



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em
Endocrinologia**

**AVALIAÇÃO DO GENE *SHOX* EM
PESSOAS COM BAIXA ESTATURA E
CARIÓTIPO NORMAL**

PRISCILLA NATASHA HALLIDAY S. PINHO

2023



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em
Endocrinologia**

**AVALIAÇÃO DO GENE *SHOX* EM
PESSOAS COM BAIXA ESTATURA E
CARIÓTIPO NORMAL**

Priscilla Natasha Halliday S. Pinho

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração em Endocrinologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Endocrinologia.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Marília Martins Guimarães

Rio de Janeiro, 2023

AVALIAÇÃO DO GENE *SHOX* EM PESSOAS COM BAIXA ESTATURA E CARIÓTIPO NORMAL

Priscilla Natasha Halliday S. Pinho

Orientação: Marilia Martins Guimarães

Maria Cecília Menks Ribeiro

Amanda Faria de Figueiredo Rodrigues da Silva

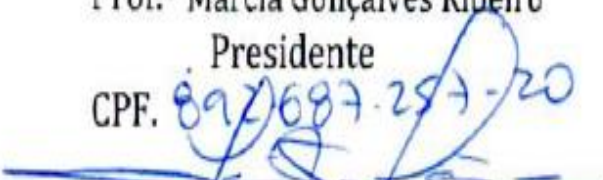
Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração em Endocrinologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Endocrinologia.

Aprovada por:



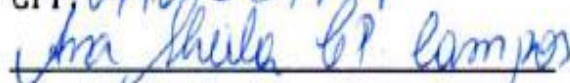
Prof.^a Marcia Gonçalves Ribeiro
Presidente

CPF. 892.687.257-20



Isaías Soares de Paiva

CPF. 074.025.894-04



Ana Sheila Cypriano Pinto Campos

CPF. 733.579.361-00

Rio de Janeiro, 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Pinho, Priscilla Natasha Halliday S.

Avaliação do Gene *Shox* em pessoas com baixa estatura e cariótipo normal.
/ Priscilla Natasha Halliday S. Pinho. – Rio de Janeiro: UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, 2023.

77 f. : il. ; 31 cm

Orientadoras: Marília Martins Guimarães, Maria Cecília Menks Ribeiro e Amanda Faria de Figueiredo Rodrigues da Silva

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (Endocrinologia), 2023.

Referências: f. 56-64.

1. Gene *Shox*. 2. Hibridização in Situ Fluorescente. 3. Cariótipo. 4. Endocrinologia – Tese. I. Guimarães, Marília Martins. II. Ribeiro, Maria Cecília Menks. III. Silva, Amanda Faria de Figueiredo Rodrigues da. IV. UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (Endocrinologia). V. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Andreia de Oliveira Paim CRB - 7/5183

Agradecimentos

A Deus, por me dar essa oportunidade de tamanho crescimento e conhecimento, não só de aprendizado, mas conhecimento pessoal também.

À minha mãe e avó por dedicarem tanto tempo a mim e me incentivarem. Obrigada por sonharem comigo e tornarem isso possível. Em especial minha vó Marluce, minha maior inspiração e motivação. Pessoa de quem tenho muito orgulho e que acredita em mim mais do que eu mesma.

Aos tios Valter e Nelson que, sempre que precisei, estavam disponíveis para me levar ao fundão; e toda minha família, irmãos, tias e primos, que viveram isso comigo, ficam felizes com minhas conquistas e me dão todo suporte que eu preciso. Principalmente minha prima Ariane que sempre me ajudou muito lendo, traduzindo coisas.

À orientadora Marília Martins Guimarães, por me acompanhar tantos anos e me dar essa oportunidade de crescimento e conhecimento. Encerro essa jornada sendo uma pessoa melhor comigo mesma graças a você e a sua generosidade, que me oportunizaram este trabalho.

À orientadora Maria Cecília Menks Ribeiro, que me acolheu e permitiu que eu fizesse a pesquisa. Obrigada por toda ajuda e disponibilidade quando precisei. Mesmo que estivesse passando por problemas, sempre se mostrou calma e paciente. Você é uma inspiração.

À orientadora Amanda Faria de Figueiredo, por aceitar o desafio de me orientar com o trabalho já em andamento, também sempre disponível e me atendendo até tarde da noite. Obrigada por todo suporte.

Aos funcionários do Laboratório de Genética do IPPMG, sempre tão solícitos, dispostos a ajudar e ensinar. Obrigada por todo suporte. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Um agradecimento especial à Monique, que esteve ao meu lado e me ensinou

muito durante todo esse tempo.

ABREVIACÕES

°C- grau celsius.

2xSSC-solução salina citrato concentrada 2 vezes.

ACCM- Atraso constitucional de crescimento e maturação.

aCGH- do inglês *array Comparative Genomic Hybridization* (Hibridação genômica comparativa por arranjo).

BEF- Baixa Estatura Familiar. BEI- Baixa Estatura Idiopática.

CASHOX- Microssatélite polimórfico, marcador da região Xp22.3.

CGH- do inglês *comparative Genomic Hybridization*, hibridização genômica comparativa.

CID- Classificação Internacional de Doenças.

DNA- do inglês *desoxirribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico. DP- Desvio padrão.

DLW- discondrosteose de Leri-Weill.

DXYS10092- microssatélite de repetição.

DXYS10093- microssatélite de repetição.

DXZ1- sonda centromérica de X

DYZ1- sonda centromérica de Y.

ECS- do inglês *evolutionary conserved sequences*, sequências conservadas evolutivamente.

FDA- do inglês *food and drug administration*, administração federal de alimentos e medicamentos.

FISH-do inglês *fluorescence in situ hybridization*, hibridização in situ por fluorescência. G2- do inglês *Gap 2*, fase da divisão celular subsequente a fase S (síntese).

GH- do inglês Growth Hormone, Hormônio de crescimento.

GASHOX- marcador da região Xp22.3.

GRCh 38/hg 38- anotação do genoma humano Referência genômica.

IPPMG- Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira.

ISCN- do inglês *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* .

Kb- kilobase- equivalente a 1000 pares de bases.

LSI- do inglês *locus specific*, sonda locus específica. M- Massa molar.

ml- mililitro.

Mb- megabase- equivalente a 1000000 de pares de bases.

MLPA- do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe*, amplificação multiplex de sondas dependente de ligação.

NAHR- do inglês *non allelic homologous recombination*, recombinação alélica não homóloga.

NHEJ- do inglês *non homologous end joining*, ligação terminal não homóloga.

OAR- Porção C-terminal da proteína.

PAR 1- região pseudo autossômica do braço curto dos cromossomos sexuais.

Pb- Pares de base.

PCR- do inglês *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia de polimerase.

RCCP- Retardo constitucional do crescimento e puberdade.

RCIU- Retardo de Crescimento Intrauterino.

rpm- rotações por minuto.

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute*.

RNA- do inglês *ribonucleic acid*, ácido ribonucléico.

SHOX- do inglês *Short Stature Homeobox Containing Gene*.

SPSS- do inglês *Statistical package for the Social Science*, pacotes estatísticos para ciências sociais.

ST- Síndrome de Turner.

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido.

TEA- Transtorno do espectro autista.

TH- do inglês *Target Height*, Estatura-alvo familiar.

μl- Microlitro.

UTR- do inglês *untranslated region*.

XYpter- sonda região terminal do braço curto dos cromossomos X e Y.

Resumo

AVALIAÇÃO DO GENE *SHOX* EM PESSOAS COM BAIXA ESTATURA E CARIÓTIPO NORMAL

Priscilla Natasha Halliday S. Pinho.

Orientação: Marilia Martins Guimarães; Maria Cecília Menks Ribeiro; Amanda Faria de Figueiredo Rodrigues da Silva.

Introdução: O crescimento linear é uma característica multifatorial complexa que envolve o potencial genético, sistema hormonal, status nutricional e psicológico. O diagnóstico adequado é importante para proporcionar o tratamento e orientação necessários, e também um grande desafio. A presença de duas cópias funcionais do gene *SHOX* é fundamental para o crescimento normal. Tanto a diminuição (haploinsuficiência) quanto o aumento no número de cópias funcionais do *SHOX* acarretam alterações significativas do crescimento. **Objetivo:** Avaliar o número de cópias do gene *SHOX*, através de FISH, em participantes com baixa estatura idiopática (BEI), que apresentaram cariótipo normal (46,XX ou 46,XY) na avaliação citogenética. Avaliar a hereditariedade da alteração quando detectada, pelo estudo dos progenitores. **Metodologia:** Estudo observacional, descritivo, transversal, do tipo série de casos. Amostra de conveniência composta de participantes com BEI, acompanhados nos Ambulatórios do Serviço de Endocrinologia e de Genética do IPPMG. Cultura de linfócitos para obtenção de cromossomos metafásicos, e análise através de FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) com sondas específicas em metáfases e núcleos interfásicos. **Resultados:** Foram avaliados 36 participantes (28 do sexo feminino e 8 do sexo masculino) com idade entre 1 e 16 anos atendidos no período de maio de 2013 a maio de 2022. Foram detectadas anomalias em 7 participantes (19,4%), todos do sexo feminino. Em 4 (57,1%) foi observada microdeleção do gene *SHOX* com cariótipo 46,XX. ish (DXZ1x2, SHOXx1). Em 3 (42,9%) foi observada microduplicação do gene *SHOX*, com cariótipo 46,XX. ish(DXZ1x2, SHOXx3). A hereditariedade foi verificada em 3 participantes com microdeleção, sendo 2 de origem paterna, com a deleção presente no cromossomo Y do progenitor, e 1 de origem materna. **Conclusão:** As alterações do *SHOX* constituem uma causa importante de BEI. A transmissão familiar foi observada em 3/4 microdeleções e não foi observada nas microduplicações, e quando identificada os familiares devem ser encaminhados para aconselhamento genético. Todas as participantes com alteração de *SHOX* apresentavam importantes manifestações

fenotípicas, incluindo alterações ósseas e articulares, dificuldade de mobilidade. Outras características fenotípicas, como microcefalia, macrocefalia, além de uma participante com artrite reumatoide também foram observadas.

Palavras chave: baixa estatura, gene *SHOX*, FISH, cariótipo.

Abstract

DETECTION OF CHANGES IN THE *SHOX* GENE IN CHILDREN WITH IDIOPATHIC SHORT STATURE.

Priscilla Natasha Halliday S. Pinho.

Guidance: Marilia Martins Guimarães; Maria Cecília Menks Ribeiro; Amanda Faria de Figueiredo Rodrigues da Silva.

Introduction: Linear growth is a complex multifactorial characteristic that involves genetic potential, hormonal system, nutritional and psychological status. Proper diagnosis is important to provide the necessary treatment and guidance, and also a great challenge. The presence of two functional specifications of the *SHOX* gene is essential for normal growth. Both the reduction (haploinsufficiency) and the increase in the number of specific *SHOX* lead to significant changes in growth. **Objective:** To evaluate the number of copies of the *SHOX* gene, through FISH, in participants with idiopathic short stature (ISS), who had a normal karyotype (46, XX or 46,XY) in cytogenetic evaluation. Assess the heritability of the change when detected, by studying the parents. **Methodology:** Observational, descriptive, cross-sectional, case series study. Convenience sample composed of participants with ISS, monitored at the Outpatient Clinics of the Endocrinology and Genetics Service of IPPMG. Culture of lymphocytes to obtain metaphase chromosomes, and analysis through FISH (*fluorescence in situ hybridization*) with specific probes in metaphases and interphase nucleus. **Results:** 36 participants were evaluated (28 females and 8 males) aged between 1 and 16 years, seen from May 2013 to May 2022. Anomalies were detected in 7 participants (19.4%), all female. In 4 (57.1%) a microdeletion of the *SHOX* gene with 46,XX karyotype was observed. ish (DXZ1x2, SHOXx1). In 3 (42.9%) microduplication of the *SHOX* gene was observed, with karyotype 46,XX.ish(DXZ1x2, SHOXx3). Heritability was verified in 3 participants with microdeletion, 2 of which were of paternal origin, with the deletion present on the progenitor's Y chromosome, and 1 of maternal origin. **Conclusion:** *SHOX* gene are specifically an important cause of ISS. Familial transmission was observed in 4 microdeletions and was not observed in microduplications, and when identified, family members should be referred for genetic counseling. All participants with *SHOX* alterations presented important phenotypic manifestations, including bone and joint changes and mobility difficulties. Other phenotypic characteristics, such as microcephaly, macrocephaly, as well as

a participant with rheumatoid arthritis were also observed.

Keywords: short stature, *SHOX* gene.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática dos cromossomos sexuais. Página 22

FIGURA 2: Estrutura e expressão do gene *SHOX*. Página 23

FIGURA 3: Representação esquemática da posição das sondas nos cromossomos X e Y. Página 39

FIGURA 4: Microfotografias em microscopia de fluorescência. Página 41

FIGURA 5: Fluxograma. Página 43

FIGURA 6: Comparação da altura do escore z entre participantes de baixa estatura com alteração citogenética e sem alteração citogenética detectável. Página 45

FIGURA 7: Comparação entre o escore z de participantes com baixa estatura sem alteração no gene *SHOX* detectada por FISH, participantes com deleção no gene *SHOX* e participantes com duplicação no gene *SHOX*. Página 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Distribuição da frequência (n), média (\bar{X}), desvio padrão (DP), mediana (Med), valores máximos (Máx) e mínimos (Min) das idade e escore z dos participantes. Página 44

Tabela 2- Distribuição da idade, escore z, presença de malformação de Madelung (Mad) alteração do gene *SHOX* e relação com a herança de seus progenitores Paterna (P) ou Materna (M). Página 44

Tabela 3 – Distribuição das alterações do gene *SHOX* nas participantes e seus progenitores. Página 47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	BAIXA ESTATURA	20
1.2	GENE <i>SHOX</i>	21
1.2.1.	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO GENE <i>SHOX</i>	23
1.2.2.	REGULAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE <i>SHOX</i>	25
1.2.3.	FUNÇÃO DA PROTEÍNA <i>SHOX</i>	26
1.2.4.	CONSEQUÊNCIAS FENOTÍPICAS DAS ALTERAÇÕES DO GENE <i>SHOX</i>	28
1.2.5.	ALTERAÇÕES DO GENE <i>SHOX</i>	30
1.2.6.	AVALIAÇÃO POPULACIONAL DO GENE <i>SHOX</i>	34
1.2.6.1.	FISH- HIBRIDIZAÇÃO IN SITU POR FLUORESCÊNCIA	36
2.	OBJETIVO GERAL	37
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	METODOLOGIA	38
3.1	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	38
3.2	TIPO DE ESTUDO	38
3.3	LOCAL DE ESTUDO	38
3.4	AMOSTRA	38
3.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	38
3.6	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	38
3.7	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	39
3.7.1	CULTURA DE LINFÓCITOS E OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS	39
3.7.2	ESTUDO CITOGÉNÉTICO MOLECULAR	39
3.7.3	CRITÉRIO DE ANÁLISE	40
3.7.4	COLETA E ANÁLISE DOS DADOS	44
4	RESULTADOS	45
4.2	AMOSTRA ESTUDADA	45
4.3	AVALIAÇÃO CITOMOLECULAR E FENOTÍPICA	45
4.4	HEREDITARIEDADE	47
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÕES	55
7	SUGESTÕES E LIMITAÇÕES	57

8 BIBLIOGRAFIA	58
ANEXOS	67
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.	67
APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	70
APÊNDICE 2 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS PARTICIPANTES COM ALTERAÇÃO <i>SHOX</i>.....	75
GLOSSÁRIO	77

1 INTRODUÇÃO

O crescimento linear é uma característica multifatorial complexa que envolve o potencial genético, sistema hormonal, status nutricional e psicológico. A regulação pré-natal do crescimento e o déficit de crescimento não são totalmente compreendidos (FINKEN *et al.* 2018). Assim, a baixa estatura requer uma abordagem diferenciada, especialmente na infância (ASSIS *et al.* 2006).

O diagnóstico adequado é importante para proporcionar o tratamento e orientação necessários (ESTER *et al.* 2009), constitui também um grande desafio. É comum a avaliação clínica ser feita com auxílio de recursos tradicionais, como radiografia e exames laboratoriais, que no entanto nem sempre são capazes de identificar a causa da baixa estatura (FREIRE *et al.* 2019).

A avaliação genética de indivíduos com baixa estatura extrema, vem identificando um número crescente de genes que influenciam o crescimento, de forma a identificar variantes genômicas causais. A avaliação sistemática de crianças com baixa estatura contribui para a agilidade no diagnóstico e aconselhamento genético, decisões sobre o tratamento com hormônio GH e acompanhamento do participante. Nas meninas, a abordagem inicial indicada é a avaliação cromossômica, sendo que em todas as meninas com baixa estatura a possibilidade de Síndrome de Turner deve ser afastada (MARTÍN- BEGUÉ *et al.*, 2021). Em meninos, a baixa estatura não é indicação para estudo cromossômico (CENSANI *et al.* 2013).

A investigação do gene *SHOX*, é uma das formas de elucidar a etiologia de baixa estatura em indivíduos com cariótipo normal.

A partir deste diagnóstico, é possível uma orientação clínica mais precisa, oferecendo uma resposta ao participante e um tratamento adequado. Isso tem repercussão favorável na melhor qualidade de vida, não só física, mas psicológica também, visto que a baixa estatura pode levar a uma baixa autoestima e afetar a qualidade de vida da pessoa (PORTES *et al.* 2008).

Conhecer a causa genética para a alteração no crescimento, se faz muito importante para orientar o tratamento adequado, visto que algumas condições genéticas o uso de hormônio de crescimento pode aumentar o risco de câncer (FREIRE *et al.* 2019). A baixa estatura decorrente de alterações do gene *SHOX* apresenta boa resposta ao tratamento com hormônio de crescimento (GH). Assim, é crucial a identificação precoce viabilizando a

terapêutica (MARCHINI *et al.* 2004).

Ademais, a ausência de diagnóstico é angustiante, cada exame sem resposta é frustrante. Sendo assim, além do tratamento adequado também se obtém bem-estar psicológico dos participantes, pois é uma forma de se conhecer e se aceitar.

O presente estudo busca aprimorar a assistência realizada, de forma preencher esta lacuna, e ampliar o conhecimento sobre a prevalência, repercussão fenotípica e hereditariedade desta condição.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 BAIXA ESTATURA

O conceito de baixa estatura é definido em termos populacionais, em cerca de 3% das crianças que apresentam estatura com -2 ou mais desvios padrão (-2 DP) abaixo da média populacional para idade e sexo (MARTINS *et al.* 2003).

O crescimento normal transcorre de forma não linear. Existem períodos de aceleração e redução de sua velocidade, sendo observado um padrão similar na população. O crescimento estatural apresenta um padrão de herança multifatorial onde fatores genéticos e ambientais interagem, sendo muito suscetível aos efeitos sociais, econômicos e ambientais. Crescer de forma adequada é indicativo de um bom estado de saúde, portanto, as alterações do padrão de normalidade são suspeitas, e devem ser investigadas para identificar a presença de algum distúrbio (ASSIS; CONCEIÇÃO; BARRETO, 2006).

A etiologia da baixa-estatura compreende anormalidades genéticas, fatores maternos/fatores uterinos e fatores epigenéticos (FINKEN *et al.* 2018).

Considera-se baixa estatura idiopática (BEI), quando há déficit de dois ou mais desvios padrão da altura correspondente para a idade, e ausência de doenças sistêmicas, endócrinas (por exemplo, deficiência de GH, síndrome de Cushing, hipotireodismo), alterações nutricionais, displasia esquelética evidente, ou outras síndromes genéticas, como as Síndromes de Noonan, Prader-Willi e Silver-Russell (STRITAR *et al.* 2021). É um termo genérico utilizado para designar um grupo heterogêneo de indivíduos com baixa estatura, sem etiologia identificada na investigação. Na Classificação Internacional de Doenças Endócrinas Pediátricas, a BEI é subdividida em familiar e não familiar (COSTA *et al.* 2014), é portanto um diagnóstico de exclusão, nele se podendo incluir casos de atraso constitucional de crescimento e maturação (ACCM) e de baixa estatura familiar (BEF) (SALMON-MUSIAL *et al.* 2011).

Os defeitos genéticos associados a baixa estatura incluem tanto anomalias cromossômicas como alterações em genes individuais. Anomalias cromossômicas numéricas e estruturais, principalmente as que envolvem os cromossomos sexuais (síndrome de Turner), estão frequentemente associadas à baixa estatura (GRANGER, *et al.* 2016).

Com a implementação de técnicas diagnósticas moleculares, como o FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) (PINKEL *et al.* 1988), foi possível identificar síndromes causadas por microduplicação ou microdeleção de regiões cromossômicas

(WOLTERS *et al.* 2013). Estas alterações resultam no ganho ou perda de material genético, e muitas delas acarretam distúrbios de crescimento, ocasionando um progresso significativo na descoberta das causas da baixa estatura (VASQUES *et al.* 2019).

1.2 GENE *SHOX*

Nos últimos anos, estudos genéticos em pacientes com baixa estatura evidenciaram variantes patogênicas em heterozigose do gene *SHOX* (haploinsuficiência) em 2,5-15% das crianças. Estas crianças apresentam fenótipos que variam da BEI a discondrosteose de Leri-Weill (DLW) (BENITO-SANZ *et al.* 2006). A DLW (OMIM #127300) é uma condição caracterizada pela baixa estatura, deformidade de Madelung (quando ocorre fechamento ósseo prematuro, levando a uma anormalidade bilateral característica nos pulsos), rádio encurvado, e ulna deslocada. Pacientes com haploinsuficiência de *SHOX* podem ser beneficiados com terapia com Hormônio do Crescimento Humano Recombinante (LERI *et al.* 1929).

Considerando a frequência relativamente elevada das alterações do gene *SHOX*, e suas implicações clínicas, sua avaliação vem se mostrando essencial em crianças com baixa estatura. A detecção de anomalias neste gene caracteriza a etiologia de baixa estatura, e a avaliação familiar permite caracterizar a hereditariedade e reconhecimento antecipado de casos adicionais nas famílias afetadas (ESTER *et al.* 2009).

A observação de que as perdas terminais dos braços curtos dos cromossomos sexuais X e Y acarretam baixa estatura, sugeriu que esta região poderia conter um ou mais genes críticos para o crescimento ponderal (BINDER *et al.* 2011).

Esta região denominada PAR 1 (região pseudo autossômica 1), é uma região de homologia entre os cromossomos X e Y, e local onde ocorre intensa recombinação na meiose (STRITAR *et al.* 2021).

Rao *et al.* (1997), por meio de estudos de mapeamento de indivíduos com monossomia parcial da PAR1, conseguiram delimitar um segmento 170 kb como região crítica para a altura, e identificaram nessa região um gene, que foi denominado *SHOX* (Short Homeobox-containing gene on chromosome X) (RAO *et al.* 1997; MÜSEBECK *et al.* 2001).

O gene *SHOX* (OMIM#312865), está localizado na região pseudoautossômica (PAR1) dos braços curtos dos cromossomos X (Xp22.3) e Y (Yp11.3), nas posições genômicas *chrX:624,344-659,411* e *chrY:624,344-659,411* (GRCh38/hg38)(FIGURA 1)

(CENSANI *et al.* 2013).

Dos 24 genes presentes na região PAR1, apenas o gene *SHOX* está explicitamente associado a um fenótipo patológico (HIRSCHFELDOVA *et al.* 2017).

O gene *SHOX* escapa da inativação do cromossomo X. Assim, tanto indivíduos com complemento XX, quanto XY possuem duas cópias ativas de *SHOX* (SADLER *et al.* 2020).

A presença de duas cópias funcionais do gene *SHOX* é fundamental para o crescimento normal. Tanto a diminuição (haploinsuficiência) quanto o aumento no número de cópias funcionais do *SHOX* acarretam alterações significativas do crescimento (ALEXANDER *et al.* 2008).

O gene *SHOX* é altamente conservado evolutivamente. Diversas espécies de vertebrados possuem ortólogos com grande homologia, incluindo chimpanzé, galinha, sapo e zebrafish, mas está ausente em roedores (WOOLFE *et al.* 2004). O gene *SHOX* codifica uma proteína nuclear que atua como um fator de transcrição importante no desenvolvimento dos membros (FUKAMI; SEKI; OGATA, 2016).

As deficiências no gene *SHOX* podem ser decorrentes de uma grande variedade de defeitos moleculares, como microdeleções e microduplicações de segmentos cromossômicos, verificando-se também mutações intragênicas em diferentes posições do gene (AUGER *et al.* 2016; VERDIN *et al.* 2016). Além da região codificante, as alterações podem se situar nas sequências *upstream* ou *downstream* da região PAR1 (VERDIN *et al.* 2016).

As anomalias do gene *SHOX* são encontradas mais frequentemente em mulheres, sugerindo que o gene *SHOX* no cromossomo X poderia ser mais suscetível a alterações (OLIVEIRA; ALVES, 2011), ou então as alterações no cromossomo X são reportadas com maior frequência do que as alterações no cromossomo Y (LEE *et al.* 2021).

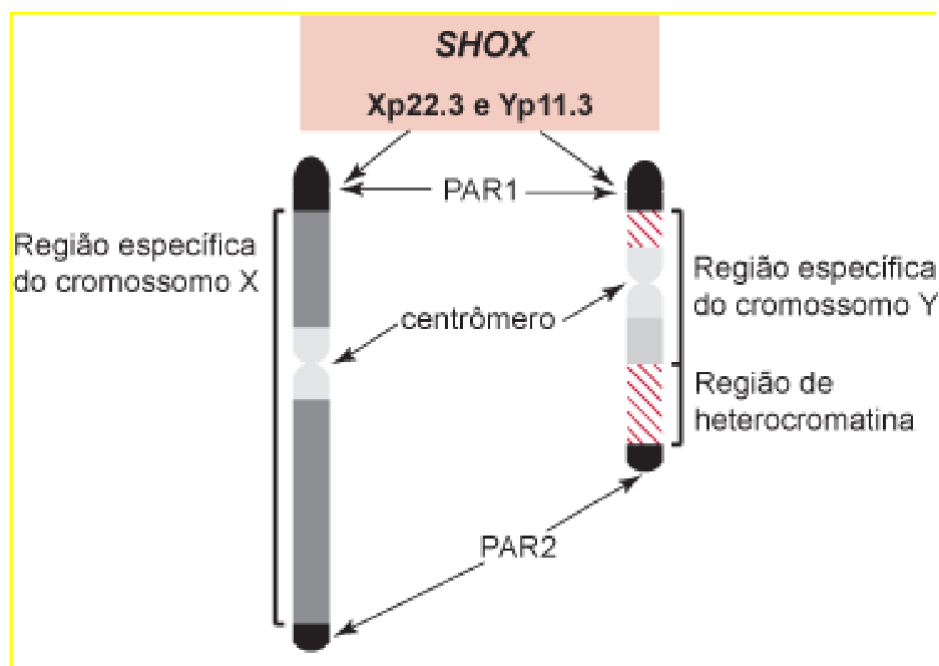


FIGURA 1: Representação esquemática dos cromossomos sexuais com a localização da região PAR1 e do gene *SHOX* (Fonte: Modificado de JORGE *et al.* 2008).

1.2.1. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO GENE *SHOX*

O gene *SHOX* (FIGURA 2) compreende 35.068 pb, e possui sete exons, cinco introns, e três regiões não transcritas (5'UTR; *SHOXa* – 3'UTR; *SHOXb* - 3'UTR), e 11 regiões regulatórias (CNE-2, CNE-3, CNE-5, CNE2, CNE3, CNE4, CNE5, CNE6, CNE7, CNE8, CNE9). A integridade de todas estas regiões é fundamental para a expressão correta do gene, e tradução da proteína correspondente (SPURNA *et al.* 2022).

A região codificante compreende 6 exons, e produz um transcrito de 3757 bases, que codifica uma proteína de 292 aminoácidos- *SHOXa*, e outro transcrito de 1951 bases que codifica uma proteína de 252 aminoácidos- *SHOXb* (VASQUES; ANDRADE; JORGE, 2019). Ambos transcritos incluem os exons 1-5, mas diferem no último exon: *SHOXa* não tem o exon 7, enquanto *SHOXb* não tem o exon 6 (FIGURA 2C). Outros mRNAs adicionais foram identificados, mas se expressam fracamente na maioria dos tecidos e seus efeitos não são conhecidos (BINDER; RAPPOLD, 1993; OLIVEIRA; ALVES, 2011).

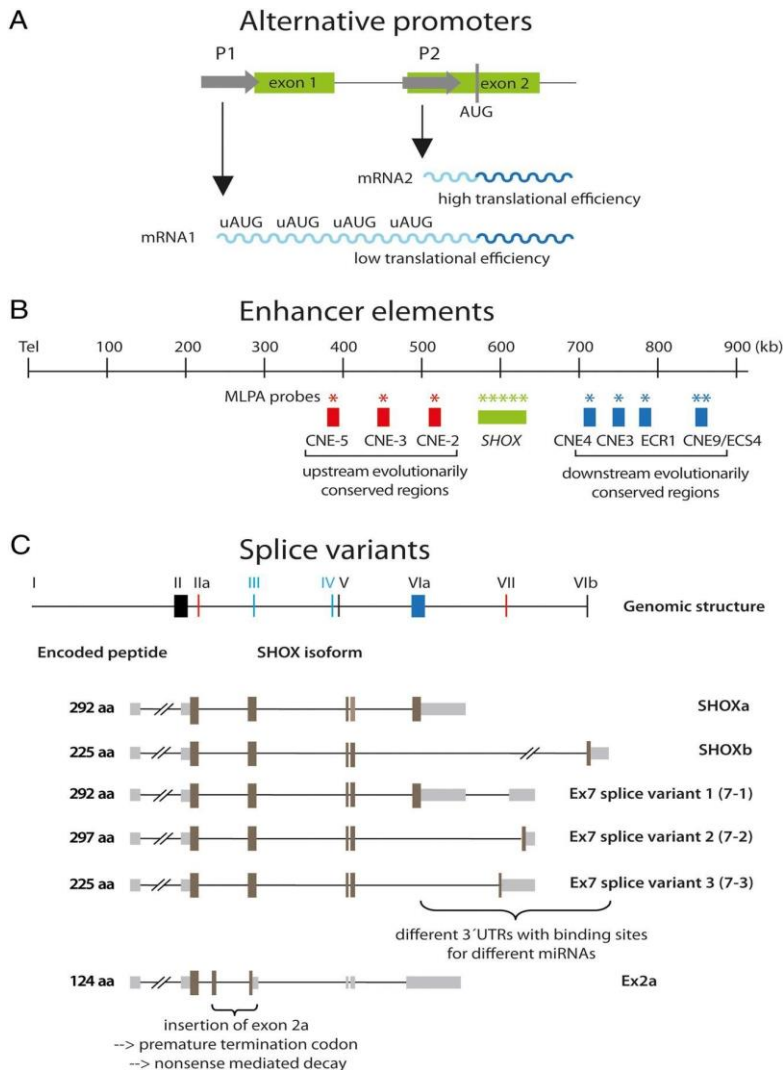


FIGURA 2: Estrutura e expressão do gene *SHOX*.

A) dois promotores alternativos P1 e P2 controlam a expressão do gene *SHOX* (estes promotores produzem transcritos que diferem na 5'-UTR: P1 produz transcritos com sete códon AUG não traduzidos, enquanto transcritos P2 não possuem estes elementos regulatórios. Os dois tipos de mRNA são traduzidos com eficiência diferencial contribuindo para o ajuste fino da regulação dos níveis e especificidade tissular da expressão). B) Elementos intensificadores (potenciadores) regiões conservadas evolutivamente em PAR1 identificadas em diferentes estudos (CNE- elementos de DNA não codificante altamente conservados evolutivamente, ECR- região conservada evolutivamente, ECS- sequência conservada evolutivamente). A linha horizontal superior indica a distância física do telômero Xp/Yp. hg19,build37). C) Transcritos alternativos. O acréscimo do exon VII pode ocorrer tanto diretamente na sequência do exon 5, se tornando portanto parte da janela de leitura, ou alongando a 3'-UTR do transcrito. As diferentes extremidades 3'-UTR podem estar sujeitas a regulação alternativa mediada por micro-RNAs. A inserção do exon 2a acarreta um códon de terminação prematuro no exon 3, o que pode causar degradação prematura do RNA. Os éxons III e IV contém o homeobox. Cinza- claro- regiões não transcritas, cinza-escuro- janela de leitura (Fonte: modificado de MARCHINI; OGATA; RAPPOLD, 2016).

1.2.2. REGULAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *SHOX*

A expressão de qualquer gene se inicia com a sua transcrição. A transcrição é um processo complexo de síntese de pré-RNA a partir de um segmento de DNA. A transcrição se inicia com a ligação da RNA polimerase II ao DNA. Esta ligação ocorre na região 5'UTR do gene, numa sequência característica denominada promotor. A fita de DNA é utilizada como molde para o ordenamento dos nucleotídeos no pré-RNA. A RNA polimerase se move ao longo do DNA até atingir a 3'UTR, que contém a sequência de terminação reconhecida pela polimerase. Este pré-RNA contém exons e introns e as UTRs. Após a transcrição o pré-RNA é editado através de um processo denominado *splicing* no qual os introns e alguns exons são removidos, diferentes transcritos do gene podem ter segmentos diferentes do pré-RNA com quantidade diferente de exons ou os mesmos exons em ordem diferente. Após o *splicing do mRNA* é transportado para o citoplasma e traduzido em proteínas. As UTR e alguns exons não são traduzidos, mas sua presença é importante para o sucesso da tradução (DAY *et al.* 2009).

A transcrição do gene é controlada por diversos elementos do genoma, contíguos ou distantes da região transcrita. Os elementos reguladores podem ser intensificadores (potenciadores) ou repressores. Estes elementos são essenciais para o controle da expressão gênica possibilitando modular a expressão em diferentes quantidades e tecidos. Estes elementos são altamente conservados evolutivamente, ocorrendo mesmo em espécies distantes filogeneticamente, como galinha e peixe- paulistinha (zebrafish), e são denominados elementos conservados não-codificantes (CNE) (NOWOSAD *et al.* 2020).

A regulação do gene *SHOX* é complexa, foram identificados dois promotores, e ao menos duas isoformas de mRNA, gerando duas classes de transcrito, que codificam proteínas com diferentes padrões de expressão (BLASCHKE *et al.* 2003; SANTOS, 2013). Como na maioria dos genes de desenvolvimento, a região promotora mínima do gene *SHOX* não é suficiente, e requer a complementação de elementos da região cis- reguladora como potenciadores (NOWOSAD *et al.* 2020).

No gene *SHOX* foram identificados três elementos 5' (*upstream*) (CNE-2, CNE-3, CNE-5), e oito elementos 3' (*downstream*) (CNE2, CNE3, CNE4, CNE5, CNE6, CNE7, CNE8, CNE9) (HOMMA *et al.*, 2018). Admite-se que a região regulatória de *SHOX* compreende ~1Mb de PAR1 e alterações nesta região também podem acarretar consequências fenotípicas (VERDIN *et al.* 2016).

O gene *SHOX* é expresso intensamente nos fibroblastos da medula, e amplamente expresso nos membros, arcos faríngeos e células osteogênicas (RAPPOLD *et al.* 2002). Além dos tecidos relacionados ao crescimento, em embriões, o mRNA foi detectado em músculos, pele e diversos outros tecidos, incluindo cérebro, cordão espinhal, olho, meninges, cerebelo, tálamo e gânglio basal de embriões e fetos. Em adultos, a expressão do gene *SHOX* foi detectada na medula óssea, tecido adiposo, placenta e músculo esquelético, bem como tálamo, cerebelo e córtex frontal (DECKER *et al.* 2011).

Estudos em embriões humanos, através de hibridação *in situ*, evidenciaram um padrão de expressão de *SHOX* restrito temporal e espacialmente. Observou-se a expressão nos membros em desenvolvimento, como uma faixa larga através da parte mediana do membro, detectada no Estágio de Carnegie 14 (CS), o que corresponde a aproximadamente 5 semanas da concepção. Durante a condensação e condrificação a expressão se torna mais pronunciada ao redor do espessamento pré-cartilaginosa do cotovelo, quando diversos ossos do braço começam a ser identificados (CS21), a expressão de *SHOX* permanece confinada na porção mediana do braço, ao redor das terminações distais do úmero, rádio e ulna e pode também ser encontrado em alguns ossos do punho. Analogamente, nos membros inferiores, o padrão da hibridação *in situ* se parece com o padrão observado no desenvolvimento dos membros superiores. O gene *SHOX* também se expressa nos primeiro e segundo arcos faríngeos que dão origem a maxila e mandíbula e alguns ossos do ouvido (CLEMENT-JONES *et al.* 2000).

1.2.3. FUNÇÃO DA PROTEÍNA SHOX

O gene *SHOX*, como os demais genes Homeóticos, codifica proteínas que desempenham papel importante durante a embriogênese e desenvolvimento, regulando a morfogênese e a organogênese. A proteína SHOX pode funcionar tanto como ativador ou como repressor transcricional, controlando a expressão temporal e espacial de diversos genes alvo (MARCHINI *et al.* 2004).

O padrão de expressão do gene *SHOX*, que é observado nos membros em desenvolvimento e arcos faríngeos de embriões humanos, sugere tratar-se de um gene fundamental para o desenvolvimento ósseo (JORGE *et al.* 2008).

A proteína SHOXa é amplamente expressa, enquanto a SHOXb é expressa predominantemente na medula óssea, e resulta de splicing alternativo. (CLEMENT-JONES *et al.* 2000). A proteína SHOXb, não apresenta a porção C-terminal completa, sendo inativa como fator de transcrição. (CHIANESE *et al.* 2013).

Alinhamentos comparativos da sequência de aminoácidos, caracterizaram *SHOX* como um membro dos genes homeóticos (Paired-like type of homeobox-containing genes) (ELLISON, 1997; RAO *et al.* 1997). Esta família de genes, codifica fatores de transcrição contendo um domínio de 60 aminoácidos característico de ligação ao DNA denominado homeodomínio. Diversos genes homeóticos desempenham papel crítico durante a embriogênese e desenvolvimento e são finamente regulados espacialmente e temporalmente em vertebrados e invertebrados (GEHRING *et al.* 1994; RAO *et al.* 1997).

A proteína *SHOX* contém 3 domínios característicos: um homeodomínio, um domínio de ligação SH3, e um domínio OAR (orthopedia aristaless rax) composto por 14 aminoácidos na região C terminal. A maioria das mutações identificadas localizam-se no domínio homeobox, que inclui os exons 3 e 4. O domínio OAR é essencial para a transativação. O homeodomínio é o mediador de suas funções chave que incluem a localização nuclear, ligação ao DNA e interações proteína-proteína. A formação de dímero *SHOX-SHOX* é necessária para melhor atividade. Assim, mutações nesta região podem impactar estes processos e acarretar defeitos esqueléticos (GURSOY *et al.* 2020). A proteína *SHOX* está envolvida no desenvolvimento esquelético pré e pós-natal, regulando a diferenciação e apoptose dos condrócitos na placa de crescimento epifiseal (MARCHINI *et al.* 2004).

Marchini *et al.* (2004) utilizaram diversas metodologias, incluindo técnicas de citometria de fluxo, western blot e imunohistoquímica, para avaliar a expressão do gene *SHOX* na placa de crescimento humano. Observaram que a expressão do *SHOX* acarreta a parada do ciclo celular e apoptose dos condrócitos.

A haploinsuficiência acelera a fusão da cartilagem epifisária, resultando na parada prematura do crescimento. Embora ainda não esteja claro o papel preciso de *SHOX* no desenvolvimento dos condrócitos, acredita-se que retarda a fusão das cartilagens durante o crescimento (BINDER *et al.* 2004).

A menor quantidade da proteína *SHOX*, permite a expressão de genes osteogênicos durante a diferenciação osteoblástica, levando a inibição do processo de apoptose das células (XU *et al.* 2020), gerando a inibição do estirão puberal (VANNELLI *et al.* 2020). Também pode favorecer o desenvolvimento de osteossarcoma (XU *et al.*, 2020). Além disso, a proteína *SHOX* funciona como ativadora da transcrição de diversos genes, incluindo o peptídeo natriurético B (NPPB), e repressora de outros genes como o receptor de fator de crescimento de fibroblasto 3 (FGFR3) (DECKER *et al.* 2011).

Assim, as mutações de perda de função do gene *SHOX* afetam o crescimento

esquelético de maneira dose-dependente (MUNNS *et al.* 2004). Sua haploinsuficiência acarreta uma redução de mais de 10 cm da altura final (HATTORI *et al.* 2021).

Evidências clínicas sugerem que a proteína SHOX pode agir conjuntamente com estrogênio e receptor de fator de crescimento 3 de fibroblastos (FGFR3) para o controle da diferenciação de condrócitos na placa de crescimento (DECKER *et al.* 2011), sendo essencial para o crescimento e maturação dos ossos nos membros superiores e inferiores (LEE *et al.* 2021).

Estudos feito por Tukiainen *et al.* (2017) verificou que os níveis de transcritos de vários genes da região PAR1 eram menores nos tecidos femininos em relação aos tecidos masculinos, o que poderia estar relacionado à diferença ponderal entre os sexos.

Outro fator que pode influenciar a atividade da proteína SHOX, é a ausência de fosforilação, que leva a uma alteração na regulação da transcrição, eliminando a capacidade da proteína de induzir a parada do ciclo celular e apoptose (SANTOS, 2013).

1.2.4. CONSEQUÊNCIAS FENOTÍPICAS DAS ALTERAÇÕES DO GENE SHOX.

O *SHOX* é um gene importante no processo de crescimento é, sabe-se que ele está envolvido no desenvolvimento esquelético, formação óssea e crescimento linear. Indivíduos portadores de alterações em *SHOX* apresentam BEI e anormalidades no desenvolvimento ósseo. Seu fenótipo é parecido com o da síndrome de Turner, podem apresentar também discondrosteose de Leri-Weill (DLW), ou displasia mesomélica de Langer (DML) (MARCHINI *et al.* 2004).

O fenótipo associado com mutações em heterozigose de *SHOX* é muito amplo, observando-se desde baixa estatura sem achados radiológicos, até baixa estatura desproporcionada com deformidade de Madelung. A penetrância da haploinsuficiência de *SHOX* é elevada, e sua expressão é variável. Os achados clínicos podem ser marcadamente diferentes mesmo entre membros da mesma família que compartilham o mesmo defeito genético (AUGER *et al.* 2016; LUCCHETTI *et al.* 2018).

A gravidade da baixa estatura é variável, podendo apresentar uma deficiência grave de crescimento até uma altura dentro da faixa normal (FAIENZA *et al.* 2021).

Com relação aos fenótipos, podem apresentar-se mais discretos, semelhantes à baixa estatura idiopática, especialmente em crianças pré-púberes (COSTA *et al.* 2014).

A expressão clínica das alterações do gene *SHOX* podem se manifestar mais tardiamente, se tornando mais evidentes com a idade (GÜRISOY *et al.* 2020; SADLER *et al.*

2020). Os achados clínicos e radiológicos incluem: quarto metacarpo curto, micrognatia e hipertrofia muscular, e são mais intensos no sexo feminino (DEL PINO *et al.* 2019).

Com isso, pode-se dizer que o diagnóstico de haploinsuficiência de *SHOX*, é particularmente desafiador na idade pré-escolar, quando a desproporção mesomélica e deformidade de Madelung ainda podem estar ausentes (VANNELLI *et al.* 2020).

A haploinsuficiência do gene *SHOX* também pode estar associada à etiopatogenia das alterações esqueléticas observadas na Síndrome de Turner, como palato ogival, quarto metacarpo curto e cúbito valgo (MARTINS *et al.* 2003).

Algumas características fenotípicas estão associadas ao sexo. Em meninas, a deformidade de Madelung é associada mais frequentemente às deleções do que às duplicações. O encurtamento mesomélico, ou sinais radiológicos de discondrosteose, porém, não são estatisticamente significativas em meninos (AUGER *et al.* 2016). Isso pode ser decorrente da diferença nos níveis de estrogênio. Em meninas, foi observado que os defeitos ósseos se tornam mais acentuados na puberdade (LEKA *et al.* 2006).

A perda de audição é algo raro, Gursoy *et al.* (2020), encontraram dois participantes da mesma família com perda auditiva bilateral.

O desenvolvimento puberal e fertilidade geralmente são normais em ambos os sexos (ROSS; SCOTT, 2015).

1.2.4.1. ANOMALIAS ASSOCIADAS A DUPLICAÇÕES DE *SHOX*

Enquanto as deleções de *SHOX* estão associadas a DLW e baixa estatura, as duplicações apresentam uma amplitude fenotípica maior, sendo observadas em indivíduos com baixa estatura, DLW, síndrome de Mayer-Rokitansky-Huster-Hauser, pé torto congênito, transtornos do espectro autista (TEA) e outras condições com alteração do neurodesenvolvimento (GERVASINI *et al.* 2010; GURSOY *et al.* 2020; RAMIREZ *et al.* 2019; SADLER *et al.* 2020; TROPEANO *et al.* 2016).

A microduplicação do gene *SHOX* foi verificada em 1% dos pacientes com pé torto congênito, sendo consistente com as anormalidades anatômicas descritas anteriormente em pacientes com pé torto. Esta anormalidade é mais comum em meninos, sendo observado que 3 em cada 4 pacientes com essa anomalia são do sexo masculino (SADLER *et al.* 2020).

Em 2010, Gervasini *et al.* relataram duas irmãs com Síndrome Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser e microduplicação do gene *SHOX*. Esta anomalia é pouco comum, caracterizada pela aplasia de útero e vagina em meninas com cariótipo 46,XX (PONTECORVI *et al.* 2021).

As microduplicações no locus *SHOX* são consideradas também um fator de risco, de baixa penetrância, para condições como distúrbios do espectro autista e doenças do neurodesenvolvimento, com risco aumentado em ambos os sexos. Algumas isoformas de *SHOX* são expressas exclusivamente no cérebro fetal, e podem refletir o efeito patogênico de alteração da dosagem da proteína *SHOX* no neurodesenvolvimento. A alteração do gene *SHOX* foi encontrada em um número significativo de pacientes com TEA. Nestes indivíduos houve diversidade da região envolvida e localização dos pontos de quebra (TROPEANO *et al.* 2016).

1.2.5. ALTERAÇÕES DO GENE *SHOX*

Após a caracterização da associação de alterações do gene *SHOX* e baixa estatura, foram realizados extensivos estudos clínicos e moleculares em pacientes com baixa estatura síndrômica e não síndrômica, utilizando diversas abordagens metodologias (MARCHINI *et al.* 2007).

Estas avaliações consolidaram os defeitos do gene *SHOX* como a principal causa monogênica da baixa estatura (JORGE *et al.* 2008).

Em torno de 80% das alterações observadas no gene *SHOX* são deleções que

envolvem o gene ou regiões reguladoras, sendo os outros 20% mutações de ponto (WOLTERS *et al.* 2013).

Quase todas as mutações descritas no gene *SHOX* são distribuídas em 3 categorias: (1) mutações de ponto, (2) deleções integrais ou parciais e (3) grandes deleções na região 3' (>100kb) envolvendo a região ECS (*evolutionary conserved sequences*- sequências conservadas evolutivamente) (BUNYAN *et al.* 2013).

No banco de dados CLINVAR (consulta em 2023), estão compilados 314 tipos de alteração no gene *SHOX*, correspondendo a deleções (98), microduplicação (61), indel (1), inserção (12), e alterações de único nucleotídeo (145). As alterações estruturais, envolvendo regiões ≥ 50 bps compreendem 137 registros, e envolvem múltiplos genes.

A frequência de alterações pode ser decorrente da abundância de sequências repetitivas ao redor desse gene, predispondo a ocorrência de *crossing-over* desigual entre cromossomos homólogos ou recombinação intracromossômica (CENSANI *et al.* 2013; GTEX CONSORTIUM *et al.* 2017).

Microrrearranjos afetando o gene completo ou seus potenciadores posteriores, representam os defeitos genéticos mais prevalentes que acarretam a haploinsuficiência do *SHOX*. Estes rearranjos provavelmente se originam de eventos de recombinação homóloga não alélica (NAHR) e junção de extremidades não homólogas (NHEJ) mediada por repetições *Alu* que são abundantes nesta região (FANELLI *et al.* 2021).

Ao contrário de outras regiões do genoma onde ocorrem deleções e duplicações, no *SHOX* não foram identificadas microdeleções e microduplicações recíprocas, envolvendo o mesmo local de recombinação (BENITO-SANZ *et al.* 2016).

Os introns 3 e 5 do gene *SHOX* contém diversas sequências repetitivas com potencial para originar deleções ou duplicações do gene (integral ou parcial) através de recombinações (BABU *et al.* 2021). A ocorrência de quebra no intron 3 foi observada em 62% das deleções (13/21) e em 60,5% das duplicações (23/38). O intron 3 é o maior e possui grande quantidade de repetições, compreende 5994 pb com 28,6% de sequências repetitivas (BENITO-SANZ *et al.* 2016)

O efeito das alterações, deleções e duplicações, envolvendo o gene *SHOX* e seus elementos reguladores, na altura final é pouco modificado pelo *background* genético. Duplicações parciais de *SHOX* e pequenas duplicações na região potenciadora CNE-9 são alelos altamente penetrantes e associados com BEI e DLW (HIRSCHFELDOVA *et al.* 2017).

Raramente, duplicações do *SHOX* e seus potenciadores (enhancers) foram identificados em pacientes e seu papel causal permanece contraditório (BENITO-SANZ *et al.*

2017). Foram encontradas duplicações completas e parciais em pacientes com DLW e BEI. A variabilidade das manifestações provavelmente é dependente da localização física da sequência duplicada (BENITO-SANZ *et al.* 2017).

A importância clínica, principalmente de duplicações, é frequentemente ambígua, dificultando o aconselhamento genético. Dependendo da orientação e localização do segmento duplicado, pode ocorrer uma super expressão do gene, ou interferir na conformação da cromatina, portanto enfraquecendo a regulação *cis* durante o desenvolvimento e causando a haploinsuficiência (VERDIN *et al.* 2016).

Além da região codificante, é necessária atenção especial às regiões regulatórias do gene *SHOX*, pois deleções localizadas fora da região codificante são mais comuns na baixa estatura, sem outros achados específicos. Ao que parece, duplicações parciais de *SHOX* podem ser mais deletérias do que duplicações completas de *SHOX*, resultando mais frequentemente na síndrome de Leri-Weill (DLW) totalmente penetrante (BENITO-SANZ *et al.* 2011).

Mais de 380 mutações na região codificante do gene e mutações em elementos potenciadores anteriores e posteriores foram identificados, mas uma correlação clara genótipo-fenótipo ainda não foi estabelecida (GURSOY *et al.* 2020).

Por outro lado, a superdosagem do gene *SHOX*, causada por rearranjo estrutural ou anormalidade numérica nos cromossomos sexuais, pode levar a alta estatura, devido a um período de crescimento prolongado, do final da adolescência até a fase adulta (BENITO-SANZ *et al.* 2011).

1.2.5.1. HEREDITARIEDADE DE ANOMALIAS DO SHOX

As alterações do gene *SHOX* podem ser transmitidas por um dos progenitores, ou ocorrer de novo, durante a meiose materna ou paterna. As formas herdadas apresentam padrão de herança pseudo-autossômica dominante (DEL PINO *et al.*, 2019).

Salmon-Musial *et al.* (2011), avaliaram um grupo de 113 crianças e detectaram alteração do *SHOX* em 22, provenientes de 18 famílias. As anomalias observadas foram deleções intragênicas ou da PAR1 em 15 pacientes provenientes de 11 famílias, deleção da região downstream do gene em 6 pacientes provenientes de 6 famílias, e mutação de ponto em 1 paciente. A alteração do *SHOX* foi transmitida pelo pai em 12 famílias (66,7%) e pela mãe em 6 famílias (33,3%).

A transmissão familiar também foi observada num estudo realizado na Argentina em 19 indivíduos, provenientes de 15 famílias. A deleção da região PAR1 foi detectada em 14

famílias, sendo que em 13 envolvia o gene *SHOX* e em 1 a região downstream, em outra família foi observada uma substituição de nucleotídeo na região codificante de *SHOX* (DEL PINO *et al.* 2019).

A caracterização fenotípica dos pais, pode fornecer informações valiosas nos casos familiares. Além da deformidade de Madelung, outros sinais, não específicos podem estar presentes, como o encurtamento do quarto e quinto metacarpos, palato ogival, escoliose, *cubitus valgus* e micrognatia (LUCCHETTI *et al.* 2018).

Observa-se amplo espectro clínico e grande variabilidade fenotípica dentro da mesma família, com risco de transmissão de 50%, sendo pouco evidente na infância e acentuando-se na adolescência (JORGE *et al.* 2008).

Observou-se que as mutações em heterozigose de *SHOX* podem ser transferidas do cromossomo Y para o cromossomo X e vice e versa (gene *SHOX* saltante) (KANT *et al.* 2011).

1.2.5.2. MEIOSE NA REGIÃO PSEUDOAUTOSSÔMICA

Microrearranjos afetando o gene completo ou os potenciadores posteriores, representam os defeitos genéticos mais frequentes que acarretam a haploinsuficiência do *SHOX*. Estes rearranjos provavelmente se originam de eventos de recombinação homóloga não alélica (NAHR) e junção de extremidades não homólogas (NHEJ) mediada por repetições *Alu* que são abundantes nesta região (FANELLI *et al.* 2021).

No início da meiose, prófase I, o pareamento entre os cromossomos sexuais e a recombinação entre os segmentos pareados são essenciais para a continuidade da meiose. Na meiose feminina, os cromossomos sexuais são homólogos (XX) e o pareamento ocorre longitudinalmente, da mesma forma que ocorre nos cromossomos autossomos. Na meiose masculina, os cromossomos sexuais são heterólogos (X e Y) e o pareamento ocorre nas regiões de homologia dos cromossomos sexuais, ou seja, na região pseudo- autossômica (PAR) (FUKAMI; SEKI; OGATA, 2016).

Na região PAR1, a taxa de recombinação durante a meiose masculina é 17 vezes maior em relação ao resto do genoma, aumentando assim a probabilidade de rearranjos (FANELLI *et al.* 2022). A capacidade de recombinação é mantida mesmo na presença de deleções desta região. O tamanho mínimo de PAR1 para manter a espermatogênese é bem pequeno, cerca de 400kb (FUKAMI; SEKI; OGATA, 2016).

As recombinações ocorrem preferencialmente na região telomérica de PAR1,

sendo o gene *SHOX* um *hotspot* de recombinações. A presença de sequência repetitivas possibilitam a ocorrência de deleções e duplicações (FUKAMI; SEKI; OGATA, 2016).

Eventualmente, durante a recombinação meiótica, o alelo anômalo de *SHOX* pode ser transferido do cromossomo X para o Y e vice-versa. A transmissão de alelo anômalo localizado no cromossomo Y paterno para filhas, com constituição XX, foi relatada por diversos autores (GÜRSOY *et al.* 2020).

1.2.6. AVALIAÇÃO POPULACIONAL DO GENE *SHOX*

Atualmente, com a caracterização de alterações gênicas associadas a baixa estatura, os testes genéticos são considerados a primeira linha de investigação em crianças com distúrbio de crescimento (FREIRE *et al.* 2019).

Os estudos sistemáticos, em grupos de indivíduos com BEI e DLW, contribuem para estimar a prevalência de anomalias neste gene na população. As estimativas diferem de estudo para estudo, e aumentam com a utilização de métodos mais sensíveis que permitem a detecção de pequenas deleções, e a inclusão da região *downstream* na abordagem (BINDER; RAPPOLD, 1993).

Os estudos iniciais utilizaram a metodologia de FISH e segregação de microssatélites, posteriormente a incorporação das metodologias de MLPA, qPCR e aCGH, ampliaram a capacidade de detecção de anomalias. Recentemente as metodologias de MLPA e sequenciamento de última geração substituíram as demais metodologias (BENITO-SANZ *et al.* 2017).

Estima-se que cerca de 2% a 15% das crianças que apresentam baixa estatura idiopática, e 70% a 90% dos pacientes com discondrosteose de Leri-Weill (DLW) possuem haploinsuficiência do gene *SHOX* (BENITO-SANZ *et al.* 2017; FUNARI *et al.* 2019).

Em 2006, Huber *et al.* avaliaram 56 indivíduos com DLW e 84 com BEI. A metodologia utilizada foi a análise da segregação de microssatélites polimórficos; foram incluídos na avaliação marcadores ao redor do gene *SHOX* na região Xp22.3, os microssatélites CASHOX e GASHOX (DXYS10092), repetições localizadas distalmente à *SHOX*, DXYS233 localizado 278 kb proximal de *SHOX* e o marcador intragênico CTSHOX (DXYS10093). Foram detectadas anomalias em 54% dos indivíduos do grupo com DLW (30 de 56), e em 19% do grupo de BEI (11 de 46). Nos indivíduos em que não foram detectadas anomalias a avaliação foi expandida, sendo avaliados outros 20 microssatélites e 49 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) localizados na região PAR1. Foram detectadas duas deleções envolvendo DXYS233 e mais sete deleções localizadas *downstream*

do gene *SHOX* (5 no grupo de DLW e 2 no grupo de BEI). As deleções foram variáveis em tamanho e localização. Nos 36 indivíduos do grupo de DLW com anomalias de *SHOX*, a maioria foi do sexo feminino (80,5%), a proporção do sexo masculino foi 19,4%. Sete casos foram esporádicos e 29 familiares. Nos casos familiares as anomalias foram herdadas da mãe em 15, e herdadas do pai em 14. Nos 18 indivíduos do grupo com BEI as anomalias foram mais prevalentes sexo feminino (10), sendo observada em 8 indivíduos do sexo masculino. Destas 4 casos foram esporádicos e 14 familiares, sendo herdadas através da mãe em 5 e através do pai em 9. A frequência global de alterações nos 140 indivíduos avaliados foi 38,6% presentes em 68% do grupo de discondrosteose e 15% do grupo de baixa estatura (HUBER *et al.* 2006).

Del Pino *et al.* (2019), avaliaram uma coorte de 19 crianças argentinas, provenientes de 15 famílias. A abordagem inicial foi através da metodologia (MLPA), quando essa análise era negativa para microdeleções e microduplicações da região, seguia-se a análise dos exons 2 a 6 do *SHOX* utilizando a combinação das técnicas de high-resolution melting e sequenciamento de DNA. A maior parte, apresentou microdeleção na região pseudoautosômica (PAR1), detectaram também uma nova variante no Exon 2: c.243A>T (p.Lys81Asn), o que enfatiza a importância de uma avaliação mais completa do gene, por uma combinação de metodologias.

O estudo de caso feito por Valetto *et al.* (2016), também utilizou diferentes métodos para análise. Foi feita análise citogenética, FISH e pintura cromossômica, além de MPLA e *array* CGH. A pintura cromossômica foi utilizada para identificar o cromossomo Y. MLPA e aCGH identificaram os pontos de quebra e de microduplicação. Reforçando assim, a ideia de que em alguns casos se faz necessário mais de um método de análise para a caracterização precisa.

Freire *et al.* (2019) analisaram 55 crianças brasileiras, nascidas pequenas para a idade gestacional com BEI persistente. Avaliaram diversos genes associados a baixa estatura pelo método de sequenciamento massivo paralelo (MPS). Foram detectadas 3 variantes patogênicas, sendo uma alteração do gene *SHOX*. No geral, o estudo encontrou 15% dos casos com alteração genética em genes associados à estatura .

Outro estudo brasileiro, investigou 11 pacientes com características clínicas de DLW ou DML. Foi realizada a análise de segregação de microssatélites, PCR em tempo real e sequenciamento direto. Foram encontradas alterações do gene *SHOX* em sete pacientes (DE LIMA, 2010).

Vanelli *et al.* (2020) avaliaram 269 indivíduos com BEI, utilizando MLPA e

sequenciamento dos exons 2 a 7 e regiões flanqueadoras. Foram detectadas alterações em 52 participantes do estudo, correspondendo a 17,6%.

Shujaa-Addin *et al.* (2020) avaliaram 25 indivíduos com BEI através de FISH. Em dois pacientes (8%) foi observada deleção de *SHOX*.

Stritar *et al.* (2021) avaliaram 75 indivíduos com BEI. A avaliação foi realizada inicialmente através de MLPA, seguida do sequenciamento de DNA nos indivíduos que não apresentaram CNVs. Pela técnica de MLPA foram detectadas uma deleção e duas duplicações, compreendendo 1,3% da amostra.

Como mostrado acima, a literatura evidencia que em estudos populacionais, com pacientes que apresentam apenas BEI a frequência de alterações é pequena, já quando LWD ou Madelung estão presentes, a frequência de alterações no gene é maior (KURNAZ *et al.* 2018).

1.2.6.1. FISH- Hibridização in situ por fluorescência

A análise por citogenética molecular, *hibridização in situ por fluorescência* (FISH), é essencialmente baseada no mesmo princípio da análise *Southern blot*, que explora a capacidade do DNA de cadeia simples hibridizar com o seu DNA complementar. No caso da FISH, o alvo é o DNA nuclear de células em interfase, ou de células em metáfase, fixadas numa lâmina de microscopia. Esta técnica pode ser realizada, por exemplo, com amostras de medula óssea, esfregaços de sangue periférico, líquido amniótico ou cortes histológicos de tecidos fixados (PINKEL *et al.* 1988).

Para análise do gene *SHOX*, a FISH é um dos métodos mais assertivos, não sendo necessária nenhuma confirmação ou exame complementar quando detectada anomalia (BAKIR, ABDULLATÍF *et al.* 2018).

É utilizada sonda específica para a região contendo o gene alvo (*SHOX*), e espera-se visualizar dois sinais em cromossomos diferentes (XX ou XY). Quando é visualizado apenas um sinal temos uma microdeleção, quando se visualizam 3 sinais temos uma microduplicação, além disso, como controle da hibridação, utilizam-se sondas de regiões centroméricas ou teloméricas dos cromossomo X e Y marcadas com fluoróforos de outra cor.

A FISH é uma metodologia limitada não possibilitando a detecção de pequenas deleções e mutações de ponto (KURNAZ *et al.* 2018).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a variação do número de cópias do gene *SHOX* em participantes com baixa estatura e cariótipo normal (46,XX ou 46,XY).

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o número de cópias do gene *SHOX* através de FISH.
- Avaliar a hereditariedade da alteração quando detectada, pelo estudo dos pais e familiares.
- Verificar, através dos prontuários, possíveis alterações morfológicas, fenotípicas ou ósseas e doenças crônicas em pacientes com alteração do gene *SHOX* correlacionados com o número de cópias.

3 METODOLOGIA

3.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética do IPPMG, submetido através da plataforma Brasil e aprovado, com o número de parecer 1.262.446 (Anexo 1).

3.2 TIPO DE ESTUDO

Estudo observacional, descritivo, transversal, do tipo série de casos.

3.3 LOCAL DE ESTUDO

Laboratório de Genética e Serviço de Endocrinologia do IPPMG.

3.4 AMOSTRA

Amostra de conveniência composta de pacientes com baixa estatura idiopática, com cariótipo normal, acompanhados no Serviço de Endocrinologia e Ambulatório de Genética do IPPMG.

3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os participantes com estatura inferior ao percentil -2 DP (COHEN, P *et al.*, 2008), associada ou não a malformações esqueléticas e que apresentaram cariótipo normal (46,XX ou 46,XY) após o estudo cromossômico.

Para serem incluídos no presente estudo, os responsáveis dos participantes precisaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que está no apêndice 1.

3.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Participantes relatados nos prontuários com baixa estatura de causa orgânica como hipotireoidismo, desnutrição, doenças cardiovasculares, doenças renais, doença celíaca, deficiência de hormônio do crescimento (GH). Estas condições foram avaliadas antes da obtenção da amostra.

3.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.7.1 CULTURA DE LINFÓCITOS E OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS

As culturas de linfócitos para obtenção de metáfases, foram realizadas por meio da técnica modificada de (MOORHEAD *et al.* 1960).

Amostras de 2 a 5 ml de sangue periférico foram obtidas a partir da punção venosa de sangue periférico em heparina. O preparo das culturas, foi realizado em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, sendo adicionados em tubos cônicos de 15 ml de capacidade: 4 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco-Carlsbad/EUA), 1ml de soro fetal bovino (Cultilab- Campinas/Brasil), 0,1 ml de fitohemaglutinina (Cultilab- Campinas/Brasil) e 500µl de sangue total. Os frascos de cultura foram incubados em estufa a 37° C com 5% de CO₂ por 72 horas.

Decorrido esse período acrescentou-se, a cada frasco de cultura, colchicina (Sigma- St. Louis/EUA) na concentração final de 0,01µg/ml de meio de cultura. As culturas foram novamente incubadas a 37° C por mais uma hora.

Ao término da incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 2000rpm. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 5ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M) mantendo a 37°C por 15 minutos.

Após a hipotonização das células, adicionou-se 0,5 ml de fixador Carnoy (Metanol + Ácido acético glacial 3:1) recém-preparado, e o material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. A seguir, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 5ml de fixador, ressuspensando o sedimento delicadamente para evitar a formação de grumos e centrifugando-o por 10 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes.

3.7.2 ESTUDO CITOGENÉTICO MOLECULAR

A análise citogenética molecular foi realizada através da técnica de FISH.

As amostras processadas foram gotejadas em lâminas silanizadas e secas ao ar. As lâminas foram tratadas em 2xSSC durante 2 minutos, desidratadas em séries de etanol, 70%, 85% e 100% por 2 minutos cada, e aquecidas a 65°C por 15 minutos.

A hibridização foi realizada com sondas fluorescentes comerciais (Cytocell e Lexell). A combinação de uma sonda LSI específica para o gene *SHOX* acompanhada das

sondas controle DXZ1 e DYZ1, ou XYpter , como esquematizado na FIGURA 3.

Cerca de 4µl da sonda diluída em tampão foram colocados em contato com a amostra sobre a lâmina, sendo a região recoberta com lamínula e selada. A hibridação foi realizada em hibridizador THERMOBRITE, sendo incubadas durante 5 minutos na temperatura de 75°C para desnaturação do DNA, a seguir a temperatura foi mantida a 37°C *overnight* para hibridação. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas e coradas com DAPI.

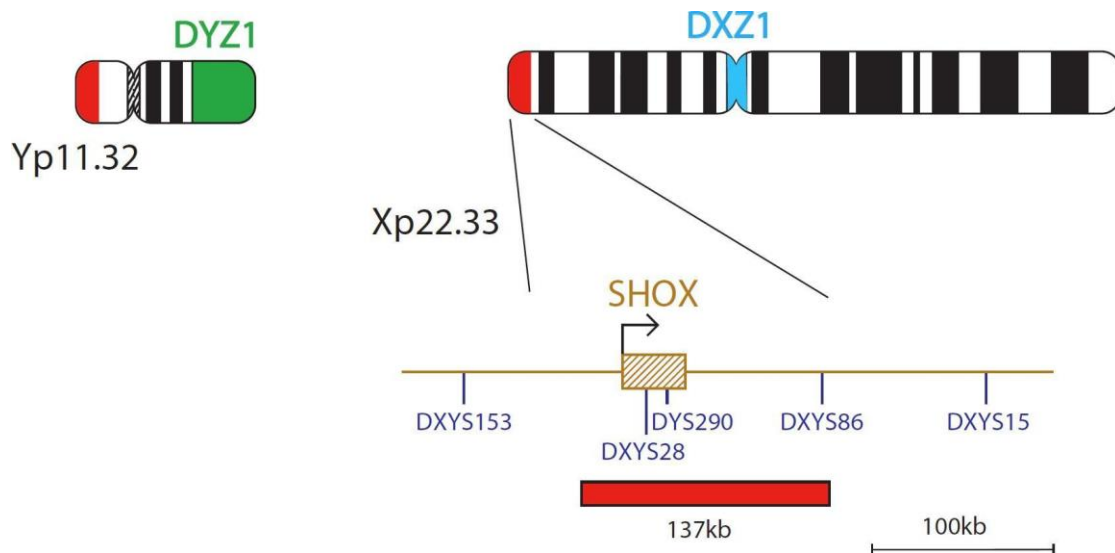


FIGURA 3: representação esquemática da posição das sondas nos cromossomos X e Y (Fonte: catálogo CYTOCELL).

A análise foi realizada utilizando microscópio óptico Olympus BX51 com epiluminação de vapor de mercúrio (HBO100), com filtros de excitação e barreira nas cores azul, verde, vermelha e acqua, como na FIGURA 3.

As imagens foram capturadas por sistema de digitalização e análise (*Applied Spectral Imaging version 6.0*).

3.7.3 CRITÉRIO DE ANÁLISE

Foram selecionadas células com hibridação adequada, ou seja, marcação da sonda alvo e sonda controle, sem background. Nas amostras de cada participante foram analisadas pelo menos 10 metáfases de boa qualidade, verificando-se a quantidade de sinais de cada sonda. Os achados foram descritos utilizando-se a nomenclatura proposta pelo ISCN (2020).

Na FIGURA 4, temos as microfotografias representativas do padrão de hibridação em núcleos interfásicos e metáfases.

A presença de um único sinal da hibridação correspondente ao gene *SHOX*,

acompanhado dos sinais correspondentes a sonda controle, caracterizou a microdeleção.

Quando houve diferença de tamanho da região com hibridação ou a presença de marcação dupla em um dos cromossomos foi caracterizada a microduplicação.

Para confirmação da microduplicação foi realizada a análise em 100 núcleos interfásicos registrando a presença de 3 sinais correspondentes ao gene *SHOX*, sendo a distância entre os sinais maior que o tamanho da marcação (para afastar os núcleos em G2 com a cromátide duplicada) (KURNAZ *et al.* 2018).

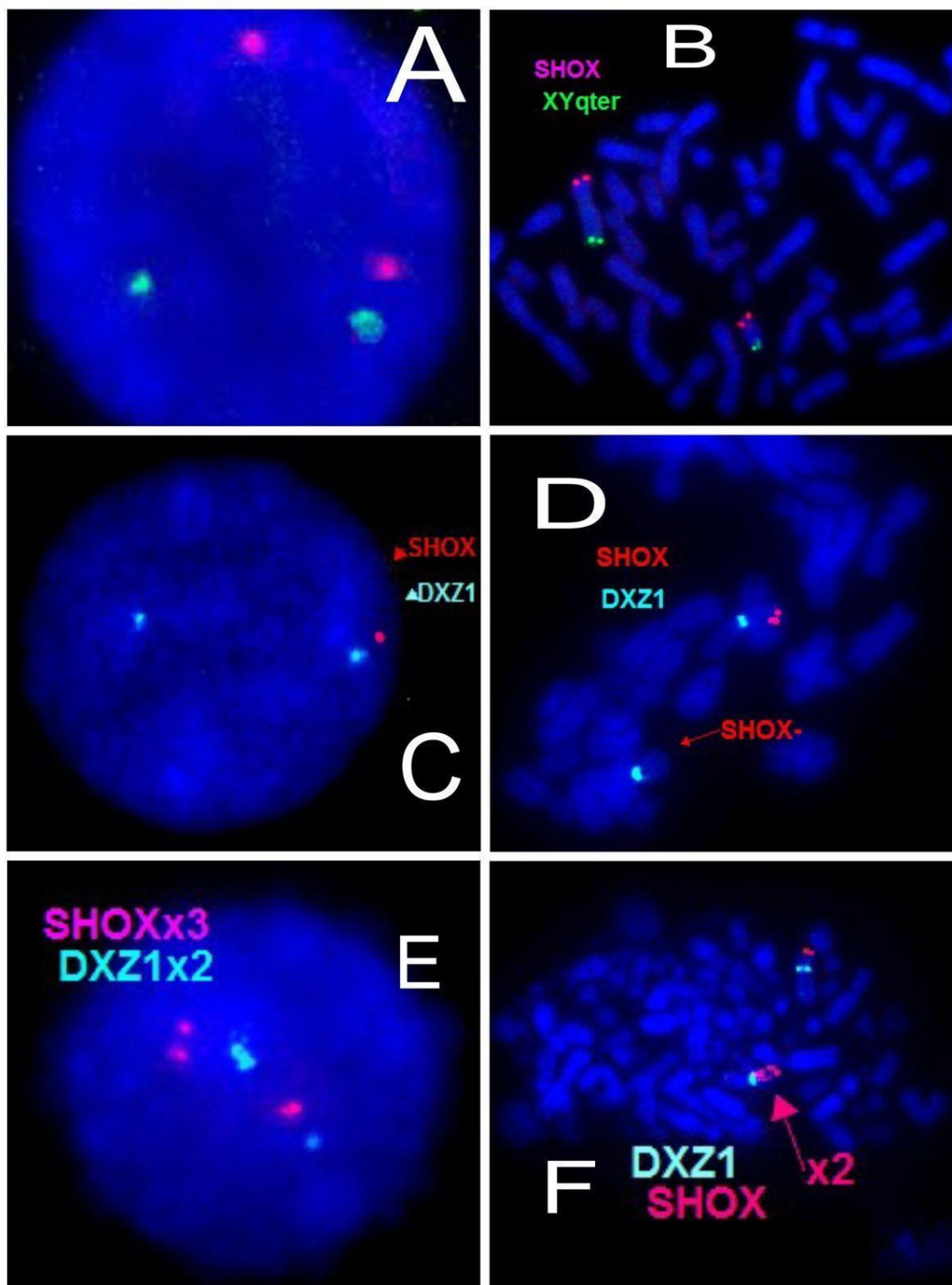


FIGURA 4: Microfotografias em microscopia de fluorescência. Imagens da técnica de FISH, utilizadas para análise, participantes com alteração.

A) FISH em núcleo interfásico mostrando a presença de 2 sinais correspondentes a sonda *SHOX* e dois sinais correspondentes a sonda XYqter. B) FISH em metáfase mostrando um exame sem alteração em participante do sexo masculino. C) FISH em núcleo interfásico mostrando a presença de 1 sinal correspondente a sonda *SHOX* e 2 sinais correspondentes a sonda DXZ1, evidenciando a microdeleção de *SHOX*. Amostra obtida

do participante 36. D) FISH em metáfase mostrando a presença microdeleção de *SHOX*, com um cromossomo X com 1 sinal correspondente ao *SHOX* e um sinal correspondente a *DXZ1*, no cromossomo homólogo observa-se apenas um sinal correspondente a sonda *DXZ1*. Amostra obtida do participante 3. E) FISH em núcleo interfásico mostrando a presença de 3 sinais correspondentes a sonda *SHOX* e 2 sinais correspondentes a sonda *DXZ1*, evidenciando a microduplicação de *SHOX*. Amostra obtida do participante número 5. F) FISH em metáfase mostrando a presença microduplicação de *SHOX*, com um cromossomo X com 2 sinais correspondentes ao *SHOX* e um sinal correspondente a *DXZ1*, no cromossomo homólogo observa-se um sinal correspondentes ao *SHOX* e 1 sinal correspondente a sonda *DXZ1*, evidenciando a microduplicação de *SHOX*. Amostra obtida do participante número 4.

3.7.4 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

A análise citomolecular foi realizada de forma descritiva, considerando a utilização de um controle interno na FISH.

As informações clínicas e morfológicas dos participantes foram obtidas nos prontuários (exame físico e resultados de exames complementares) e diretamente com participante e/ou responsável. Nos participantes com alteração na análise citomolecular (presença de microduplicação ou microdeleção) foram obtidas fotos para registro.

Na data da coleta de sangue, foi verificada a altura em centímetros e anotadas, data de nascimento e se a criança possuía deformidade de Madelung. Foi calculado o escore z através do aplicativo calculadora antropométrica, colocando as informações: data de nascimento e data em que foi medida a altura, resultando na idade, altura em pé e sexo para então obter o resultado e saber se a criança está crescendo corretamente. O tratamento de dados foi feito pelo programa SPSS na versão 21.0. A significância aceita foi de 95% ou $p < 0.05$.

Na FIGURA 5 encontra-se o fluxograma das etapas do estudo.

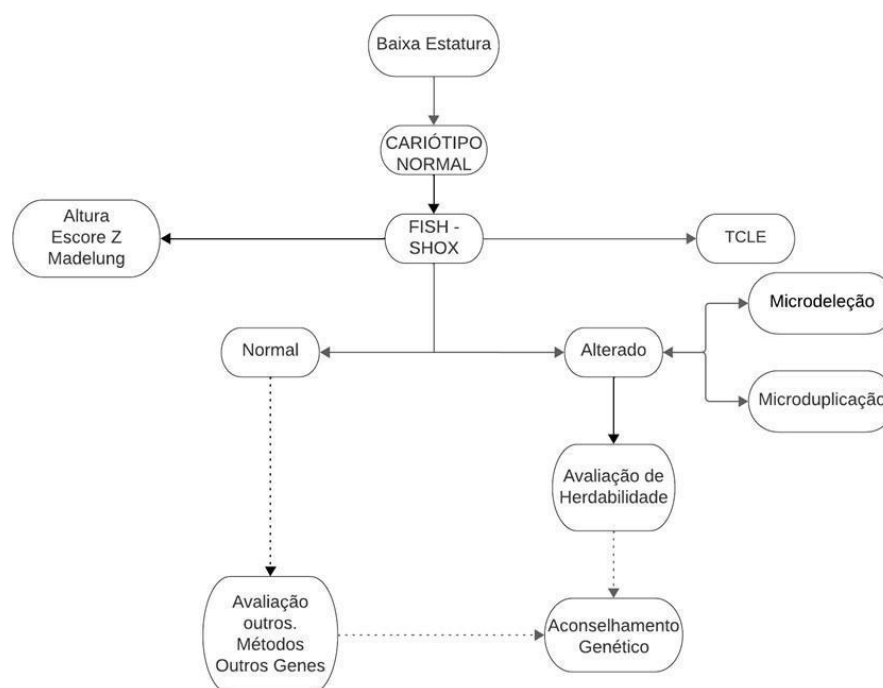


FIGURA 5: Fluxograma das etapas do estudo

4 RESULTADOS

4.2 AMOSTRA ESTUDADA

Os participantes foram encaminhados ao Laboratório de Genética do IPPMG, foram avaliados 36 participantes (28 do sexo feminino e 8 do sexo masculino) com idades entre 1 e 16 anos, atendidos no Serviço de Endocrinologia do IPPMG no período de maio de 2013 a maio de 2022. Não houve exclusão de participantes.

As características do grupo amostral referentes ao sexo, idade e escore z encontram-se na tabela 1.

Tabela 1– Distribuição da frequência (n), média (X), desvio padrão de altura (DP), mediana (Med), valores máximos (Máx) e mínimos (Min) das idade e escore z dos participantes.

Sexo	n	Idade (anos)				Escore z			
		X ± DP	Med	Min	Max	X ± DP	Med	Min	Max
Feminino	28	7,6±3,2	7,3	1,6	14,2	-2,6±0,6	-2,6	-1,7	-2,6
Masculino	8	10,7±2,2	10,2	7,1	14,2	-2,1±0,47	-2,2	-1,2	-2,8

4.3 AVALIAÇÃO CITOMOLECULAR E FENOTÍPICA

Através da análise citomolecular, foram detectadas anomalias em 7 participantes (19,4%), todos do sexo feminino.

Em quatro (57,1%) foi observada microdeleção do gene *SHOX* com cariótipo 46,XX.ish(DXZ1x2, SHOXx1). Em três (42,9%) foi observada microduplicação do gene *SHOX*, com cariótipo 46,XX.ish(DXZ1x2,SHOXx3). A idade, escore z, presença de alteração de Madelung, e o tipo de alteração do *SHOX* encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2- Distribuição da idade, escore z (altura), presença de malformação de Madelung (Mad) alteração do gene *SHOX*.

Paciente	Idade	Escore z	Madelung	Alteração do <i>SHOX</i> detectada
1	10,2	-2,608	Sim	Microdeleção
2	14,2	-2,651	Não	Microduplicação
3	13,0	-2,001	Sim	Microdeleção
4	4,2	-2,306	Sim	Microduplicação
5	3,7	-2,846	Sim	Microduplicação
21	12,4	-3,164	Sim	Microdeleção
36	7,3	-2,039	Sim	Microdeleção

Não houve diferença no escore z nos participantes com alteração no *SHOX* e naqueles que a alteração não foi detectada, pelo teste T de Student ($p=0,969$), FIGURA 6.

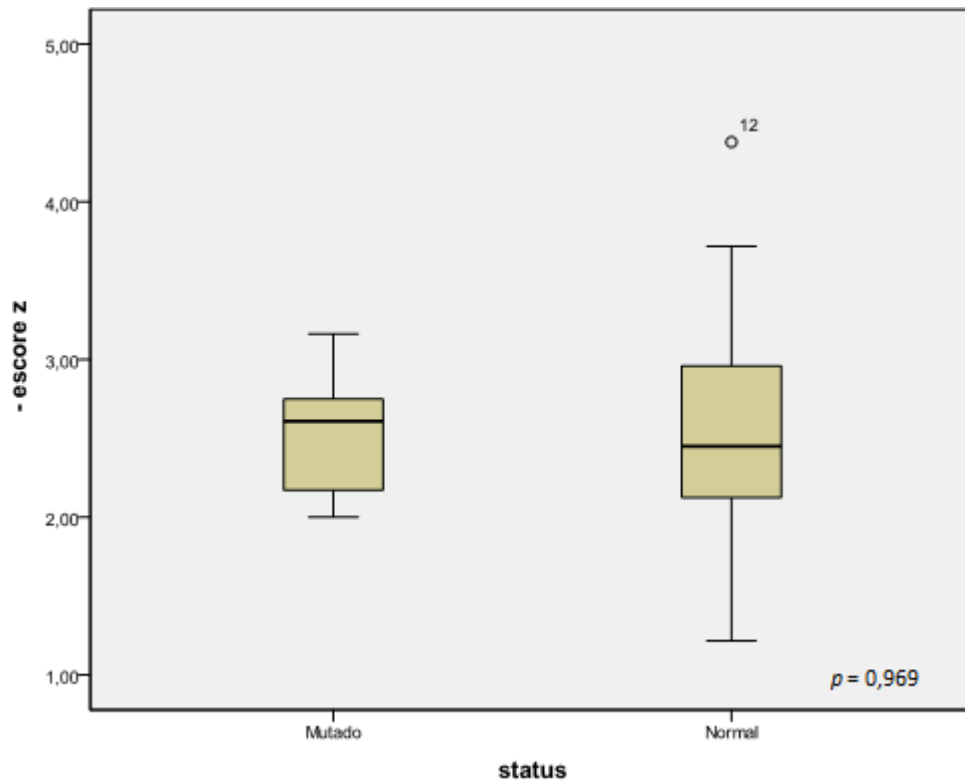


FIGURA 6: Comparação do escore z entre participantes de baixa estatura com alteração citogenética e sem alteração citogenética detectável

Tampouco, houve diferença, pelo teste T de Student, no escore z dos participantes com diferentes alterações no *SHOX*, FIGURA 7.

Quanto ao fenótipo, foi observada uma grande variedade fenotípica, sendo a presença de Madelung a mais prevalente. As alterações registradas em todas as participantes estão descritas no Apêndice 2.

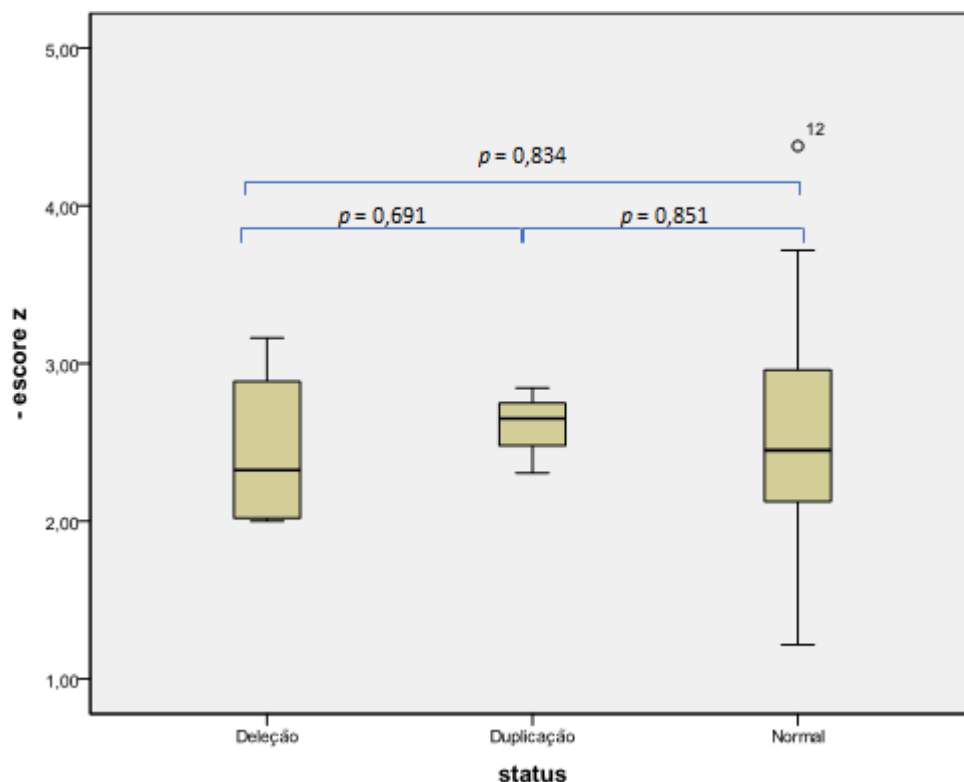


FIGURA 7: Comparação entre o escore z de participantes com baixa estatura sem alteração no gene *SHOX* detectada por FISH, participantes com deleção no gene *SHOX* e participantes com duplicação no gene *SHOX*.

4.4 HEREDITARIEDADE

Nos participantes que apresentaram alteração no gene *SHOX*, o estudo também foi estendido aos progenitores. Foi possível a avaliação dos progenitores de cinco participantes com alteração em *SHOX*.

A natureza familiar da alteração, e sua hereditariedade foi caracterizada em três participantes, todas com microdeleção de *SHOX*. Em duas a microdeleção foi transmitida através dos pais, que apresentaram microdeleção no cromossomo Y, e em uma foi transmitida pela mãe.

Na Tabela 3, encontramos as informações referentes ao tipo de alteração e a avaliação dos progenitores para caracterização da transmissão familiar.

Tabela 3 – Alterações do *SHOX* nos participantes e seus progenitores

Participante	Participante	Alteração de <i>SHOX</i>	
		Materna	Paterna
1	Microdeleção	Mosaicismo	Microdeleção*
2	Microduplicação	NA	NA
3	Microdeleção	NA	NA
4	Microduplicação	Normal	Normal
5	Microduplicação	Normal	Normal
21	Microdeleção	Normal	Microdeleção*
36	Microdeleção	Microdeleção	NA

NA- Não avaliado ; * microdeleção no cromossomo Y

5 DISCUSSÃO

A estatura é uma característica com alto grau de hereditariedade, maior que 80%, portanto a variabilidade genética é o principal determinante da estatura (VASQUES *et al.* 2019).

Na última década, foram caracterizados diversos genes que possuem papel determinante na altura individual, e quando alterados podem acarretar a desordem no crescimento (VASQUES; ANDRADE; JORGE, 2019). Estes genes atuam na secreção, liberação e resposta ao hormônio de crescimento, fatores de crescimento e seus receptores, secreção e liberação de outros hormônios (BONDY, 2007).

A caracterização de genes associados ao crescimento ponderal vem colocando os testes genéticos como a primeira linha de investigação em crianças com distúrbio de crescimento sem outras anomalias (FREIRE *et al.* 2019).

No entanto, a sensibilidade das características clínicas para discriminar a etiologia da BEI é insuficiente (GURSOY *et al.* 2020).

A caracterização da causa genética da baixa estatura nas crianças em desenvolvimento é importante por diversos aspectos. Possibilita prever o desenvolvimento natural, fundamentado no conhecimento da literatura, e sugerir as melhores opções terapêuticas.

Tradicionalmente, crianças com baixa estatura realizam extensiva avaliação médica, frequentemente focalizada na identificação de etiologias hormonais para a baixa estatura ou outras condições clínicas que afetam o crescimento. Esta avaliação padrão raramente proporciona diagnóstico em crianças com baixa estatura isolada (SISLEY *et al.* 2013).

O gene *SHOX*, foi um dos primeiros genes associados a baixa estatura identificados (GURSOY *et al.* 2020).

A identificação de alteração em *SHOX* possibilita a caracterização da etiologia da baixa estatura, e também habilita ao tratamento hormonal, contribuindo para uma melhor qualidade de vida. Os pacientes com baixa estatura, nos quais a anomalia do *SHOX* foi caracterizada, podem ser beneficiados com o tratamento recomendado. Estima-se que o ganho ponderal com uso de GH pode ser de até 10 cm (MARTÍN-BEGUÉ *et al.* 2021). A utilização do Hormônio de Crescimento é indicada em pacientes pré-puberais com deficiência do *SHOX* (STRITAR *et al.* 2021). No entanto, existe uma janela de idade limitante para a elegibilidade a este tratamento, e quanto mais precoce é o diagnóstico maior a possibilidade

do benefício com o tratamento com GH.

A frequência de alterações no gene *SHOX* detectada neste estudo evidencia que no grupo amostral avaliado as alterações neste gene contribuem para a etiologia da BEI. Também houve diversidade do tipo de alteração encontrado.

Estima-se a prevalência populacional da deficiência de *SHOX* em 1:1000. Aproximadamente 75% das anomalias de *SHOX* são decorrentes de deleções de tamanho variável compreendendo o gene inteiro e/ou CNE, enquanto as microdeleções intragênicas e mutações de ponto ocorrem nos demais casos. Raramente, duplicações do *SHOX* e seus intensificadores (enhancers) são relatados em pacientes e seu papel causal permanece contraditório (BABU *et al.* 2021). Neste estudo houve maior quantidade de microduplicações em relação às microdeleções.

A frequência de alterações de *SHOX* em estudos da literatura é variável, compreendem diferentes grupos de indivíduos, e diferentes abordagens metodológicas.

Os estudos iniciais utilizaram as metodologias de FISH e análise da segregação de microssatélites. Posteriormente outras metodologias foram incorporadas (BONDY, 2007); e a utilização de outros métodos, como PCR, SNP, arrayCGH, entre outros é recomendada (RAPOLD *et al.* 2007).

Existem estudos, como o de Wolters *et al.* (2013) que consideram a FISH menos sensível para detecção de alterações do *SHOX*. Outro exemplo é Bunyan *et al.* (2014), que empregaram os métodos CGH, MLPA e FISH, conseguindo encontrar uma microdeleção na região 3' em um ponto distante do já conhecido.

A resolução da MLPA é considerada superior ao FISH e microssatélites, para a detecção de alterações no número de cópias. Em estudos recentes, a MLPA é utilizada como metodologia inicial, seguindo-se a avaliação por qPCR e sequenciamento de nucleotídeos para a complementação nos casos que não foram detectadas alterações pelo MLPA (SHUJAA-ADDIN *et al.* 2020).

A região genômica avaliada também vem se expandindo, e alguns estudos incluem além dos exons e íntrons, regiões *upstream* e *downstream* do *SHOX*, pois muitas vezes as alterações envolvem as regiões reguladoras de *SHOX* (FUNARI, 2009).

Por outro lado, a metodologia FISH com sondas comerciais é uma metodologia acessível e não requer a utilização de equipamentos de alto custo. Os estudos moleculares mais sensíveis como aCGH, MLPA e NGS requerem equipamentos sofisticados, e uma padronização da metodologia refinada, além de recursos computacionais adequados. Neste estudo, a FISH foi uma metodologia adequada, possibilitando a detecção de microduplicações

e microdeleções de *SHOX*.

Considerando a baixa estatura idiopática como fator de inclusão no estudo, a frequência observada de alteração, 19,4%, foi similar à frequência observada em outros estudos (DAY *et al.* 2009; STRITAR *et al.* 2021).

Vale ressaltar, que quanto maior o número amostral de participantes com BEI, menor é a proporção de alterações de *SHOX* encontradas. O estudo de Rappold *et al.* (2007), analisou 1608 pacientes, encontrando microdeleção ou mutação em 68 (4,2%) . O estudo de Caliebe *et al.* (2012) entre 199 pacientes com baixa estatura avaliados, 6 apresentaram microdeleção e 2 microduplicação do gene *SHOX*.

Vanelli *et al.* (2020), avaliaram 296 crianças com BEI sem diagnóstico, que apresentaram atraso de crescimento ou desproporção esquelética, e detectaram alteração do gene *SHOX* em 52 (17,6%). Este estudo foi realizado através da metodologia MLPA. Foram encontradas deleções de *SHOX* em 52 participantes (17,6%). Sendo assim, não se observa diferença no resultado deste trabalho e do presente estudo, mesmo sendo uma técnica diferente, pois apesar do número amostral maior, a porcentagem foi similar.

Ao contrário das outras condições genômicas que envolvem microduplicação e microdeleção, no *SHOX* não foram identificadas microdeleções e microduplicações recíprocas, envolvendo os mesmos pontos de quebra (BENITO-SANZ *et al.* 2017).

O diagnóstico clínico da deficiência de *SHOX* é particularmente desafiador em crianças pré-escolares, quando desproporções esqueléticas mesoméricas e deformidade de Madelung podem estar ausentes (AUGER *et al.* 2016).

A sensibilidade das características clínicas para discriminar indivíduos com BEI é insuficiente nos primeiros anos de vida (GURSOY *et al.* 2020). Porém, foi de grande importância no presente estudo, todas as participantes com alteração do gene *SHOX* apresentaram alterações importantes e a mais prevalente foi a deformidade de Madelung, não verificada nos participantes sem alteração do gene *SHOX*.

A expressão fenotípica leve é muito frequente e gera dificuldade para definir uma indicação de análise molecular do gene *SHOX* em crianças com deficiência de crescimento (VANNELLI *et al.* 2020).

A repercussão fenotípica associada às anomalias do gene *SHOX* é bastante variável quanto ao aspecto clínico, podendo refletir influências genéricas na expressão do distúrbio genético (RAPPOLD *et al.* 2007).

Neste estudo, considerando a baixa estatura como principal manifestação fenotípica, não houve diferença no escore z entre o grupo de participantes com alteração do

SHOX e o grupo onde esta alteração não foi detectada (FIGURA 6).

Também em relação ao escore z, FIGURA 7, não houve diferença entre participantes com duplicação e deleção.

Todas as participantes com alteração de *SHOX* apresentavam importantes manifestações fenotípicas, incluindo alterações ósseas e articulares, dificuldade de mobilidade. A deformidade de Madelung foi identificada em seis das sete participantes com anomalia de *SHOX*. A deformidade de Madelung estava presente na mesma proporção em crianças com microduplicação e microdeleção, o tamanho do grupo amostral pode introduzir um viés.

Não foi possível avaliar as características fenotípicas em meninos e assim observar se ocorre de forma mais branda por não ter menino com alteração do gene *SHOX* no presente estudo.

A amplitude das manifestações fenotípicas foi maior nas participantes com microduplicação de *SHOX*. Esta diversidade de alterações, é compatível também com a literatura, que registra muitas alterações incomuns

A participante número 5, com microduplicação do *SHOX*, apresentava artrite reumatoide. Não encontramos relatos na literatura, até o momento, desta associação.

A presença de deformidade de Madelung ou DWL nas pacientes com alteração de *SHOX*, é consistente com o encontrado na literatura. Estudos em meninas que apresentam Madelung encontram alta frequência de alteração de *SHOX*. O presente estudo não foi diferente, das sete participantes com alteração apenas uma não apresentou deformidade de Madelung. Benito-Sanz *et al.* (2006) em seu trabalho incluíram apenas pacientes que apresentavam deformidade de Madelung, todas as 7 apresentaram alteração no gene *SHOX*, a maioria deleções que compreendiam todo o gene, sendo 12 alterações nunca descritas anteriormente. Sendo assim, um estudo com resultados similares ao do presente estudo, e revelando mais uma vez como DLW é decorrente de anomalias no gene *SHOX* (SCHNEIDER *et al.* 2005; BENITO-SANZ *et al.* 2006).

Os resultados de Kurnaz *et al.* (2018) diferem do presente estudo, tendo uma porcentagem maior de deleções (37.5%). Relatam a limitação do critério de inclusão ser baixa estatura, pois dessa forma exclui indivíduos *SHOX* positivo que possuem estatura normal antes da puberdade, mas confirma a variabilidade do fenótipo também.

Apesar de se pressupor que crianças com defeitos moleculares no gene *SHOX* tenham uma baixa estatura mais severa que aquelas com duas cópias normais, não foi observada diferença no nível de baixa estatura entre aqueles com ou sem alteração

identificável do gene *SHOX*, algo que já havia sido observado anteriormente, no estudo de Rappold (SCHNEIDER *et al.* 2007; RAPPOLD *et al.* 2007).

Os estudos da literatura sugerem que indivíduos com alteração no gene *SHOX* possuem uma baixa estatura mais grave do que pacientes sem alteração, porém não foi observado isso no presente estudo, pacientes com alteração de *SHOX* apresentaram os mesmos níveis de baixa estatura que os sem alteração, semelhantemente constatado por Rappold *et al.*(2007).

Acredita-se que grandes duplicações, levariam a uma superexpressão do gene e com isso uma alta estatura. Enquanto isso, pequenas duplicações, com apenas parte de seus componentes, acarretariam a uma expressão atenuada de *SHOX*, decorrente de perturbação na região regulatória *cis* de *SHOX*, causando assim uma baixa estatura (TROPEANO *et al.* 2016). E além desse estudo, Valetto *et al.* (2016) relatam o caso de um menino com 3 cópias de *SHOX* e baixa estatura, devido a instabilidade cromossômica. O estudo também relata que microduplicações possuem fenótipo variável, pois dependem do tamanho, posição e número de intensificadores de transcrição envolvidos no rearranjo.

Outra alteração incomum foi a cardiopatia presente na participante 2 que possui microduplicação. Existem poucos relatos na literatura, o estudo mais abrangente foi feito por Ramirez *et al.* (2019), relatou uma participante que também possuía microduplicação.

A macrocefalia foi diagnosticada nas participantes 1 e 4 , microcefalia foi diagnosticada na participante 5. Alterações importantes e que não encontramos relatos na literatura, talvez por limitarem-se à questão ponderal, não avaliando particularidades fenotípicas.

Como citado anteriormente, dismorfias dos membros superiores e inferiores, são comuns em pacientes com alteração do gene *SHOX*. No presente estudo, todas as participantes apresentaram alguma deformidade. A participante 1 possui deformidade de Madelung, encurtamento do terceiro dedo da mão e aumento do tamanho do hálux. Na A participante 4 possui microcefalia e fronte proeminente, encurtamento rizomélico dos dedos da mão e deformidade de Madelung. Por fim a participante 5 com face atípica e proeminente, e deformidade de Madelung.

A grande variabilidade nas alterações fenotípicas, é reconhecida na literatura (AUGER *et al.* 2016; ROSS *et al.* 2015; ROSILIO *et al.* 2012).

A hereditariedade tem se mostrado uma questão importante nas anomalias do gene *SHOX*. No presente estudo, foi possível avaliar os progenitores de 5 das 7 participantes que apresentaram alteração do *SHOX*. A transmissão familiar foi verificada em 3 delas, todas com

microdeleção. Esta porcentagem de hereditariedade verificada, 50% dos casos avaliados, é concordante com a observada por outros autores (CENSANI *et al.* 2013; ROSS; SCOTT, 2015; LUCCHETTI *et al.* 2018; DEL PINO *et al.* 2019; SUN *et al.* 2019).

Nos casos de microduplicação, não foi observada a transmissão familiar, caracterizando portanto origem esporádica. Porém, esta avaliação foi parcial uma vez que os progenitores de 2 participantes não foram avaliados.

Na literatura existem dois importantes estudos sobre transmissão da alteração dos genitores para os filhos. Na análise feita por Rappold *et al.* (2007), foi observado que quando a alteração estava presente em um dos progenitores, a transmissão paterna foi mais comum, 56% dos casos.

Já no estudo de Salmon-Musial *et al.* (2011) observou-se a transmissão materna em 33,3% dos casos, e paterna em 66,7% dos casos analisados. Sendo assim, a frequência paterna foi o dobro da frequência materna. Além disso, foi detectada a hereditariedade em 61,11% dos casos, acompanhado do fenótipo DLW e baixa estatura, o que confirma que o fenótipo mesmo variável está presente e deve ser levado em conta, reafirmando a importância da investigação dos progenitores (RAPPOLD *et al.* 2007; SALMON-MUSIAL *et al.* 2011).

Em duas participantes a transmissão foi paterna e em uma a transmissão foi materna. O curioso é que nos casos de transmissão paterna, a microdeleção estava presente originalmente no cromossomo Y paterno, evidenciando a ocorrência de recombinação na região PAR1, que transferiu o alelo com deleção para o cromossomo X. Este fato também foi observado em outros estudos (DEL PINO *et al.* 2019; SALMON-MUSIAL *et al.* 2011; SUN *et al.* 2019).

A região PAR1 é considerada a região do genoma com maior frequência de recombinação na meiose masculina, o que torna vulnerável a ocorrência de alterações nos genes localizados nesta região (BENITO-SANZ *et al.* 2011).

Um estudo feito em 11 famílias por Lee *et al.* (2021), mostrou que em todos os familiares as alterações envolviam a mesma região genômica.

A avaliação fenotípica dos familiares com a mesma anomalia pode trazer informações importantes. O fenótipo do pai e filho pode ser variável, como observado por Censani *et al.* (2013) num estudo de caso. A criança nasceu fenotipicamente normal, enquanto seu pai apresentava DLW (CENSANI *et al.* 2013).

Neste panorama, a busca de fatores genéticos associados a baixa estatura idiopática vem se intensificando nas últimas décadas. O estudo do gene *SHOX* mostrou-se importante, pois com sua análise pode-se descartar vários outros fatores, e prescrever o

tratamento correto (BAKIR *et al.* 2018; BUNYAN *et al.* 2013; FREIRE *et al.* 2019).

Este estudo evidenciou que as alterações do gene *SHOX* constituem um fator etiológico importante da BEI no grupo amostral avaliado. Estes resultados salientam a importância do diagnóstico de rotina em crianças com BEI e cariótipo normal.

Nas crianças onde não foram encontradas alterações, o estudo poderia ser continuado através de outras metodologias, avaliando tanto o gene *SHOX*, como outros genes associados a baixa estatura.

Além do mais, uma avaliação genômica mais refinada poderia contribuir para a delimitação da região envolvida na alteração e a caracterização da origem parental, contribuindo para esclarecer os processos relacionados à origem da alteração.

A descrição fenotípica pormenorizada, pode contribuir para a caracterização do espectro fenotípico das anomalias do gene *SHOX*. Além do mais, a avaliação fenotípica dos familiares com a alteração também pode fornecer informações importantes sobre a variabilidade na expressão do gene *SHOX*.

6 CONCLUSÕES

A alteração do gene *SHOX* foi detectada em 19,4% ou num percentual elevado dos participantes, sendo compatível com a literatura estudada.

Foram detectadas microdeleções (57,14%) e microduplicações (42,85%) apenas em participantes do sexo feminino.

A hereditariedade foi caracterizada em 75% dos casos de microdeleção, sendo verificada em 3 das 4 analisadas. Em dois casos, a transmissão foi paterna, sendo a deleção presente originalmente no cromossomo Y do progenitor, evidenciando a recombinação meiótica.

Nos casos de microduplicação não foi observada hereditariedade, caracterizando a origem esporádica da alteração.

Não houve diferença no escore z entre os participantes com alteração de *SHOX* e aqueles que a alteração não foi encontrada. Tampouco houve diferenças entre os indivíduos com microdeleção e microduplicação do *SHOX*.

Todas as participantes com alteração de *SHOX* apresentavam importantes manifestações fenotípicas, incluindo alterações ósseas e articulares, dificuldade de mobilidade. A deformidade de Madelung foi identificada em 6 das 7 participantes com anomalia de *SHOX*.

A amplitude das manifestações fenotípicas foi maior nas participantes com microduplicação de *SHOX*. Esta diversidade de alterações, é compatível também com a literatura, que registra muitas alterações incomuns.

7 SUGESTÕES E LIMITAÇÕES

A principal limitação do trabalho foi quanto ao número de participantes, principalmente meninos, com um n maior a caracterização das alterações fenotípicas seria mais robusta.

Além disso, o estudo dos demais progenitores dos participantes com alteração de *SHOX* seria muito enriquecedor para o trabalho.

8 BIBLIOGRAFIA

- AIASSA, D. *et al.* Turner's syndrome 45,X/46,Xdel(X)(q21): a case report. *Arch. Arq Ped.* 111(1):21-23, 2013.
- ALEXANDER, A. *et al.* Baixa Estatura por Haploinsuficiência do Gene *SHOX*: do Diagnóstico ao Tratamento. *Arq. Bras. End. Metab.* 52(5): 765-773, 2008.
- ARAÚJO, C. de *et al.* Características clínicas e citogenéticas da síndrome de Turner na região Centro-Oeste do Brasil. *Rev. Bras. Gine. Obstet.* 32 (8): 381-385, 2010.
- ASSIS, A. M. O.; CONCEIÇÃO, S. M.; BARRETO, M. L. Determinantes dos déficits ponderal e de crescimento linear de crianças menores de dois anos. *Rev Saúde Pública*, 40(5):874-82, 2006.
- AUGER, J. *et al.* Genotype-Phenotype Relationship in Patients and Relatives with *SHOX* Region Anomalies in the French Population. *Hormone Research in Paediatrics*, v. 86, n. 5, p. 309–318, 2016.
- BABU, D. *et al.* Variants in the 5'UTR Reduce *SHOX* Expression and Contribute to *SHOX* Haploinsufficiency. *European Journal of Human Genetics*, v. 29, n. 1, p. 110–121, jan. 2021.
- BAGSHAW, A.T.M Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. *Gen.Biol. and Ev.*9(9):2428–2443, 2017.
- BAKIR, A. *et al.* Microdeletion and Mutation Analysis of the *SHOX* Gene in Patients with Idiopathic Short Stature with FISH and Sequencing. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, v. 48, n. 2, 30 abr. 2018.
- BENITO-SANZ, S. *et al.* Characterization of *SHOX* Deletions in Léri-Weill Dyschondrosteosis (LWD) Reveals Genetic Heterogeneity and No Recombination Hotspots. *The American Journal of Human Genetics*, v. 79, n. 2, p. 409–414, ago. 2006.
- BENITO-SANZ, S. *et al.* Clinical and Molecular Evaluation of *SHOX*/PAR1 Duplications in Léri-Weill Dyschondrosteosis (LWD) and Idiopathic Short Stature (ISS). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 96, n. 2, p. E404– E412, 1 fev. 2011.
- BENITO-SANZ, S. *et al.* Identification of 15 Novel Partial *SHOX* Deletions and 13 Partial Duplications, and a Review of the Literature Reveals Intron 3 to Be a Hotspot Region. *Journal of Human Genetics*, v. 62, n. 2, p. 229–234, fev. 2016.
- BINDER, G. *et al.* Short stature due to *SHOX* deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Horm. Res. Ped.* 75(2): 81-89, 2011.

- BINDER G, RAPPOLD GA. *SHOX* Deficiency Disorders. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
- BINDER, G. *et al.* *SHOX* haploinsufficiency and Leri-Weill dyschondrosteosis: prevalence and growth failure in relation to mutation, sex, and degree of wrist deformity. *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism*. 89(9): 4403- 4408, 2004.
- BLASCHKE RJ *et al.* Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner Syndrome homeobox gene *SHOX*. *J Biol Chem* 278:47820-47826, 2003.
- BONDY, C. Care of Girls and Women with Turner Syndrome: A Guideline of the Turner Syndrome. *The J. l Clin. End. & Met.*, 92(1), 10–25, 2007.
- BUNYAN, DJ *et al.* Diagnostic screening identifies a wide range of mutations involving the *SHOX* gene, including a common 47,5kb deletion 160kb downstream with a variable phenotypic effect. *Am. J. Med Genet. PartA* 161A:1329-1338, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas, Síndrome de Turner.
- CENSANI, M. *et al.* Rare Inheritance of Leri-Weill Syndrome Due to Crossover of Short Stature Homeobox Gene (*SHOX*) Deletions between X and Y Chromosomes: A Case Report. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, v. 2013, n. 1, p. 11, dez. 2013.
- CHIANESE, C. *et al.* Y-chromosome microdeletions are not associated with *SHOX* haploinsufficiency. *Human Reproduction*, v. 28, n. 11, p. 3155–3160, 2013.
- CLINVAR. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>>
- CLEMENT-JONES,M *et al.* The short stature homeobox gene *SHOX* is involved in skeletal abnormalities in Turner Syndrome. *Hum Mol Genet* (9): 695-702, 2000.
- COHEN, P *et al.* ; Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation *Growth Horm IGF Res*. 2008; 18(2):89-110.
- COLLETT-SOLBERG, P. F. O teste de geração de IGF-I e a velocidade de crescimento em resposta ao tratamento com hGH na Síndrome de Turner. Tese de Doutorado— [s.l: s.n.].
- COSTA, M. *et al.* Baixa Estatura e haploinsuficiência do gene *SHOX*. *NASCER E CRESCER- BIRTH AND GROWTH MEDICAL JOURNAL*, v. 23, n. 4, p. 207–210, 2014.
- CYTOCELL C2022. Disponível em: <<https://www.ogt.com/products/product-search/cytoCELL-shox/>>
- DAUBER, A. Genetic Evaluation of Short Stature. *The Journal of Clinical Endocrinology &*

- Metabolism*, v. 99, n. 9, p. 3080–3092, 1 set. 2014.
- DAY, G. *et al.* *SHOX* Gene Is Expressed in Vertebral Body Growth Plates in Idiopathic and Congenital Scoliosis: Implications for the Etiology of Scoliosis in Turner Syndrome: *SHOX* Gene AND Scoliosis in Turner Syndrome. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 27, n. 6, p. 807–813, jun. 2009.
- DE LIMA, R. Estudo do gene *SHOX* em casos de discondrosteose de Léri Weill e displasia mesomélica de Langer. 2010. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- DECKER, E. *et al.* FGFR3 Is a Target of the Homeobox Transcription Factor *SHOX* in Limb Development. *Human Molecular Genetics*, v. 20, n. 8, p. 1524–1535, 15 abr. 2011.
- DEL PINO, M. *et al.* *SHOX* Deficiency in Argentinean Cohort: Long-Term Auxological Follow-Up and a Family's New Mutation. *Journal of Pediatric Genetics*, v. 08, n. 03, p. 123–132, set. 2019.
- DORFMAN, L. *et al.* Microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances. *J Pediatr (Rio J)*. 91: 59-67, 2014.
- ELLISON, J. PHOG, a Candidate Gene for Involvement in the Short Stature of Turner Syndrome. *Human Molecular Genetics*, v. 6, n. 8, p. 1341–1347, 1 ago. 1997.
- ESTER, W. A. *et al.* Two Short Children Born Small for Gestational Age with Insulin- Like Growth Factor 1 Receptor Haploinsufficiency Illustrate the Heterogeneity of Its Phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 94, n. 12, p. 4717–4727, 1 dez. 2009.
- FAIENZA, M. F. *et al.* Growth Plate Gene Involvement and Isolated Short Stature. *Endocrine*, v. 71, n. 1, p. 28–34, jan. 2021.
- FANELLI, A. *et al.* Copy Number Variations Residing Outside the *SHOX* Enhancer Region Are Involved in Short Stature and Léri-Weill Dyschondrosteosis. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, v. 10, n. 1, jan. 2022.
- FINKEN MJJ, VAN DER STEEN M, SMEETS CCJ, WALENKAMP MJE, DE BRUIN C, HOKKEN-KOELEGA ACS, WIT JM. Children born small for gestational age: Differential diagnosis, molecular-genetic evaluation and implications. *Endocr Rev*. 2018;39(6):851–894.
- FONTELES, A. V. R. Uso de GH e esteróides anabolizantes na Síndrome de Turner. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- FREIRE, B. L. *et al.* Multigene Sequencing Analysis of Children Born Small for Gestational Age With Isolated Short Stature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*,

v. 104, n. 6, p. 2023–2030, 1 jun. 2019.

- FUKAMI, M.; SEKI, A.; OGATA, T. *SHOX* Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Nonsyndromic Short Stature. *Molecular Syndromology*, v. 7, n. 1, p. 3–11, 2016.
- FUNARI, M. F. A. *et al.* Evaluation of *SHOX* Defects in the Era of Next-generation Sequencing. *Clinical Genetics*, v. 96, n. 3, p. 261–265, set. 2019.
- FUNARI, M. F. de A. Identificação de deleções do gene *SHOX*: comparação das técnicas de FISH, análise de microssatélites e MLPA. 2009. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- GEHRING *et al.* Homeodomain-DNA Recognition. *Cell*, v. 78, p. 211–223, 29 jul. 1994.
- GENECARDS. C2017. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SHOX>>
- GERVASINI, C. *et al.* *SHOX* Duplications Found in Some Cases with Type I Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome. *Genetics in Medicine*, v. 12, n. 10, p. 634–640, out. 2010.
- GUILHERME, R. *et al.* Human Ring Chromosomes – New Insights for their Clinical Significance. *Balk. J. Med. Gen.* 16 (1): 13-19, 2013.
- GUEDES, A. D. *et al.* O hormônio de crescimento na síndrome de Turner: dados e reflexões. *Arq. Bras. End. Metab.* 52 (5): 757-764, 2008.
- GUIMARÃES, M. M. *et al.* Intercorrências clínicas na síndrome de Turner. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 45, p. 331–338, 2001.
- GÜRSOY, S. *et al.* Detection of *SHOX* Gene Variations in Patients with Skeletal Abnormalities with or without Short Stature. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, v. 12, n. 4, p. 358–365, 25 nov. 2020.
- GRANGER, A *et al.* Anatomy of turner syndrome. *Clin. Anat.* 9 (5): 638–642, 2016.
- HATTORI, A. *et al.* Pseudoautosomal gene *SHOX* exhibits sex-biased random monoallelic expression and contributes to sex difference in height. [s.l.] *Genetics*, 23 ago. 2021.
- HIRSCHFELDOVA, K.; SOLC, R. Comparison of *SHOX* and Associated Elements Duplications Distribution between Patients (Léri-Weill Dyschondrosteosis/Idiopathic Short Stature) and Population Sample. *Gene*, v. 627, p. 164–168, set. 2017.
- HOMMA, T. K. *et al.* Recurrent Copy Number Variants Associated with Syndromic Short Stature of Unknown Cause. *Hormone Research in Paediatrics*, v. 89, n. 1, p. 13–21,

2018.

- HUBER, C. *et al.* High Incidence of *SHOX* Anomalies in Individuals with Short Stature. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 9, p. 735–739, 5 abr. 2006.
- ISCN. An International System for Human Cytogenetics Nomenclature: Birth Defects. *J. McGowan-Jordan, A. Simons, M. Schmid (eds); S. Karger, New York. [s.l.: s.n.]*.
- JORGE, A. A. L. *et al.* Baixa estatura por haploinsuficiência do gene *SHOX*: do diagnóstico ao tratamento. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 52, n. 5, p. 765–773, jul. 2008.
- JUNG, M. DE P. *et al.* Diagnóstico da Síndrome de Turner: a experiência do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia-Rio de Janeiro, de 1970 a 2008. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 10, p. 117–124, 2010.
- KANT, S. G. *et al.* The Jumping *SHOX* Gene—Crossover in the Pseudoautosomal Region Resulting in Unusual Inheritance of Leri-Weill Dyschondrosteosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 96, n. 2, p. E356–E359, 1 fev. 2011.
- KURNAZ, E. *et al.* *SHOX* Gene Deletion Screening by FISH in Children with Short Stature and Madelung Deformity and Their Characteristics. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, v. 0, n. 0, 17 out. 2018.
- LAUS, A. C. Caracterização citogenética molecular de cromossomos marcadores extranumerários. 2008.
- LEE, J.-S. *et al.* Clinical and Genetic Characteristics of 23 Korean Patients with Haploinsufficiency of the Short-Stature Homeobox-Containing Gene. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, v. 129, n. 08, p. 611–620, ago. 2021.
- LEKA, S. *et al.* Short Stature and Dysmorphology Associated with Defects in the *SHOX* Gene. *HORMONES*, v. 5, n. 2, p. 107–118, 15 abr. 2006.
- LERI A, WEILL J. Une affection congénitale et symétrique du développement osseux: la dyschondrosteose. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris* 53: 1491-1494, 1929.
- LUCCHETTI, L. *et al.* Report of a Novel *SHOX* Missense Variant in a Boy With Short Stature and His Mother With Leri–Weill Dyschondrosteosis. *Frontiers in Endocrinology*, v. 9, p. 163, 10 abr. 2018.
- MARQUI, A. B. T. de. Turner syndrome and genetic polymorphism: a systematic review. *Rev. Paul. Pediatr.* 33 (3): 364-371, 2015.
- MARCHINI, A. *et al.* The Short Stature Homeodomain Protein *SHOX* Induces Cellular Growth Arrest and Apoptosis and Is Expressed in Human Growth Plate Chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 35, p. 37103–37114, ago. 2004.

- MARCHINI, A.; OGATA, T.; RAPPOLD, G. A. A Track Record on *SHOX*: From Basic Research to Complex Models and Therapy. *Endocrine Reviews*, v. 37, n. 4, p. 417–448, 1 ago. 2016.
- MARSTRAND-JOERGENSEN, M. R. *et al.* Prevalence of *SHOX* Haploinsufficiency among Short Statured Children. *Pediatric Research*, v. 81, n. 2, p. 335–341, fev. 2017.
- MARTINS, S. *et al.* Investigação clínica e genética em meninas com baixa estatura idiopática. *Arq. Bras. End. Metab.* 47 (6): 684-694, 2003.
- MARTÍN-BEGUÉ, N. *et al.* Growth Hormone Treatment and Papilledema: A Prospective Pilot Study. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, v. 13, n. 2, p. 146–151, 1 jun. 2021.
- MENDES, A. K. DA S. *O MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) e o aCGH (array Comparative Genomic Hybridization) no diagnóstico de alterações cromossômicas.* Dissertação de Mestrado—[s.l: s.n.]. 2012.
- MOORHEAD, P. S. *et al.* Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Experimental Cell Research*, v. 20, n. 3, p. 613–616, set. 1960.
- MUNNS, C. J. F. *et al.* Expression of *SHOX* in Human Fetal and Childhood Growth Plate. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 89, n. 8, p. 4130–4135, 1 ago. 2004.
- MÜSEBECK, J. *et al.* Short Stature Homeobox-Containing Gene Deletion Screening by Fluorescence in Situ Hybridisation in Patients with Short Stature. *European Journal of Pediatrics*, v. 160, n. 9, p. 561–565, set. 2001.
- NOWOSAD, K.; HORDYJEWSKA-KOWALCZYK, E.; TYLZANOWSKI, P. Mutations in Gene Regulatory Elements Linked to Human Limb Malformations. *Journal of Medical Genetics*, v. 57, n. 6, p. 361–370, jun. 2020.
- OLIVEIRA, C. S.; ALVES, C. The Role of the *SHOX* Gene in the Pathophysiology of Turner Syndrome. *Endocrinología y Nutrición*, v. 58, n. 8, p. 433–442, out. 2011.
- PINKEL D, LANDEGENT J, COLLINS C, FUSCOE J, SEGRAVES R, LUCAS J, *et al.* Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(23):9138-42; 1988.
- PINHEIRO, V. S. *Terapia hormonal e enzimas hepáticas em pacientes com síndrome de Turner.* Dissertação de Mestrado—[s.l: s.n.].
- PONTECORVI, P. *et al.* Protein–Protein Interaction Network Analysis Applied to DNA Copy Number Profiling Suggests New Perspectives on the Aetiology of Mayer–Rokitansky–

- Küster–Hauser Syndrome. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 448, 11 jan. 2021.
- PORTES, E. S.; JORGE, A. A. DE L.; MARTINELLI JR, C. E. Tratamento com hormônio de crescimento: aspectos moleculares, clínicos e terapêuticos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 52, n. 5, p. 715–716, 2008.
- RAMIREZ, J. M. *et al.* *SHOX* Duplication and Tall Stature in a Patient with Xq Deletion and Vascular Disease. *Case Reports in Genetics*, v. 2019, p. 1–7, 8 abr. 2019.
- RAO, E. *et al.* FISH-Deletion Mapping Defines a 270-Kb Short Stature Critical Interval in the Pseudoautosomal Region PAR1 on Human Sex Chromosomes. *Human Genetics*, v. 100, n. 2, p. 236–239, 9 jul. 1997.
- RAPPOLD, G. *et al.* Genotypes and Phenotypes in Children with Short Stature: Clinical Indicators of *SHOX* Haploinsufficiency. *Journal of Medical Genetics*, v. 44, n. 5, p. 306–313, 1 maio 2007.
- RAPPOLD, G. A. *et al.* Deletions of the Homeobox Gene *SHOX* (Short Stature Homeobox) Are an Important Cause of Growth Failure in Children with Short Stature. mar. 2002.
- ROSAS, A. O. *et al.* Artrite crônica e baixa estatura em criança com mutação *SHOX*. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 57, p. S308, 2017.
- ROSS, J. L.; SCOTT, C. Phenotypes Associated with *SHOX* Deficiency. p. 7, 12 nov. 2015.
- ROSILIO, M. *et al.* Genotypes and Phenotypes of Children with *SHOX* Deficiency in France. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 97, n. 7, p. E1257– E1265, 1 jul. 2012.
- SADLER, B. *et al.* Rare and de Novo Duplications Containing *SHOX* in Clubfoot. *Journal of Medical Genetics*, v. 57, n. 12, p. 851–857, dez. 2020.
- SAENGER, P. *et al.* Small for Gestational Age: Short Stature and Beyond. *Endocrine Reviews*, v. 28, n. 2, p. 219–251, 1 abr. 2007.
- SALMON-MUSIAL, A.-S. *et al.* Clinical and Radiological Characteristics of 22 Children with *SHOX* Anomalies and Familial Short Stature Suggestive of Léri- Weill Dyschondrosteosis. *Hormone Research in Paediatrics*, v. 76, n. 3, p. 178– 185, 2011.
- SANTOS, E. Maria M. MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. *Gr. bras. est.de tum.her.* 4 (36) 2006.
- SANTOS, L. O. Estudo do gene *SHOX* em pacientes com baixa estatura associada ou não a malformações esqueléticas encaminhadas com suspeita clínica da síndrome de Turner, 31 jan. 2013.
- SANTOS, V. *et al.* Síndrome de Turner da criança ao adulto. Uma Abordagem Multidisciplinar. *Acta. Med. Port.* 2010 (23): 873-882, 2009.

- SCHNEIDER, K. U. *et al.* Identification of a Major Recombination Hotspot in Patients with Short Stature and *SHOX* Deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, v. 77, n. 1, p. 89–96, jul. 2005.
- SCHWARTZ, I. Vanessa *et al.* Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas, Síndrome de Turner. *Portaria SAS/MS*. (223): 563-577, 2010.
- SEABRIGHT, Marina. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*:298(7731) 971-972, 1971.
- SELOW, M. L. C. *et al.* A síndrome de turner em odontologia. *Dens*, v. 14, n. 2, 2006.
- SHUJAA-ADDIN, A. *et al.* Detection of *SHOX* Gene Deletions in Egyptian Children with Idiopathic Short Stature Using FISH. *Meta Gene*, v. 24, p. 100697, jun. 2020.
- SISLEY, S. *et al.* Low Incidence of Pathology Detection and High Cost of Screening in the Evaluation of Asymptomatic Short Children. *The Journal of Pediatrics*, v. 163, n. 4, p. 1045–1051, out. 2013.
- SPURNA, Z. *et al.* Clinical Impact of Variants in Non-Coding Regions of *SHOX* – Current Knowledge. *Gene*, v. 818, p. 146238, abr. 2022.
- STRITAR, J. *et al.* Detection of Del/Dup Inside *SHOX*/PAR1 Region in Children and Young Adults with Idiopathic Short Stature. *Genes*, v. 12, n. 10, p. 1546, 29 set. 2021.
- SUN, Y. *et al.* Heterozygous Deletion of the *SHOX* Gene Enhancer in Two Females With Clinical Heterogeneity Associating With Skewed XCI and Escaping XCI. *Frontiers in Genetics*, v. 10, p. 1086, 6 nov. 2019.
- SOLBERG, P. F C. O teste de geração de IGF-I e a velocidade de crescimento em resposta ao tratamento com hGH na Síndrome de Turner. Orientadora: Marília Martins Guimarães. 2006. 87p. Dissertação (Doutorado em endocrinologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- TARTAGLIA, N. *et al.* The eXtraordinary Kids Clinic: an interdisciplinary model of care for children and adolescents with sex chromosome aneuploidy. *Journal of multidisciplinary healthcare*, v. 8, p. 323–334, 17 jul. 2015.
- TROPEANO, M. *et al.* Microduplications at the Pseudoautosomal *SHOX* Locus in Autism Spectrum Disorders and Related Neurodevelopmental Conditions. *Journal of Medical Genetics*, v. 53, n. 8, p. 536–547, ago. 2016.
- TUKIAINEN T. *et al.* Landscape of X chromosome inactivation across human tissues . *Nature*, 550(7675):244-248 2017.
- VALETTO, A. *et al.* Short Stature in Isodicentric Y Chromosome and Three Copies of the *SHOX* Gene: Clinical Report and Review of Literature. *Molecular Syndromology*, v. 7,

n. 1, p. 19–25, 12 mar. 2016.

VANNELLI, S. *et al.* *SHOX* Deficiency in Children with Growth Impairment: Evaluation of Known and New Auxological and Radiological Indicators. *Italian Journal of Pediatrics*, v. 46, n. 1, p. 163, dez. 2020.

VASQUES, G. A.; ANDRADE, N. L. M.; JORGE, A. A. L. Genetic Causes of Isolated Short Stature. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, v. 63, n. 1, p. 70–78, fev. 2019.

VERDIN, H. *et al.* Profiling of Conserved Non-Coding Elements Upstream of *SHOX* and Functional Characterisation of the *SHOX* Cis-Regulatory Landscape. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 17667, nov. 2016.

WOLTERS, B. *et al.* Short Stature before Puberty: Which Children Should Be Screened for *SHOX* Deficiency? *Hormone Research in Paediatrics*, v. 80, n. 4, p. 273–280, 2013.

WOOLFE, A. *et al.* Highly Conserved Non-Coding Sequences Are Associated with Vertebrate Development. *PLoS Biology*, v. 3, n. 1, p. e7, 11 nov. 2004.

XIE, S. *et al.* The Effects of the X Chromosome on Intrinsic Functional Connectivity in the Human Brain: Evidence from Turner Syndrome Patients. *Cerebral Cortex*, v. 27, n. 1, p. 474–484, 1 jan. 2017.

XU, X.-J. *et al.* Establishment of *SHOX* CNE9/10 Knock-out Osteosarcoma U2OS Cell and Its Effects on Cell Growth and Apoptosis. *Medical Science Monitor*, v. 26, 1 fev. 2020.

ZHAO, Z.M. *et al.* . *Mol. Biol. Evol.* 34 (11): 3006-3022, 2017.

ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer do comitê de ética.

INSTITUTO DE PUERICULTURA E
PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA - RJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE CITOMOLECULAR DE SÍNDROMES DE MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES NO SERVIÇO DE GENÉTICA DO INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA- UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Pesquisador: MARIA CECILIA MENKS RIBEIRO

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;)

Versão: 2

CAAE: 47337715.6.0000.5264

Instituição Proponente: Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira - RJ

Patrocinador Principal: Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira - RJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.262.446

Apresentação do Projeto: O projeto está bem apresentado

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar uma coorte selecionada de pacientes acompanhados no serviço de Genética Médica do IPPMG/UFRJ com suspeita clínica de microdeleções/ microduplicações, determinando a prevalência destas condições na população atendida e a variabilidade das características clínicas confirmadas por métodos citomoleculares

Objetivo secundário

Identificar indivíduos com suspeita clínica de microdeleções/ microduplicações específicas; Detectar microdeleções/ microduplicações específicas através da técnica de FISH; Implementar a metodologia de q-PCR para a detecção de microdeleções/ microduplicações específicas, buscando padrões de qualidade necessários para utilização clínica;

Avaliar a hereditariedade das alterações através do estudo dos pais e/ou outros

familiares; Avaliar a origem parental das alterações detectadas;

Avaliar a variabilidade fenotípica entre pacientes com a mesma alteração genômica, comparando os achados observados nos indivíduos com a literatura;

Determinar a prevalência de cada condição na população avaliada;

TCLE

Avaliação dos riscos e benefícios:

Os riscos são mínimos decorrentes de punção venosa e está bem descrito no

Comentários e considerações sobre a pesquisa:

Trata-se de correção de pendência. Está esclarecida e os termos foram modificados na 2º versão

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos foram todos apresentados

Recomendações:

Recomendo aprovação

Conclusões ou Pendências e Listas de Inadequações:

Sem pendências

Considerações finais a critério do CEP:

Avaliado em reunião do CEP de 22/09/2015

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_510410.pdf	14/09/2015 11:40:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto microdel.pdf	14/09/2015 11:39:23	MARIA CECILIA MENKS RIBEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	MicrodelTCLE.pdf	14/09/2015 11:37:45	MARIA CECILIA MENKS RIBEIRO	Aceito
Folha de Rosto	plataforma brasil- rosto.pdf	08/07/2015 14:09:43		Aceito

Situação do parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 06 de Outubro de 2015

Assinado por:

Alexandra Pruber de Queiroz Campos Araujo (Coordenador)

APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Informações aos pais / responsáveis
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA



PROJETO:

“ANÁLISE CITOMOLECULAR DE SÍNDROMES DE MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES NO SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA DO INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO”

CONVITE:

Seu(a) filho(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa. Antes de se decidir se seu(a) filho(a) participará, é importante que você entenda porque o estudo está sendo feito e o que ele envolverá. Reserve um tempo para ler cuidadosamente as informações a seguir e discuta-as com outras pessoas e seu médico, se desejar. Faça perguntas se algo não estiver claro ou se quiser mais informações. Não tenha pressa de decidir se deseja ou não que sua filho(a) participe deste estudo.

A pesquisa é sobre diagnóstico citomolecular de Síndromes de Microdeleção e Microduplicação cromossômica em pacientes com suspeita clínica ou com diagnóstico destas condições atendidos no ambulatório de genética do IPPMG, ou seja, vamos estudar pacientes com alterações nos cromossomos, que representam o DNA do nosso organismo.

Com este estudo vamos procurar alterações genômicas (do DNA) que podem estar presentes em pessoas que apresentam as características observadas no seu filho, utilizando os recursos adequados.

A primeira frente de atuação é a de proporcionar o diagnóstico adequado e a segunda, de aprofundar o conhecimento sobre estas alterações, possibilitando também aperfeiçoar os exames usados para fazer o diagnóstico.

Depois vamos verificar as características dos pacientes com as mesmas alterações e compará-las com o que já existe nos livros e artigos científicos, já que o fenótipo (aparência) nestes pacientes é extremamente variável.

Quando for encontrada alguma alteração também iremos estudar os pais para determinar a herança (herdabilidade e origem parental), assim podemos aprender um pouco mais sobre a forma como estas alterações se originam.

Seu(a) filho(a) foi escolhido(a) por apresentar características que sugerem uma destas alterações que estão sendo pesquisadas. Você decide se gostaria que seu(a) filho(a) participasse ou não deste estudo. Se decidir deixar seu(a) filho(a) participar você receberá esta folha de informações para guardar e deverá assinar um termo de consentimento. Mesmo se você decidir deixar seu(a) filho(a) participar, você ainda tem a liberdade de retirá-lo(a) do estudo a qualquer momento e sem dar justificativa. Isso não afetará o padrão de cuidados que seu(a) filho(a) receberá.

A participação de seu(a) filho(a) ajudará a entendermos melhor estas doenças. Só será necessária a obtenção de 5 ml de sangue da criança e seus pais. Esta quantidade de sangue não traz prejuízo nenhum para

a saúde. Pode ocorrer incômodo na hora da entrada da agulha para a coleta do sangue e também existe a possibilidade de ficar uma mancha roxa no local da coleta de sangue. Caso aconteça, a senhora será orientada em relação aos cuidados necessários. Também faremos fotografias da criança sem tampar seus olhos, pois muitas vezes a alteração da aparência está no rosto.

Não existem efeitos colaterais ao participar do estudo e isto que está sendo feito tem o benefício de aprofundar o conhecimento no problema do seu(a) filho(a) e mostrar como ele(a) se comporta para outros

Av. Brigadeiro Trompowsky s/ n – Cidade Universitária – Ilha do Fundão – cep 21.941-590 Tel : 21-2590-4891 / 2562-6153 Fax: 2590-4891

profissionais que trabalham na área da saúde

As informações serão repassadas aos médicos que o(a) atendem ao término do estudo e eles decidirão, junto com os pais e/ou responsáveis, se ficarão disponíveis nos prontuários.

Como é um estudo em que as técnicas estão sendo padronizadas pela primeira vez no Laboratório, a única possibilidade de erro será no decorrer do procedimento da técnica e a realização de nova coleta e de sangue será decidida pelos pais e/ou responsáveis.

Sua participação será mantida em sigilo, como qualquer pesquisa realizada, e os resultados do estudo laboratorial / clínico serão repassados aos pais e/ ou responsáveis através dos médicos que atendem o(a) seu(a) filho(a).

Este estudo foi revisado pelo seguinte Comitê de Ética em Pesquisa:

Nome: Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira

Endereço: Rua Bruno Lobo 50, Ilha do Fundão–Cidade Universitária–Rio de Janeiro– RJ.

E recebeu parecer favorável na reunião realizada em :

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável. Se você precisar de informações adicionais sobre a participação no estudo, sobre os direitos de seu(a) filho(a) ou sobre possíveis efeitos colaterais, ligue para o médico:

Profª Drª : Márcia Gonçalves Ribeiro

Em: Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira / Universidade Federal do Rio de Janeiro. Telefone: 21 3938-4700

Ou

Profª Drª Maria Cecilia Menks Ribeiro

Em: Laboratório de Genética do IPPMG; Universidade Federal do Rio de Janeiro Telefone: 21 98766-2214

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira/Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rua Bruno Lobo, 50/terceiro andar, Cidade Universitária/Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, pelo telefone (21)3938-4916 de segunda à sexta-feira das 8 às 15h..

É garantida a liberdade de querer não participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Nenhum incentivo ou recompensa financeira está previsto pela participação de seu(a) filho(a) neste estudo de pesquisa laboratorial / clínico, se houver a necessidade de se locomover até o local da pesquisa,

seus gastos com transporte e alimentação serão reembolsados mediante apresentação de recibos.

Obrigado por ler estas informações. Se desejar que seu(a) filho(a) participe deste estudo, assine o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em anexo, e devolva-o ao Médico do Estudo. Você deve guardar uma cópia destas informações e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para seu próprio registro.

Nome dos pais / responsáveis legais:

Assinatura: _____ Data:

Nome dos pais / responsáveis legais:

Assinatura: _____ Data:

Nome da pessoa que obteve o consentimento:

Assinatura: _____ Data:

Observação: Duas cópias devem ser feitas: uma para o paciente e outra para o pesquisador.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO “Identificação de cromossomos citogeneticamente inconclusivos

através de hibridação in situ fluorescente”

Local: Serviço de Genética Médica do IPPMG

Nomes dos investigadores : Márcia Gonçalves Ribeiro, Maria Cecilia Menks Ribeiro,
Sandra Alves Peixoto Pellegrini

Nome do paciente: _____

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o Dr. _____ ,
sobre a decisão de meu filho(a) em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do meu filho(a) é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Concordo que nosso médico de tratamento primário (pediatra) seja informado por escrito sobre a participação de meu(minha) filho(a) neste estudo laboratorial / clínico. Isso pode incluir outros médicos que não estejam envolvidos no estudo clínico que podem tratar de seu(a) filho(a).

Nome dos pais / responsáveis legais :

Assinatura : _____ Data : _____

Nome dos pais / responsáveis legais :

Assinatura : _____ Data : _____

Nome da pessoa que obteve o consentimento:

Assinatura : _____ Data : _____

Observação : Duas cópias devem ser feitas: uma para o paciente e outra para o pesquisador.

APÊNDICE 2 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS PARTICIPANTES COM ALTERAÇÃO *SHOX*

Participante 1: baixa estatura desproporcionada, macrocefalia relativa, face atípica, fronte ampla e proeminente, cabelos com implantação frontal alta, telecanto, hipertelorismo ocular, lábio superior fino, filtro apagado. Pescoço e tórax sem dismorfias. Apresentou mesomelia, deformidade de Madelung com limitação da supinação, e (alteração no dedo do pé). Foi detectada microdeleção de *SHOX*. A análise citogenética dos pais evidenciou microdeleção de *SHOX* no cromossomo Y do pai. A mãe apresentou mosaicismo 45,X/46,XX.

Participante 2: Apresentou miocardiopatia dilatada, bexiga hiperativa, braquidactilia, aumento do espaço entre 1° e 2° dedos dos pés e clinodactilia nos 2° dedos. Hipertelorismo ocular e pescoço discretamente alado. Foi detectada microduplicação de *SHOX*. Não foi possível averiguar a hereditariedade.

Participante 3: não apresentou dismorfias craniofaciais. Cavidade oral sem alterações, tronco sem assimetrias. Encurtamento do antebraço direito, mais acentuado que o do antebraço esquerdo. Encurtamento de 4° e 5° metacarpianos direito. Manchas café com leite no dorso e joelho direito. Nevus no tornozelo esquerdo. Foi detectada microdeleção de *SHOX*. Não foi possível averiguar a hereditariedade.

Participante 4: apresenta macrocefalia relativa, fronte proeminente, baixa estatura desproporcional, encurtamento rizomélico mais importante que mesomélico, sem restrição articular, deformidade de Madelung, braquidactilia e hipertelorismo. Participante com microduplicação de *SHOX*. Estudo realizado nos pais não evidenciou alteração.

Participante 5: apresenta microcefalia, atraso de desenvolvimento puberal, miopatia, artropatia crônica, deformidade de Madelung, lipodistrofia, dislipidemia, baixa implantação de cabelo. Paciente com microduplicação de *SHOX*. Exame realizado nos pais não apresentou alteração.

Participante 21: possui polegares baixo implantados, discreto encurtamento 4° e 5° metacarpos, restrição de rotação externa de antebraço, afastamento de 1° e 2° pododactilo bilateral, tórax estreito, falanges distais das mãos estreitas, envergadura de rádio bilateral. Paciente com microdeleção de *SHOX*. Detectada microdeleção de *SHOX* no cromossomo do Y pai.

Participante 36: Apresenta baixa estatura desproporcional, encurtamento mesomélico de membros, mais acentuadamente membros superiores. Apresenta limitação de movimentos de cotovelos e estalos nos movimentos de pronação/supinação de punhos. Encurtamento

mesomélico de rádio e ulna com deformidade de Madelung. Sem dismorfias craniofaciais.
Paciente com microdeleção *SHOX*. Microdeleção herdada da mãe.

GLOSSÁRIO

Alelo - Uma das formas diferentes de um gene que podem existir em um único locus.

Aminoácido - um peptídeo; o bloco estrutural básico das proteínas (ou polipeptídeos).

Anomalias cromossômicas numéricas- alteração na quantidade de cromossomos das células.

Anomalias cromossômicas estruturais- alteração na morfologia e composição de um ou mais cromossomos na células.

Bases nitrogenadas- Monômeros constituintes dos ácidos nucleicos, compostas de estruturas em anel contendo nitrogênio.

Conformação da cromatina- empacotamento dinâmico da molécula de DNA no núcleo celular, influencia a regulação gênica.

Regiões de DNA Conservadas evolutivamente- a sequência de DNA permanece inalterada em organismos relacionados filogeneticamente, evidenciando sua importância no funcionamento do organismo.

Cromossomos autossomos- Cromossomos do genoma similares em indivíduos de sexo diferente.

Cromossomo sexual- Cromossomos que diferem no sexo masculino e feminino, na espécie humana o complemento é XX no sexo feminino e XY no sexo masculino.

Crossing-over desigual- recombinação entre os cromossomos homólogos com alinhamento desigual.

Desnaturação- A separação das duas fitas de uma dupla hélice de DNA sem a quebra de ligações de suas cadeias.

Downstream- Extremidade descendente ou 3' da fita de DNA.

Exon- região codificante da sequência de DNA de um gene; os éxons correspondem ao mRNA que é traduzido em proteína.

Expressão- Manifestação fenotípica do genótipo.

Expressividade variável- Diferenças na manifestação fenotípica de determinado genótipo em diferentes indivíduos.

Extremidade C terminal- Extremidade da cadeia polipeptídica com o grupamento COOH (carboxila).

Fatores epigenéticos- Fatores que modificam a molécula de DNA sem alterar a sequência de nucleotídeos, contribuem para a regulação gênica.

Fatores de transcrição- Proteínas e outras moléculas que se ligam às regiões promotoras do gene e possibilitam a ligação da RNA polimerase que faz a transcrição do DNA em RNA.

Filogeneticamente- relativo a filogenia ou a relação evolutiva entre as espécies.

Genes homeóticos- genes que atuam no desenvolvimento, controlam o destino de segmentos ao longo do eixo anterior-posterior.

Haploinsuficiência- Presença de apenas uma cópia de um gene numa célula diplóide.

Herança multifatorial- Características com alta frequência na população, de prevalência familiar elevada que são condicionadas por diversos genes e influenciadas por fatores ambientais.

Heterozigose- Em células diplóides a presença de informações diferentes nos genes alelos.

Homeodomínio- Família altamente conservada de sequências, com 60 aminoácidos de tamanho e encontrada em genes homeóticos, podem formar estruturas hélice-giro-hélice e se ligar em sequências específicas do DNA.

Inativação do cromossomo X- Processo epigenético pelo qual nas células com mais de um cromossomo X, os genes dos cromossomos X adicionais são desligados como parte do mecanismo de compensação de dose.

Intron - um segmento de DNA que é transcrito e removido da molécula de RNA funcional, não tem função codificante.

Junção de extremidades não homólogas- Fusão de extremidades quebradas do DNA, antes que os fragmentos de DNA se separem e se percam.

Locus- região específica em um cromossomo onde um gene está situado.

Microdeleção - Deleção de um segmento cromossômico de pequena extensão.

mRNA polimerase II- proteína que realiza a transcrição do DNA em RNA mensageiro.

Regiões regulatórias- regiões da extremidade 5' do DNA de um gene, que influenciam a transcrição, através da ligação de diversas proteínas que contribuem para o controle da transcrição.

Ortólogos- Genes conservados evolutivamente que mantêm a mesma sequência de DNA.

Penetrância- A proporção de indivíduos com determinado genótipo que manifestam fenotipicamente.

Posições genômicas- localização dos genes na molécula de DNA.

Recombinação intracromossômica- Recombinação a partir de *crossing-over* entre duas cromátides não irmãs de cromossomos homólogos.

Recombinação meiótica- Processo pelo qual ocorrem trocas de segmentos homólogos entre os cromossomos homólogos paternos e maternos na meiose. Também denominado *crossing-over*.

Recombinação homóloga não alélica- mecanismo de reparo do DNA que envolve a recombinação entre regiões de DNA com homologia.

Região de homologia- Região que possui a mesma sequência de DNA e possibilitam o emparelhamento, através do qual ocorre a recombinação.

Regiões não transcritas- sequências gênicas localizadas antes e depois das regiões transcritas, constituindo as regiões regulatórias do gene.

Repetições Alu- sequências altamente repetitivas de DNA que são clivadas pela enzima de restrição Alu I, é o elemento de repetição entremeadado mais prevalente no genoma humano.

Splicing alternativo- processo pelo qual o processamento do transcrito primário do RNA ocorre em diferentes regiões, levando a síntese de proteínas distintas.

Tradução- Processo mediado por ribossomos e tRNA onde são formados os polipeptídeos nos quais a sequência de aminoácidos é codificada pela sequência de nucleotídeos da molécula de mRNA.

Transcrito- molécula de RNA complementar ao filamento molde de DNA sintetizada pela RNA polimerase.

Upstream- região ascendente ou 5' da molécula de DNA.