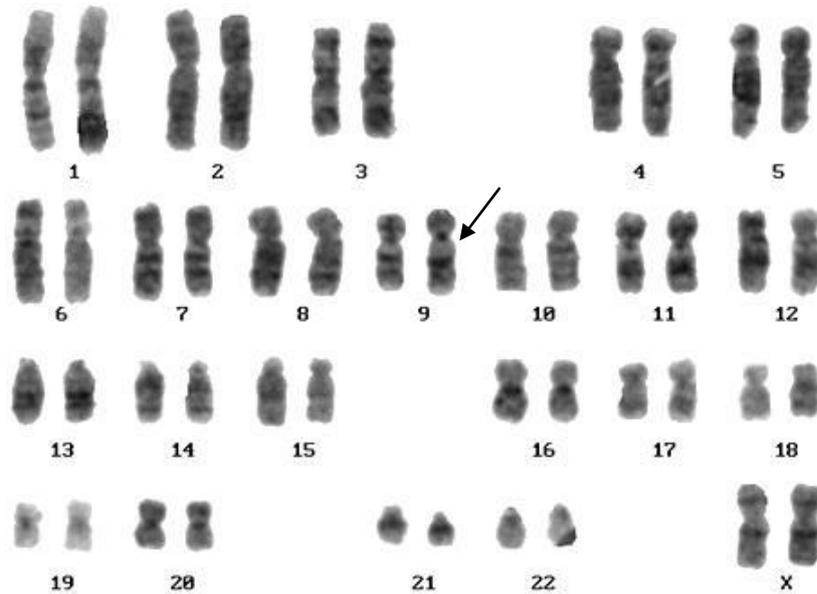


Cariótipo com bandeamento G: Paciente mosaico 45,X/46,X,+mar. Na figura, a linhagem celular 46,X,+mar

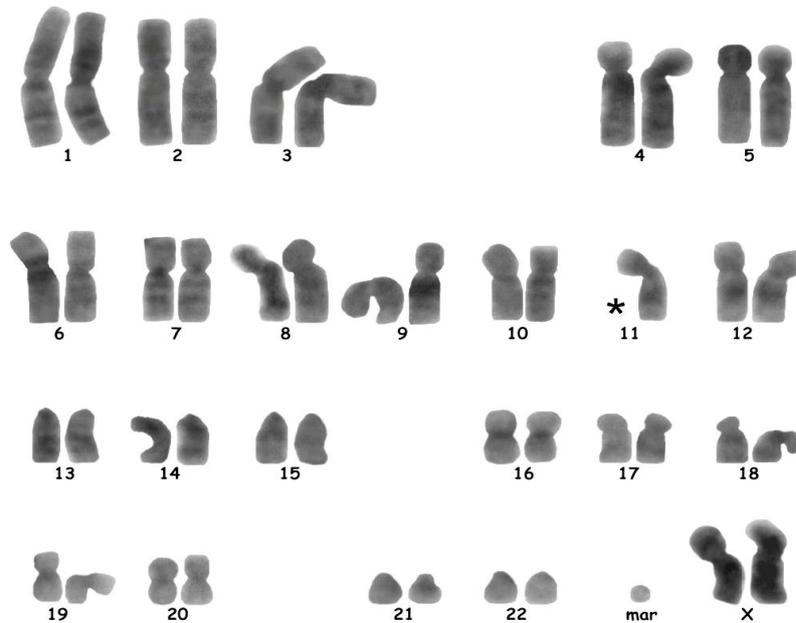


Cariótipo com bandeamento G: Paciente mosaico 45,X/46,X,del(Xp). Na figura, a linhagem celular 46,X,del(Xp)

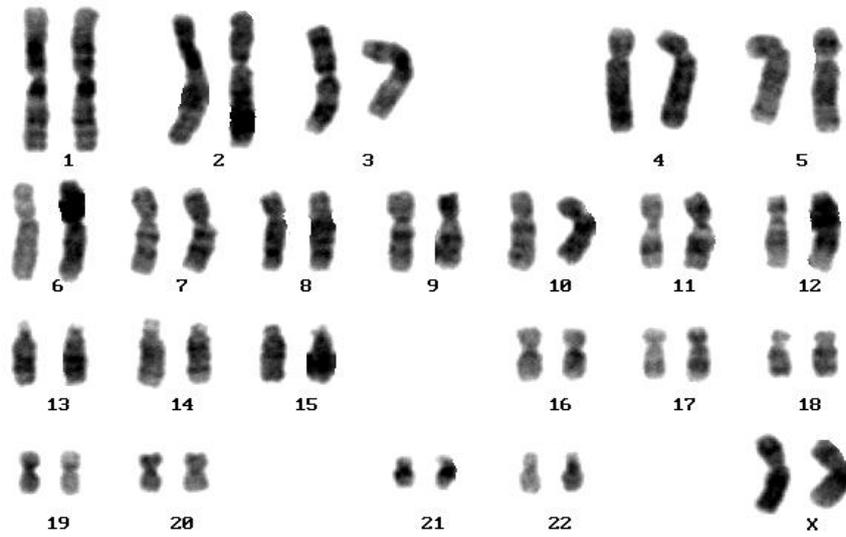
ANEXO F - Cariótipos visualizados nas pacientes com outras constituições cariotípicas



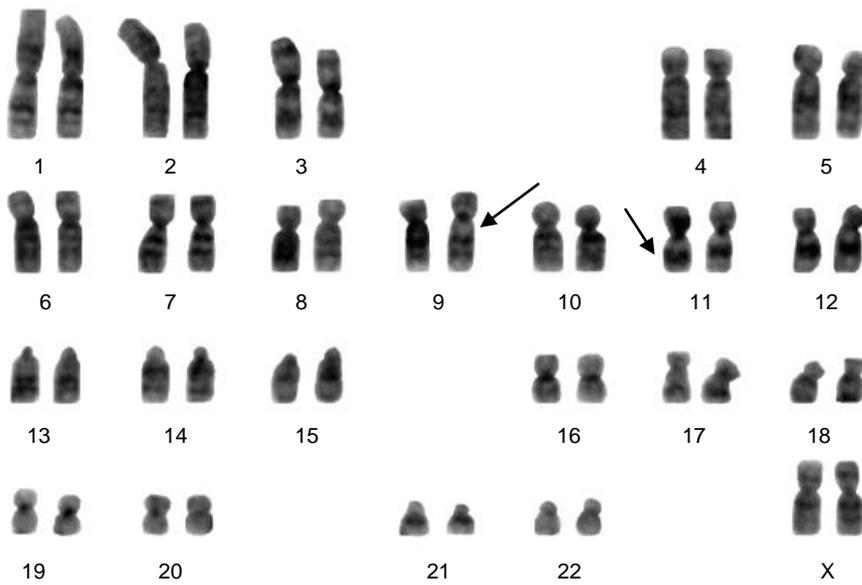
Cariótipo com bandeamento G: 46,XX,9qh⁺



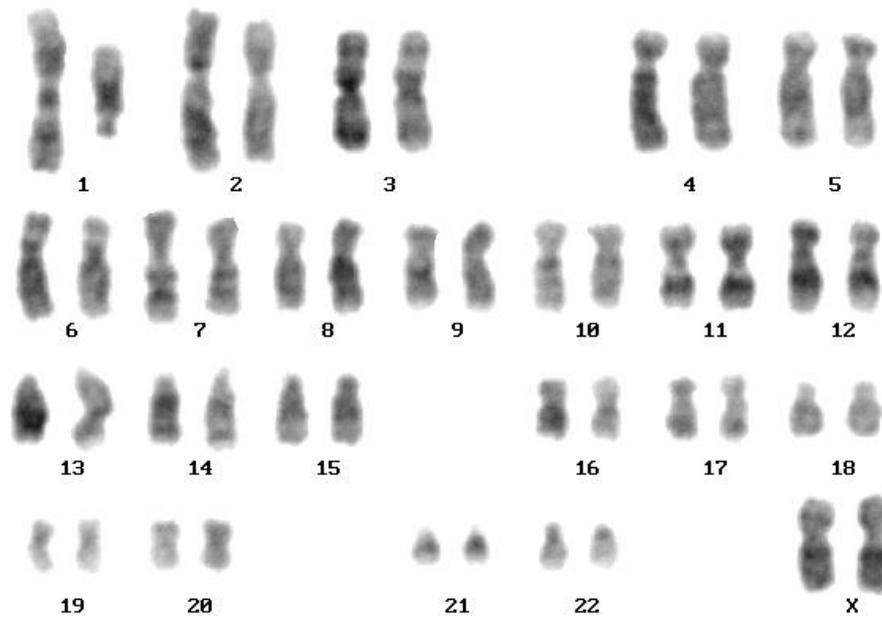
Cariótipo com bandeamento G: Paciente mosaico 46,XX/47,XX,+mar. Na figura, a linhagem celular 47,XX,+mar



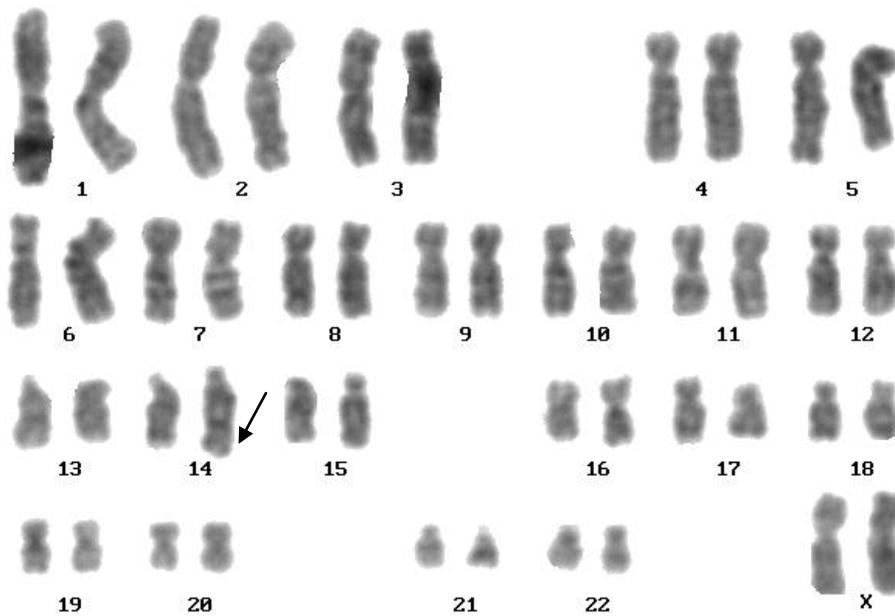
Cariótipo com bandeamento G: 46,XX,9qh+,add(22p)



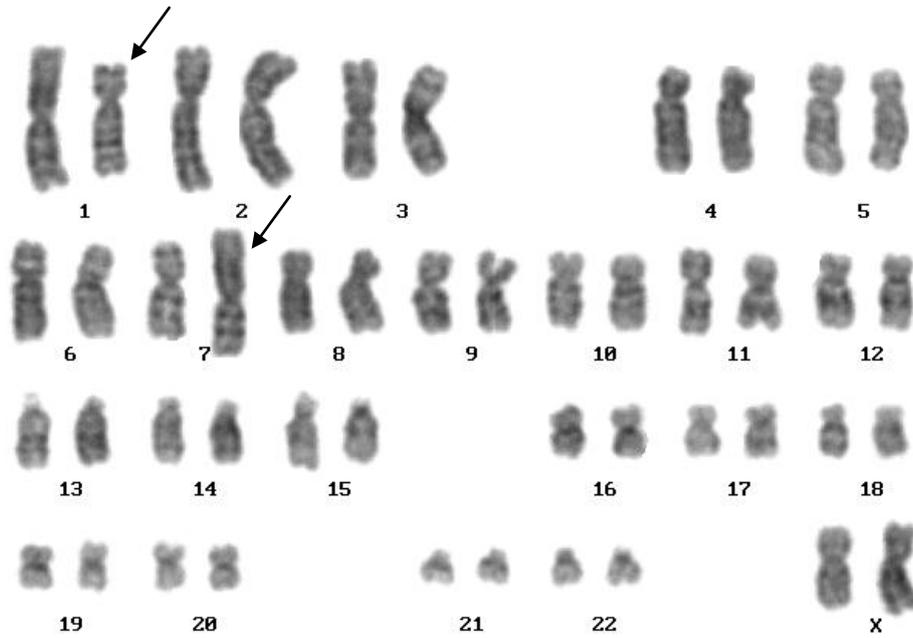
Cariótipo com bandeamento G: 46,XX,add(9q),del(11q)



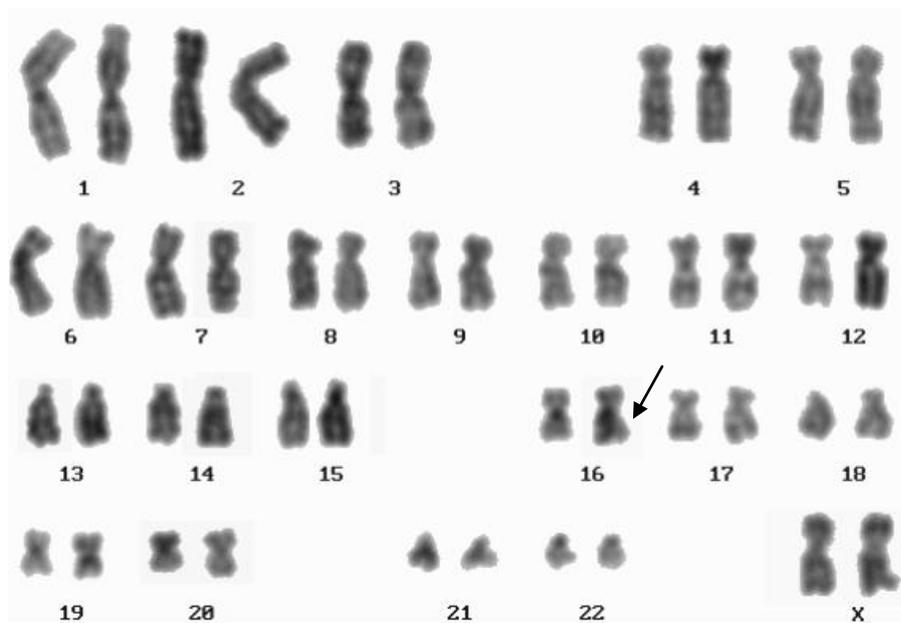
Cariótipo com bandeamento G: Paciente mosaico 46,XX/46,XX,del(1q). Na figura, a linhagem celular 46,XX,del(1q)



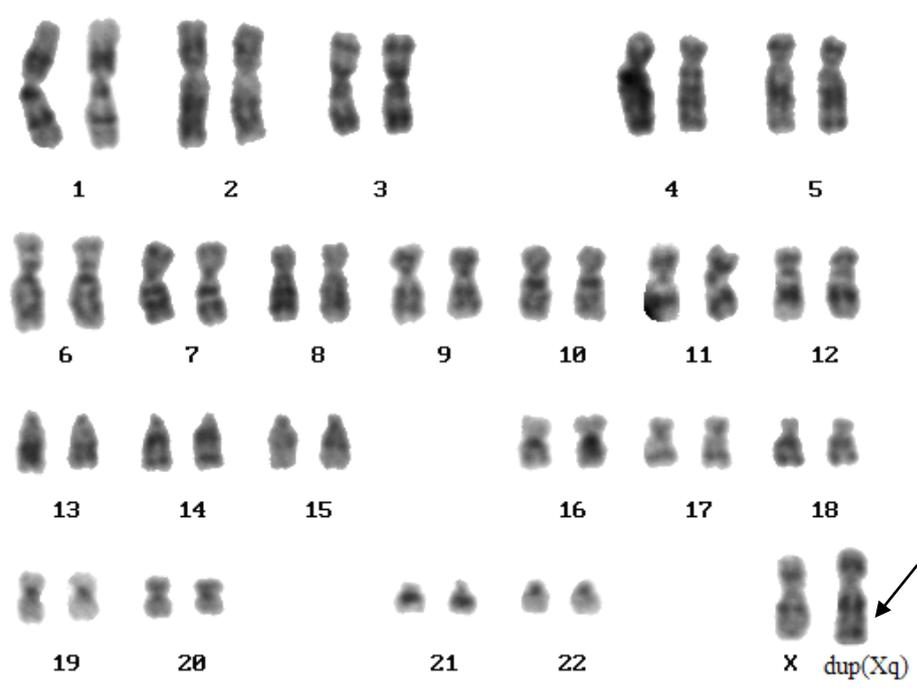
Cariótipo com bandeamento G: 46,XX,add(14q)



Cariótipo com bandeamento G: 46,XX,t(1p;7p)

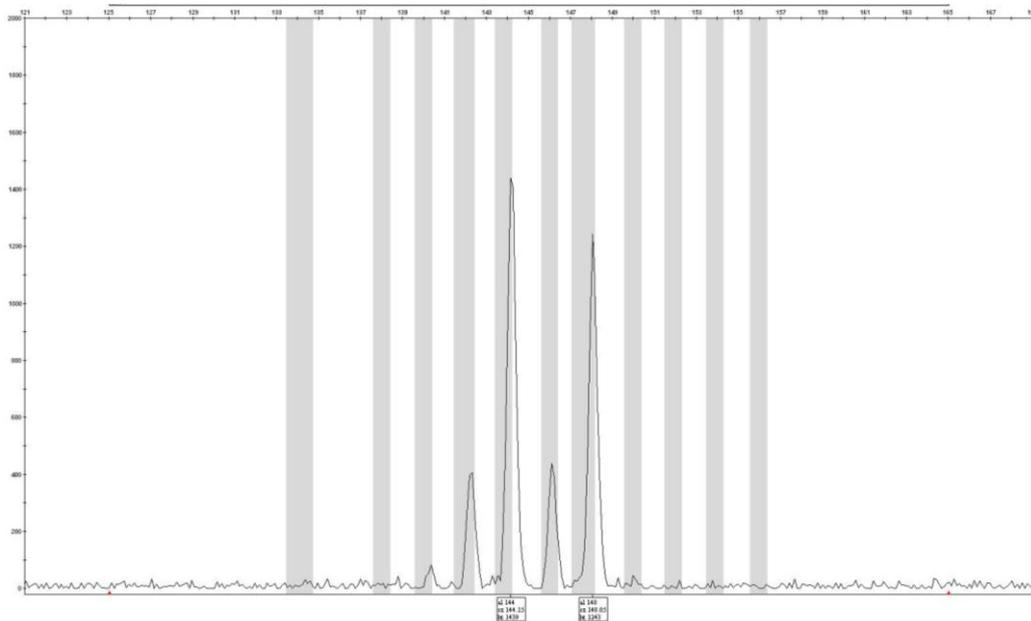


Cariótipo com bandeamento G: 46,XX,16qh-

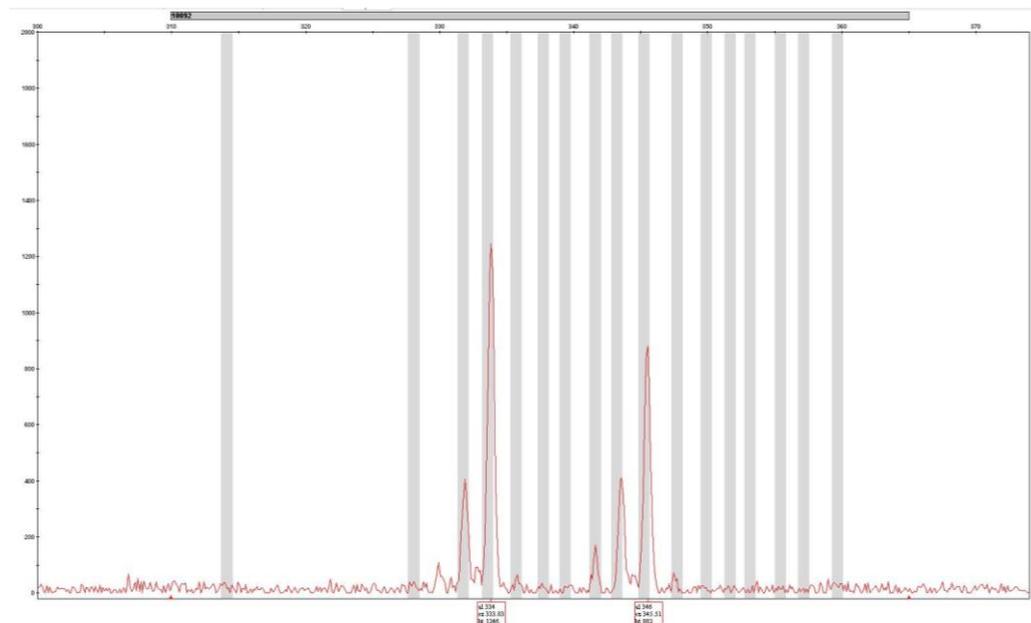


Cariótipo com bandeamento G: 46,X,dup(Xq)

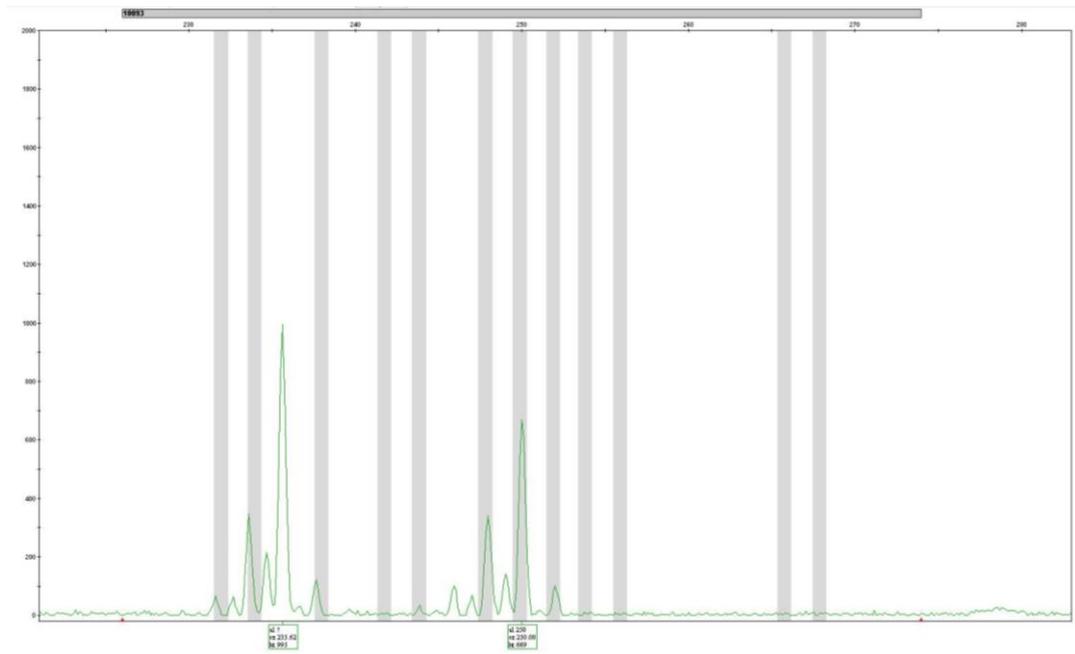
ANEXO G - Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação de STR



Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação do STR de repetições CA indicando a presença de dois alelos (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).

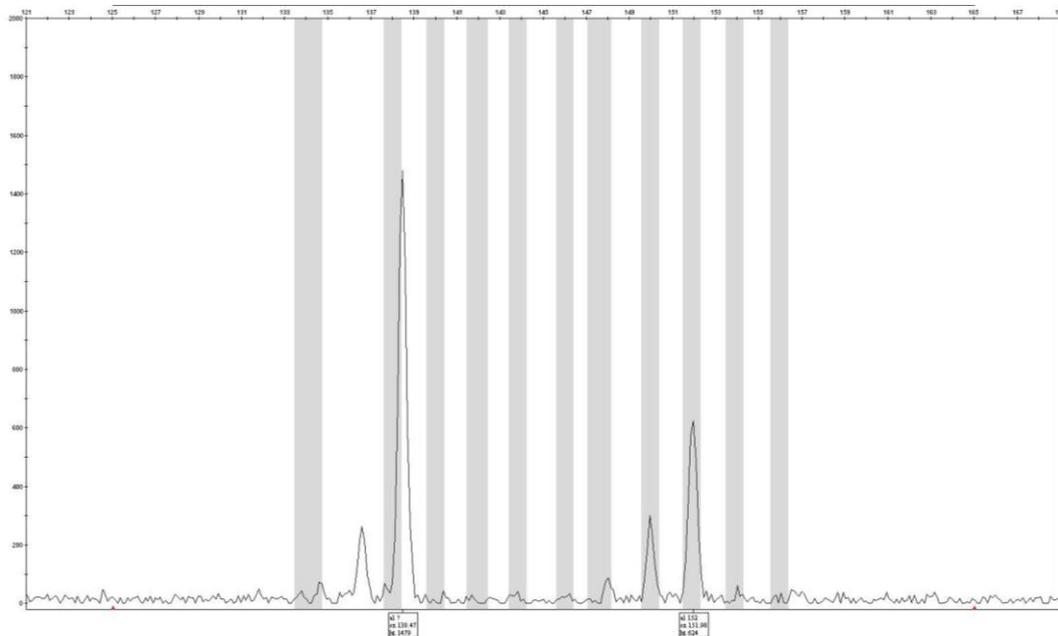


Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação do STR DXYS10092 indicando a presença de dois alelos (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).



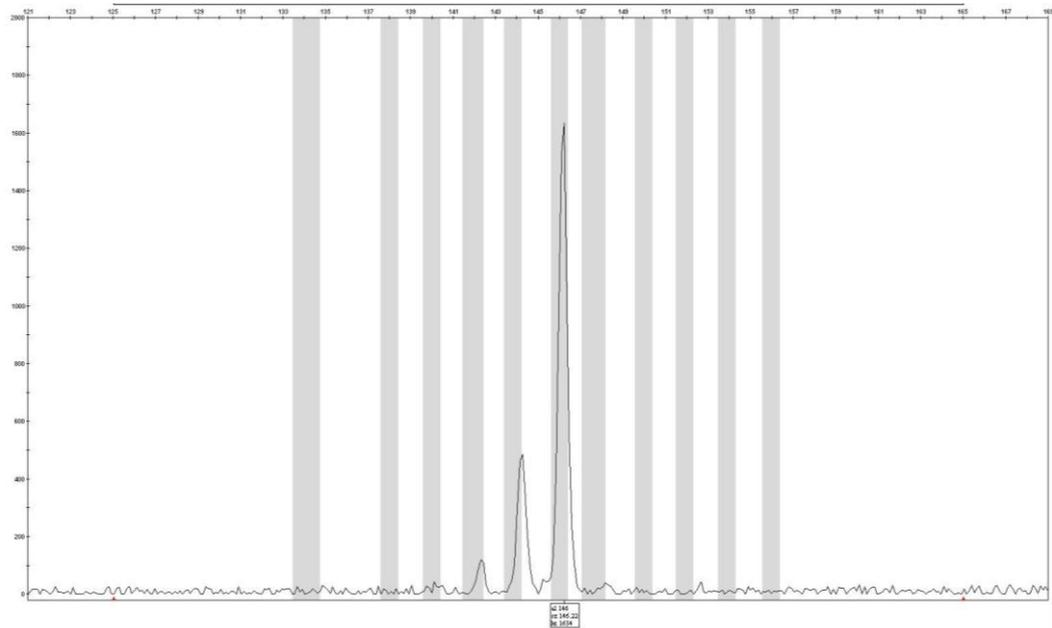
Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação do STR DXYS10093 indicando a presença de dois alelos (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).

ANEXO H - Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação de STR

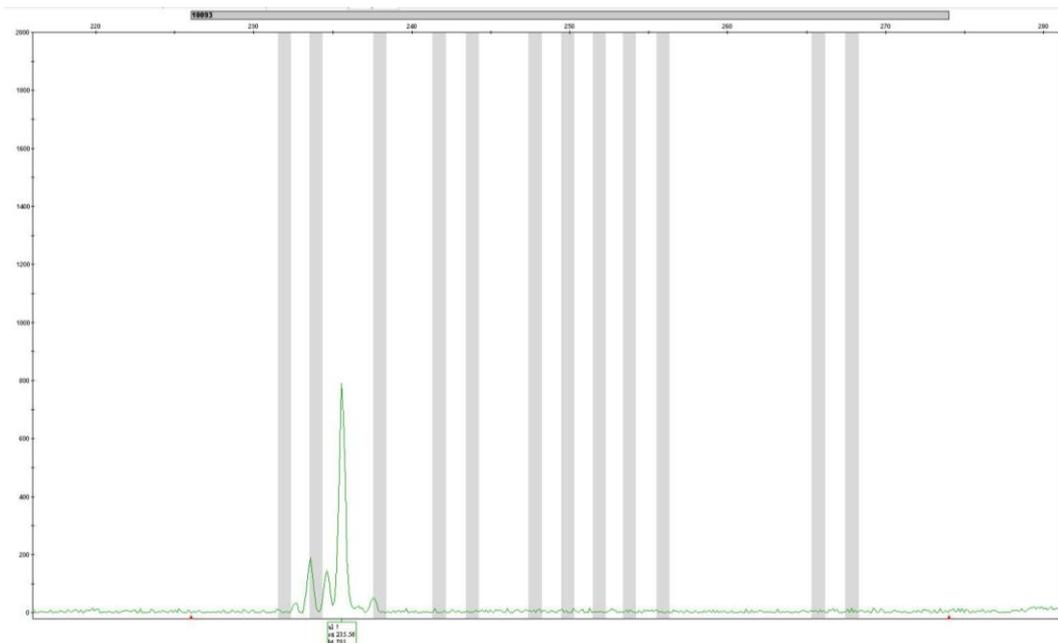


Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação do STR de repetições CA indicando a presença de dois alelos. A desproporção acentuada entre a altura dos picos indica a presença de alelos desbalanceados (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).

Anexo I - Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação de STR



Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação do STR de repetições CA indicando a presença de um único alelo (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).



Eletroferogramas dos produtos da PCR obtidos por amplificação do STR DXYS10093 indicando a presença de um único alelo (Genetic Analyser 3500/ software GeneMapper v4.1).

ANEXO J – Carta de aceite para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)* do artigo intitulado “Effect of chromosome variations on the expression of Turner phenotype”



Ribeirão Preto, 25 de Setembro de 2012.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo “Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype”, GMR 2376, de autoria de Adriana Valéria Sales Bispo, Luana Oliveira dos Santos, Pollyanna Burégio-Frota, Myrella Barros Galdino, Andrea Rezende Duarte, Gabriela Ferraz Leal, Jacqueline Araújo, Bárbara Gomes, Eliane Maria Soares-Ventura, Maria Tereza Cartaxo Muniz and Neide Santos, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,184, segundo JCR - junho 2012.

Atenciosamente,



Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991

ANEXO K - Manuscrito submetido e aceito para publicação no periódico

Genetics and Molecular Research (GMR – 2376)

Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype

Running title: Phenotype correlation in Turner's syndrome

Adriana Valéria Sales Bispo¹, Luana Oliveira dos Santos¹, Pollyanna Burégio-Frota², Myrella Barros Galdino¹, Andrea Rezende Duarte³, Gabriela Ferraz Leal³, Jacqueline Araújo⁴, Bárbara Gomes⁴, Eliane Maria Soares-Ventura⁵, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{5,6} and Neide Santos¹.

¹Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Laboratório de Pesquisa Translacional Prof. C. Anthony Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil

³Unidade de Genética Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil

⁴Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁵Centro de Oncohematologia Pediátrica de Pernambuco, Hospital Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁶Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Corresponding author: Neide Santos

Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária,
50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

Tel: 5508121268520

Fax: 5508121268522

e-mail santos_neide@yahoo.com.br

ABSTRACT: Turner syndrome (TS) is a chronic disease related to haploinsufficiency of genes that are normally expressed in both X chromosomes in patients with female phenotype that is associated with a wide range of somatic malformations. We made detailed cytogenetic and clinical analysis of 65 patients with TS from the region of Recife, Brazil, to determine the effects of different chromosome constitutions on expression of the TS phenotype. Overall, patients with X-monosomy exhibited a tendency to have more severe phenotypes with higher morbidity, showing its importance in TS prognosis. Additionally, we found rare genetic and phenotypic abnormalities associated with this syndrome. To the best of our knowledge, this the first case of 45,X,t(11;12)(q22;q22) described as a TS karyotype. Turner patients usually have normal intelligence; however, moderate to severe mental retardation were found in five TS cases, which is considerate a very uncommon feature in this syndrome.

Key words: Mosaicism; Chromosomal abnormality; Balanced translocation; X-monosomy

INTRODUCTION

Turner syndrome (TS) is one of the most common chromosomal disorders, characterized by the absence or abnormality of one sex chromosome either in all or some cells. This genetic disorder is caused by haploinsufficiency of genes normally expressed in both X chromosomes, which are involved in the physical development and maintenance of ovarian function in patients with female phenotype, affecting approximately 1/2500 live-born girls (Stochholm et al., 2006).

According to cytogenetic reports, chromosome monosomy (45,X) is found in 50-60% of cases. Other karyotypes with structural changes in the X chromosome are present in approximately 30% of cases, including isochromosome of the long arm, deletion of the short arm or ring chromosomes, either in homogeneous karyotypes or in mosaics with a 45,X cell line (Oliveira et al., 2009; Djordjević et al., 2010; Elleuch et al., 2010). Patients with TS may also have a second cell line with a normal or abnormal Y chromosome in 5 to 6% of cases (Gravholt, 2005). On the other hand, few cases exhibit complex karyotypes, which may include the formation of derivatives of the X chromosome (Binkert et al., 2010; Burégio-Frota et al., 2010).

The clinical profile of TS is evidenced by short stature and gonadal dysgenesis, leading to delayed pubertal development, primary amenorrhea and sterility. Furthermore, a variety of dysmorphic features may be present, such as lymphedema of hands and feet, short and/or webbed neck, cubitus valgus, low posterior hairline, low-set ears, widely spaced nipples, ogival palate, ptosis, epicanthal folds and hypoplasia of the fourth or fifth metacarpal and metatarsal bones (Sybert and McCauley, 2004; Hjerrild et al., 2008). In addition, this syndrome may involve various malformations, especially in the heart (most commonly coarctation of the aorta) and the kidneys, besides hearing impairment, hypertension, thyroid disease and obesity (Bondy, 2009; Davenport, 2010).

In view of the importance of establishing genotypic and phenotypic correlations for appropriate management of TS patients, this study reports a detailed cytogenetic and clinical analysis of patients with Turner syndrome to provide new information on the developmental effects of different chromosome constitutions and their role in the expression of TS phenotype. Additionally, this work reports on the rare genetic and phenotypic abnormalities associated with this syndrome.

MATERIAL AND METHODS

From May 2006 to December 2011, cytogenetic analyses were performed in 65 patients with clinical indication of TS, who were seen in the Service of Medical Genetics at the Institute of Integral Medicine Professor Fernandes Figueira and in the Service of Pediatric Endocrinology at Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco. The cytogenetic study was based on cell culture from phytohemagglutinin-stimulated peripheral lymphocytes using standard procedures. Detailed clinical data for patients were obtained by either physical examination or review of medical records. Once the syndrome was confirmed, most patients underwent ultrasound and cardiologic evaluation. Statistical analyses were performed by the Fisher test, comparing the patients with 45,X and those with other non-normal karyotypes. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

This study was designed according to the guidelines and regulatory norms of Brazil's National Health Council for research involving human subjects and Resolution

No. 196 of October 10, 1996. Informed consent was obtained from all patients or their parents. The project was approved by the Ethical Committee (Record: CEP/IMIP No. 802/06).

RESULTS

The karyotype distribution of 65 TS patients is shown in Table 1. The most common was the monosomic karyotype (61.5%). Structural changes in the X chromosome together with mosaicism were observed in 24.5% and mosaic karyotypes without structural anomalies, which also included the Y chromosome, were found in 7.5% of the patients. Isochromosome Xq was the most frequent structural change observed in 23.1% in either mosaics (45,X cell line) or in homogeneous karyotypes.

The age of TS patients at the moment of diagnosis ranged from newborn to 35 years old, but in most cases TS was diagnosed at the age of puberty or beyond (9 - 18 years old). In general, TS was confirmed early in patients with X-monosomy, where in almost 40% of these cases, the karyotype was established before the age of two (Table 2). However, in most patients with mosaicism and/or X structural changes (77.3%), cytogenetic analyses were not done until the age of puberty.

Webbed neck (92.31%), lymphedema of hands and feet (84.62%), congenital heart disease (61.53%) and nail hypoplasia (53.85%) were the main clinical features that led to cytogenetic analyses before the age of two in 45,X patients. Our results demonstrated that at birth these were the predominant phenotypic determinants of this syndrome.

In 89.3% of all cases, short stature was the most frequent phenotypic characteristic. This growth failure was more frequent among patients with monosomy as compared to those who showed mosaicism (Figure 1), but this difference was not statistically significant ($P = 0.486$). Another important clinical feature was gonadal dysgenesis with delayed pubertal and primary amenorrhea, which was observed in 84.8% of TS patients at pubertal age. This clinical disorder was observed in all patients with mosaicism in contrast to carriers of X-monosomy (Figure 1), with the difference being statistically significant ($P < 0.001$).

Congenital heart disease, another important TS-related clinical factor, was found in 17.9% of cases, where it was significantly more frequent in monosomic karyotypes (Figure 1) ($P = 0.007$). Autoimmune diseases such as Hashimoto's thyroiditis (12.5%) and renal malformations (8.93%) were also observed in the subjects.

Although TS patients may have nonverbal learning disabilities, average intellectual performance is usually normal. Nevertheless, we found moderate and severe mental retardation in two and three of 65 TS patients (7.7%), respectively. The karyotypes associated with this rare stigma included 45,X (three cases), 45,X,t(11;12)(q22;q22) (one case) and 46,X,i(Xq)/45,X (one case).

Several dysmorphic features were observed, such as widely spaced nipples, epicanthal folds, shortening of the metacarpal bones and high arched palate. The most common phenotype of all TS patients was short and webbed neck (44.6%), hypoplastic nails (37.5%), low posterior hairline (19.6%), and cubitus valgus (21.4%), with the latter being more common in patients with mosaicism (Figure 1). However, only short and webbed neck ($P < 0.001$) and cubitus valgus ($P = 0.0002$) showed statistically significant differences between mosaics and 45,X cases.

We also found one TS patient with unusual cytogenetic constitution displaying the following karyotype: 45,X,t(11;12)(q22;q22)[20]. Clinical examination at the age of 33 showed short stature, short and webbed neck, low posterior hairline, primary amenorrhea

and mental retardation; she neither knew her age nor recognized colors. Karyotype analysis of the parents was not possible.

DISCUSSION

Turner syndrome is a chronic disease associated with a wide range of malformations with varying frequencies, which are mainly related to the type of X chromosome rearrangement. Our cytogenetic analyses of 65 TS patients corroborated, in general, previously reported data (Held et al., 1992; Schoemaker et al., 2008; Djordjević et al., 2010; Elleuch et al., 2010). However, our patient sample had only one case (1.5%) of mosaicism with a normal cell line (46,XX), which is significantly lower than frequencies described in the literature (8 to 17%). Although reports of TS patients with X duplications and balanced translocation are very rare, we found two of these karyotypes displaying these uncommon chromosomal rearrangements.

The case of X-duplication (Table 1) previously reported by our research group (Burégio-Frota et al., 2010) showed classical TS stigmata associated with the karyotype 46,X,inv dup(X)(pter→q22::q22→pter)/45,X. Partial X-chromosome duplications are relatively infrequent and occur predominantly in men, where they are associated with multiple congenital abnormalities (Cheng et al., 2005). Few cases of dup(Xq) have been described in females, and the abnormal phenotype usually includes short stature, developmental delay, hypogonadism and other dysmorphic anomalies. As a consequence of selection against cells with abnormal X in carrier females, most dup(Xq) are inactivated, and females appear phenotypically normal (Armstrong et al., 2003; Stankiewicz et al., 2005). In our dup(Xq) case, we believe that the clinical data observed in this patient were probably due to the 45,X cell line.

Balanced translocations are rare chromosome rearrangements and seldom found in TS. To the best of our knowledge, this is the first case of TS describing a balanced translocation involving chromosomes 11 and 12, karyotype 45,X,t(11;12)(q22;q22). To date, only seven cases of balanced translocations in 45,X cell line have been reported. Using high resolution banding, Ozkul et al. (2002) found a TS infant with the karyotype 45X,t(1;2)(q41;p16), and one case of TS with familial balanced translocation t(1;2)(q32;q21)mat was described by Kondo et al. (1979). Four other studies reported an association of X-monosomy with balanced Robertsonian translocation t(13;14) (Laszlo et al., 1984; Salamanca et al., 1985; Krajcinovic et al., 1994; Silva et al., 2006). Recently, Djordjević et al. (2010) showed a case of 45,X,t(1;9)(cen;cen) in combination with a r(X) mosaic karyotype.

Usually, balanced chromosomal translocations do not exhibit any phenotypic abnormalities. However, their carriers may have increased reproductive risk, with spontaneous abortions. In our case, the patient had a typical 45,X lineage TS phenotype. Since the X-monosomy is related to normal intelligence, we suggest that the t(11;12) could be responsible for the mental disability in this patient. Mutations in several genes have been associated with mental retardation (Kalscheuer et al., 2009; Vandeweyer and Kooy 2009), but in our case it may have been the loss of genetic information by the translocation process that may have caused mental disability.

Short stature is considered the most common feature, which affects over 90% of recognized patients (Bondy, 2009; Oliveira et al., 2009; Davenport, 2010). This growth failure was indeed the most consistent phenotypic characteristic in our work, regardless of their karyotype. In two patients, only this phenotype led us to test for TS, pointing to the importance of correlating age with anomalous height and confirming TS in girls with growth failure. Short stature and other skeletal abnormalities seen in TS occur due to

haploinsufficiency of the *SHOX* gene, which is located at Xp22 and Yp11.3, in the pseudoautosomal region of the sex chromosomes (Ogata et al., 2002).

Gonadal dysgenesis was the second most important TS stigma found in this study. This occurs in most TS individuals and is mainly caused by the haploinsufficiency of genes located on the long arm of the X chromosome, Xq26 (POF1) and Xq13-21 (POF2), which are involved in the maintenance of the ovaries. In contrast, a deletion of the distal short arm is usually compatible with normal ovarian function (Davison et al., 2000; Pienkowski et al., 2008). Even though most genes of ovarian function remain active in the i(Xq), all patients with this chromosome rearrangement exhibited gonadal disorders, which might have been attributed to hidden or gonad-confined mosaicism.

Congenital cardiovascular defects are the most life-threatening medical problem faced by TS patients and are found in 25 to 50% of them (Morgan, 2007; Bondy, 2009). Adults with TS have a 4- to 5-fold increased rate of premature mortality, which is attributed mainly to complications of congenital heart disease (Stochholm et al., 2006; Schoemaker et al., 2008). There was a significantly higher incidence of congenital heart disease in monosomic karyotypes (24.2%) compared with mosaics (8.7%), showing the association of the more severe phenotype with a 45,X cell line. In contrast, Tan and Yeo (2009) examined the frequency of congenital cardiac defects in TS patients from Singapore and found no statistical difference between monosomic and different structural mosaics.

Turner patients usually have normal intelligence, but may have difficulty with nonverbal, social, and psychomotor skills (Morgan, 2007). However, in few cases there may be mental retardation with severe congenital malformations associated with tiny ring X chromosome. This unusual clinical presentation is related to the deficiency in inactivating this tiny r(X) due to the absence of the X-inactivation center, causing the disomy of several genes, which alters the dosage compensation mechanism. The preferably inactivated r(X) is therefore associated with normal intelligence (El Abd et al., 1999; Suzigan et al., 2005). Thus, the mental retardation observed in five TS cases in our study was a very uncommon feature, since their karyotype did not show the tiny r(X). Mental retardation could be related to this additional rearrangement only in one of the five patients who had an additional chromosomal change t(11q;12q). The other four cases remain unexplained.

The genetic and phenotypic correlation of dysmorphic features, autoimmune diseases and renal malformations proved to be inconsistent, since most of these clinical data did not show statistical differences between monosomic and mosaic TS patients. The TS phenotype is attributed to haploinsufficiency of genes that are normally expressed in both the active and inactive X-chromosomes. However, some reports indicate that other factors, not yet fully elucidated, may influence phenotypic expression, including hidden mosaicism, genomic imprinting or anomalous X inactivation, leading to difficulties in diagnosis and genetic counseling (Araújo and Ramos, 2008; Oliveira et al., 2009).

In conclusion, the patients with 45,X karyotype exhibited a tendency to have more severe phenotypes than those with mosaicism. Thus, our study confirms the association of higher morbidity with X-monosomy, showing that this karyotype plays an important role in the prognosis of Turner syndrome. Additionally, the presence of mental retardation in five of our patients associated with classical TS phenotype indicates that this mental disability could be an additional rare feature associated with TS and should be considered more carefully by physicians.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE – APQ-0335-2.02/06). The authors thank the patients, parents and clinicians for the data.

REFERENCES

- Araújo A, Ramos ES (2008). Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome. *Bras J Med Biol Res* 41: 368-372.
- Armstrong L, McGowan-Jordan J, Brierley K, Allanson JE (2003). De novo dup(X)(q22.3q26) in a girl with evidence that functional disomy of X material is the cause of her abnormal phenotype. *Am J Med Genet* 116: 71-76.
- Binkert F, Spreiz A, Höckner M, Miny P, von Dach Leu B, Erdel M, Zschocke J, Utermann G, Kotzot D (2010). Parental origin and mechanism of formation of a 46,X,der(X)(pter-->q21.1::p11.4-->pter)/45,X karyotype in a woman with mild Turner syndrome. *Fertil Steril* 94: 12-15.
- Bondy CA 2009. Turner syndrome (2008). *Horm Res* 1: 52-6.
- Burégio-Frota P, Valença L, Leal GF, Duarte AR, Bispo-Brito AV, Soares-Ventura EM, Marques-Salles TJ, Nogueira MT, Muniz MT, Silva ML, Hunstig F, Liehr T, Santos N (2010). Identification of a de novo inv dup(X)(pter--> q22) by multicolor banding in a girl with Turner syndrome. *Genet Mol Res* 9: 780-784.
- Cheng SF, Rauen KA, Pinkel D, Albertson DG, Cotter PD (2005). Xq chromosome duplication in males: clinical, cytogenetic and array CGH characterization of a new case and review. *Am J Med Genet* 135: 308-313.
- Davenport ML (2010). Approach to the patient with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1487-1495.
- Davison RM, Fox M, Conway GS (2000). Mapping of the POF1 locus and identification of putative genes for premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 6: 314–318.
- Djordjević VA, Jovanović JV, Pavković-Lučić SB, Drakulić DD, Djurović MM, Gotić MD (2010). Cytogenetic findings in Serbian patients with Turner's syndrome stigmata. *Genet Mol Res* 9: 2213-2221.
- El Abd S, Patton MA, Turk J, Hoey H, Howlin P (1999). Social, communicational and behavioral deficits associated with ring X Turner Syndrome. *Am J Med Genet* 88: 510-516.
- Elleuch M, Feki M, Kammoun M, M, Charfi N, Rekik N, Bouraoui A, Kammoun T, Belguith N, Kammoun H, Sfar MT, Hachicha M, Abid M (2010). Descriptive analyses of Turner syndrome: 49 cases in Tunisia. *Ann Endocrinol* 71: 111-116.
- Gravholt CH 2005. Clinical practice in Turner syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 1: 41-52.
- Held KR, Keber S, Kaminsky E Singh S, Goetz P, Seemanova E, Goedde HW (1992). Mosaicism in 45,X Turner syndrome: Does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* 88: 288-294.
- Hjerrild BE, Mortensen KH, Gravholt CH 2008. Turner syndrome and clinical treatment. *Br Med Bull* 86: 77-93.
- Kalscheuer VM, Musante L, Fang C, HoVmann K, Fuchs C, Carta E, Deas E, Venkateswarlu K, Menzel C, Ullmann R, Tommerup N, Dalpra L, Tzschach A, Selicorni A, Luscher B, Ropers HH, Harvey K, Harvey RJ (2009). A balanced chromosomal translocation disrupting ARHGEF9 is associated with epilepsy, anxiety, aggression, and mental retardation. *Hum Mutat* 30: 61-68.

- Kondo I, Hamaguchi H, Matsura A, Nakajima H, Nakajima H, Koyama A, Takita H (1979). A case of Turner's syndrome with familial balanced translocation t(1;2)(q32;q21)mat. *J Med Genet* 16: 321-323.
- Krajinovic M, Ivanovic K, Mestroni L, Diklic V, Diklic V, Nikolis J (1994). Parental origin of the X chromosome in a patient with a Robertsonian translocation and Turner's syndrome. *J Med Genet* 31: 255-256.
- Laszlo J, Bosze P, Gaal M, Toth A (1984). A case of 44,X streak gonad syndrome combined with familial balanced 13/14 translocation. *Acta Med Hung* 41: 223-227.
- Marzuki NS, Anggaratri HW, Suciati LP, Ambarwati DD, Paramayuda C, Kartapradja H, Pulungan AB, Harahap A (2011). Diversity of sex chromosome abnormalities in a cohort of 95 Indonesian patients with monosomy X. *Mol Cytogenet* 4: 23-30.
- Morgan T (2007). Turner syndrome: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 76: 405-410.
- Ogata T, Muroya K, Sasaki G, Nishimura G, Kitoh H, Hattori T (2002). SHOX nullizygosity and haploinsufficiency in a Japanese Family: implication for the development of Turner skeletal features. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1390-1394.
- Oliveira RM, Verreschi IT, Lipay MV, Eça LP, Guedes AD, Bianco B (2009). Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J*, 127: 373-378.
- Ozkul Y, Atabek ME, Dundar M, Kurtoglu S, Saatci C (2002). A Turner patient with a 45,X,t(1;2) (q41;p11.2) karyotype. *Ann Genet* 45: 181-183.
- Pienkowski C, Menendez M, Cartault A (2008). Syndrome de Turner et procréation. *Gynecol Obstet Fertil* 36: 1030-1034.
- Salamanca F, Buentello L, Sanchez J, Armendares S 1985. A patient with 44 chromosomes. *Ann Genet* 28: 130-132
- Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Higgins CD (2008). Mortality in women with turner syndrome in Great Britain: a national cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4735-4742.
- Silva AL, Lima RLLF, Ribeiro LA, Moretti-Ferreira D (2006). X monosomy and balanced Robertsonian translocation in a girl with Turner Syndrome. *Genet Mol Biol* 29: 47-48.
- Stankiewicz P, Thiele H, Schlicker M, Cseke-Friedrich A, Bartel-Friedrich S, Yatsenko SA, Lupski JR, Hansmann I (2005). Duplication of Xq26.2-q27.1, including SOX3, in a mother and daughter with short stature and dyslalia. *Am J Med Genet A* 138: 11-17.
- Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW, Gravholt CH (2006). Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3897-3902.
- Suzigan LZC, Silva RBP, Guerra AT (2005). Aspectos Psicossociais da Síndrome de Turner. *Arq Brás Endocrinol Metab* 49: 157-164.
- Sybert VP (2002). Phenotypic effects of mosaicism for a 47XXX cell line in Turner syndrome. *J Med Genet* 39: 217-221.
- Sybert VP, Mccauley E (2004). Turner's syndrome. *N Engl J Med* 351: 1227- 1238.
- Tan KB, Yeo GS 2009. Pattern of Turner syndrome in Singapore (1999-2004). *Singapore Med J* 50: 587-590.
- Vandeweyer G, Kooy RF (2009). Balanced translocations in mental retardation. *Hum Genet* 126: 133-147.

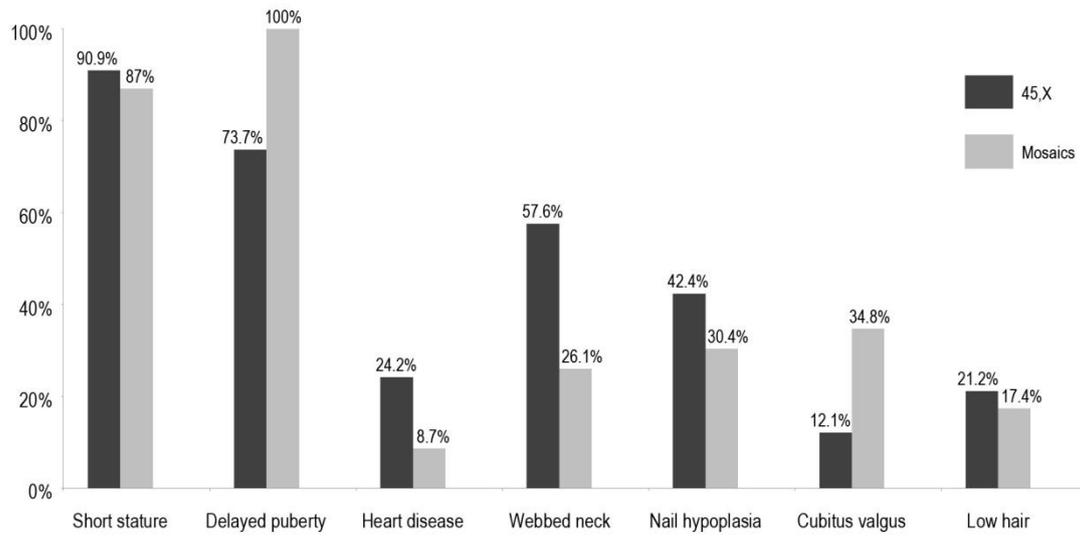


Figure 1. Distribution of the most prevalent clinical features according to karyotype constitution.

Table 1. Distribution of karyotypes associated with Turner syndrome

Karyotype	Number of patients	Frequency (%)
45,X	40	61.5%
Mosaics without structural changes		
45,X/46,XX	1	1.5%
45,X/47,XXX	1	1.5%
Mosaics with structural changes		
46,X,i(Xq)/45,X	11	16.9%
46,X,r(X)/45,X	2	3.1%
46,X,del(Xp)/45,X	1	1.5%
46,X,inv dup(Xq)/45,X	1	1.5%
45,X/46,X,+mar	1	1.5%
Mosaics with Y chromosome		
45,X/46,XY	3	4.6%
Structural change without mosaicism		
46,X,i(Xq)	4	6.2%
Total	65	100%

Table 2. Frequency distribution of age at the moment of chromosome analysis

Age	45,X	Other Karyotypes	All TS cases
0 – 2 years	39.5%	-	25%
3 – 8 years	2.7%	22.7%	10%
9 – 13 years	21%	18.2%	20%
14 – 17 years	21%	31.8%	25%
≥ 18 years	15.8%	27.3%	20%

10. Currículo Lattes

Luana Oliveira dos Santos
Curriculum Vitae

Janeiro/2013

Luana Oliveira dos Santos

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Luana Oliveira dos Santos

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Estudo do gene SHOX em pacientes com suspeita clínica de síndrome de Turner
Orientador: Neide Santos
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2006 - 2010** Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Sequências do cromossomo Y na síndrome de Turner e o risco de gonadoblastoma
Orientador: Neide Santos
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
-

Formação complementar

- 2012 - 2012** Curso de curta duração em VII Curso de Biologia Molecular.
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em I Curso de sequenciamento: Sequências e Análise de.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2012 - 2012** PRE-INTERMEDIATE ENGLISH.
SENAC PE, Recife, Brasil
-

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2006 - Atual Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Estudante , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

08/2008 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética

Linhas de pesquisa

1. Citogenética e Genética Humana

Projetos

Projetos de pesquisa

2011 - Atual ESTUDO DO GENE SHOX EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE SÍNDROME DE TURNER

Descrição: Este estudo terá como objetivo investigar a associação de deleções do gene SHOX com a baixa estatura e malformações esqueléticas em pacientes com suspeita clínica da Síndrome de Turner..

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Luana Oliveira dos Santos; Neide Santos (Responsável); Pollyanna Burégio-Frota; Adriana Valéria Sales Bispo; Gabriela Ferraz Leal ; Jacqueline Araújo ; Maria Tereza Cartaxo Muniz; Andréa Resende Duarte ; Juliana Vieira de Barros; Anna Theresa de Souza Liberal

Áreas de atuação

1. Genética
2. Genética Humana e Médica

Produção

Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação

1. BISPO, A. V. S., **SANTOS, L.O.**, BUREGIO-FROTA, P., GALDINO, M. B., DUARTE, A. R., LEAL, G. F., ARAUJO, J., GOMES, B., SOARES-VENTURA, E. M., MUNIZ, Maria Tereza Cartaxo, Santos, N.

Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype. Genetics and Molecular Research. , 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **SANTOS, L.O.**, Santos, N.

ESTUDO CITOGENÉTICO EM PACIENTES COM BAIXA ESTATURA E/OU MALFORMAÇÕES ESQUELÉTICAS In: II JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, 2012, Recife, Pernambuco.

II JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA. , 2012.

2. **SANTOS, L.O.**, BISPO, A. V. S., DUARTE, A. R., ARAUJO, J., Santos, N.

Estudo citogenético em pacientes em pacientes portadores de distúrbios da diferenciação sexual. In: XIX Encontro de Genética do Nordeste – ENGENE, Polo Petrolina/Juazeiro. I Simpósio de Genética Humana e Médica do Nordeste., 2012

XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Juazeiro/BA. XIX Encontro de Genética do Nordeste. 2012.

3. BISPO, A. V. S., **SANTOS, L.O.**, ARAUJO, J., GOMES, B., Santos, N.

Inversão pericêntrica do cromossomo 9 associada ao distúrbio de desenvolvimento sexual - Relato de caso. In: XIX Encontro de Genética do Nordeste – ENGENE, Polo Petrolina/Juazeiro. I Simpósio de Genética Humana e Médica do Nordeste., 2012

XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Juazeiro/BA. XIX Encontro de Genética do Nordeste. 2012.

4. **SANTOS, L.O.**, Santos, N.

ESTUDO DO GENE SHOX EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE SÍNDROME DE TURNER In: I JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, 2011, Recife, Pernambuco.

I JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA. , 2011.

5. BISPO, A.V.S., SILVA, H.A., **SANTOS, L.O.**, BUREGIO-FROTA, P., LEAL, G. F., RESENDE, A. D., ARAÚJO, J., MUNIZ, M. T. C., Santos, N.

Genetic polymorphism in folate metabolism may not represent an important risks factors for chromosome nondisjunction in Turner syndrome In: XL CONGRESSO ARGENTINO DE GENÉTICA, III SIMPOSIO LATINO AMERICANO DE CITOGENÉTICA Y EVOLUTION, 2011, Corrientes.

Journal of basic and Applied Genetics. Buenos Aires: Revista de la Sociedad Argentina de Genetica. 2011. v.XLI.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**, 2012. (Outra)

ESTUDO CITOGENÉTICO EM PACIENTES COM BAIXA ESTATURA E/OU MALFORMAÇÕES ESQUELÉTICAS.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIX Encontro de Genética do Nordeste – ENGENE, Polo Petrolina/Juazeiro. I Simpósio de Genética Humana e Médica do Nordeste.**, 2012. (Congresso)

Estudo citogenético em pacientes em pacientes portadores de distúrbios da diferenciação sexual..

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**, 2011. (Outra)

ESTUDO DO GENE SHOX EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE SÍNDROME DE TURNER.