

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Curso de Doutorado em Ciências Biológicas

**ESTUDOS CLÍNICO-MOLECULARES DE TRÊS
FAMÍLIAS PERNAMBUCANAS COM
MICROCEFALIA PRIMÁRIA**

Recife
Outubro 2003

Centro de Ciências Biológicas
Curso de Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco

**ESTUDOS CLÍNICO-MOLECULARES DE TRÊS
FAMÍLIAS PERNAMBUCANAS COM
MICROCEFALIA PRIMÁRIA**

Tese apresentada por Gabriela Ferraz Leal ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (área de concentração: Genética).

Orientador: Prof. Elias Oliveira da Silva
(Depto. Genética, UFPE)

**Recife
Outubro 2003**

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Curso de Doutorado em Ciências Biológicas

**ESTUDOS CLÍNICO-MOLECULARES DE TRÊS FAMÍLIAS
PERNAMBUCANAS COM MICROCEFALIA PRIMÁRIA**

Comissão Examinadora

Membros titulares:

Prof. Dr. Elias Oliveira da Silva, Depto. de Genética, CCB, UFPE

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva, Depto. Materno-Infantil, CCS, UFPE

Prof. Dr. João Guilherme Bezerra Alves, Instituto Materno-Infantil de Pernambuco

Prof. Dr. José Ferreira dos Santos, Depto. de Genética, CCB, UFPE

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença, Depto. de Neuropsiquiatria, CCS, UFPE

Membros suplentes:

Profa. Dra. Rosilda dos Santos Silva, Dpto. de Genética, CCB, UFPE

Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior, Dpto. de Genética, CCB, UFPE

Aos pacientes e suas famílias, que têm
me ensinado genética clínica e, muitas vezes,
muito mais do que isso.

AGRADECIMENTOS

Às famílias estudadas neste trabalho, pela confiança e colaboração de tão boa vontade;

Ao Prof. Elias Oliveira da Silva, por mais esta orientação, prolongamento de uma relação orientador/orientanda iniciada desde a época da minha graduação, quando uma de suas aulas me emocionou profundamente e me despertou para a genética médica;

Aos Drs. Christopher Geoffrey Woods e Emma Roberts, da Unidade de Medicina Molecular do Hospital St James (Universidade de Leeds - Inglaterra), por disponibilizar o seu laboratório para o nosso trabalho e pela orientação nos estudos moleculares;

Às Dras. Emma Roberts e Jacquelyn Bond, e a Daniel Hampshire, pela ajuda na iniciação com as técnicas de biologia molecular e os programas de bioinformática;

A Dra. Andréa de Rezende Duarte, colega do Serviço de Genética Médica do Instituto Materno-Infantil de Pernambuco (IMIP), pela convivência agradável e troca de experiências;

A Ana Emília Barros e Silva, pela ajuda na extração de DNA;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para realização dos trabalhos laboratoriais na Universidade de Leeds (Inglaterra);

À Fundação de Saúde Amaury de Medeiros (FUSAM), ao Hospital de Pediatria Helena Moura e ao Instituto Materno-Infantil de Pernambuco (IMIP), pela licença de trabalho concedida;

A Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida e Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, pela concessão do laboratório de Microbiologia para realização das extrações de DNA;

A Marcelo, pela companhia em viagens para obtenção de dados, mas, sobretudo, pela companhia na vida de todos os dias, tornando-a mais colorida e feliz.

SUMÁRIO

| | Pág. |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS | |
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| I. INTRODUÇÃO | 13 |
| II. REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| II.1. Microcefalia | 17 |
| II.2. Etiologia da microcefalia | 19 |
| II.2.1. Microcefalia de etiologia ambiental | 19 |
| II.2.2. Microcefalia de etiologia genética | 21 |
| II.3. Microcefalia primária autossômica recessiva | 22 |
| II.4. Mapeamento por homozigose/autozigose | 24 |
| II.5. Aspectos moleculares da microcefalia primária autossômica recessiva | 25 |
| III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 29 |
| | |
| IV. ARTIGO 1 – Primary Microcephaly: a Clinical Perspective | 36 |
| Abstract | 38 |
| Introduction | 39 |
| Head circumference measurement | 40 |
| The diagnosis of primary microcephaly | 42 |
| Differential diagnosis of primary microcephaly | 43 |
| Autosomal dominant microcephaly | 44 |
| Chromosome anomalies | 45 |
| Microcephaly with normal intelligence | 45 |
| Post-nataly developing microcephaly | 46 |
| Classification of microcephaly | 47 |
| Clinical findings in primary microcephaly | 48 |
| Genetics of primary microcephaly | 51 |
| Primate evolution and primary microcephaly | 53 |
| Conclusions | 54 |

| | |
|------------------|----|
| References | 55 |
| Table 1 | 62 |

V. ARTIGO 2 – A Novel Locus for Autosomal Recessive Primary

| | |
|--|----|
| Microcephaly Maps to 13q12.2. | 63 |
| Abstract (key points) | 65 |
| Introduction | 65 |
| Materials and methods | 66 |
| Subjects | 66 |
| Molecular genetics | 66 |
| Results | 67 |
| Discussion | 68 |
| Acknowledgements | 69 |
| Electronic-Database Information | 69 |
| References | 70 |
| Table 1 | 73 |
| Figure 1 | 74 |
| Figure 2 | 75 |
| Legends of figures | 76 |

VI. ARTIGO 3 – Microcefalia Primária em Três Famílias Consangüíneas:

| | |
|---|----|
| Estudos Clínicos e Moleculares | 77 |
| Resumo | 80 |
| Abstract | 81 |
| Introdução | 82 |
| Pacientes e métodos | 83 |
| Resultados | 83 |
| Estudos clínicos | 83 |
| Estudos moleculares | 85 |
| Discussão | 85 |
| Agradecimentos | 88 |

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Referências bibliográficas | 88 |
| Figura 1 | 91 |
| Figura 2 | 92 |
| Figura 3 | 93 |
| Figura 4 | 94 |
| Legendas das figuras | 95 |
| | |
| VII. CONCLUSÕES GERAIS | 96 |
| | |
| VIII. AS PERSPECTIVAS | 99 |
| | |
| VIII. ANEXOS | 102 |
| Normas das revistas | |
| 1. Journal of Medical Genetics | 103 |
| 2. Jornal de Pediatria | 109 |

RESUMO

Três famílias consanguíneas pernambucanas (famílias 1, 2 e 3) com microcefalia primária autossômica recessiva foram analisadas nos seus aspectos clínicos e, duas delas, submetidas a estudos de ligação. A família 1, a mais extensa delas, continha oito afetados (cinco homens e três mulheres, com idades variando entre 4 e 27 anos) com medidas de perímetro cefálico entre 7 e 10 desvios-padrões abaixo da média populacional para idade e sexo. Na família 2 havia cinco afetados (dois homens e três mulheres, com idades variando de 14 a 25 anos) com medidas de circunferência craniana 4 desvios-padrões abaixo da média. Todos os pacientes dessas duas famílias tinham saúde geral boa e parâmetros do crescimento dentro dos limites da normalidade. A microcefalia acompanhava-se de retardo mental moderado em todos eles, mas nenhuma outra alteração neurológica, dismorfia ou malformação foi observada. Os pais tinham perímetro cefálico e inteligência normais. Exame oftalmológico, estudo cromossômico (400 bandas) e eletroencefalograma realizados em alguns pacientes foram normais e tomografia computadorizada de crânio-encéfalo não evidenciou malformações cerebrais nem distúrbios de migração neuronal. Após excluir-se ligação aos cinco locos já sabidamente associados à microcefalia primária autossômica recessiva, foi realizada, em ambas as famílias, pesquisa genômica ampla com um painel de 365 marcadores microssatélites autossômicos espaçados a intervalos de 10 cM em média. Na família 1 identificou-se, por meio do método de mapeamento por autozigose, um novo loco (o sexto, denominado MCPH6 – microcephaly6) associado à microcefalia primária autossômica recessiva. Na família 2, a análise dos 365 marcadores não revelou nenhuma região de autozigose. Uma terceira família (a família 3), estudada do ponto de vista

clínico mas não analisada molecularmente, tinha dois afetados (um do sexo feminino e outro do sexo masculino), com medidas de perímetro cefálico 6 e 8 desvios-padrões abaixo da média, respectivamente. O rapaz tinha retardo mental moderado e a moça, atraso profundo do desenvolvimento neuropsicomotor, o que sugeria que outra patologia pudesse estar associada à microcefalia primária. Os três irmãos desses dois afetados tinham medida de perímetro cefálico 2-3 desvios-padrões abaixo da média (limítrofe para microcefalia) e nível intelectual variável: um deles apresentava inteligência normal e os outros dois, retardo leve a moderado. O estudo dessas três famílias pernambucanas levou ao mapeamento de um novo loco (o sexto) associado à microcefalia primária autossômica recessiva e revelou que pelo menos mais um outro existe e aguarda identificação.

Palavras-chave: microcefalia, MCPH6, mapeamento por autozigose.

ABSTRACT

Three consanguineous families from Pernambuco (families 1, 2 and 3) with primary autosomal recessive microcephaly were studied clinically, and two of them submitted to linkage analysis. Family 1, the largest one, had eight affected individuals (five males and three females, with ages varying between four and 27 years) with head circumference measurements 7-10 SD below the expected mean for age and sex. Family 2 had five microcephalic individuals (two males and three females with ages ranging from 14 to 25 years) with head circumference measurements 4 SD below the mean. In both families, microcephaly was accompanied by mental retardation of moderate severity and no other neurologic problem, dysmorphic feature or malformation. All the affected individuals were in good health and had growth parameters within normal limits. The parents had normal head circumference and intelligence. Ophthalmologic examination, standard lymphocyte karyotype (400 bands) and electroencephalogram performed in patients from both families were normal, and brain computed-tomography scan showed no cerebral malformations or neuronal ectopia. After exclusion of linkage to the five known loci related to autosomal recessive primary microcephaly, a genome trawl with 365 autosomal microsatellite markers spaced at approximately 10 cM intervals was performed in both kindreds. By autozygosity mapping a new locus (the sixth one, MCPH6 – microcephaly6) associated to autosomal recessive primary microcephaly was identified in family 1, but in family 2 no region of homozygosity was found. The third family (family 3), studied clinically but not submitted to linkage analysis, had a boy and a girl affected with head circumference measurements six and eight SD below the mean respectively. The boy presented mental retardation of moderate severity while the girl had severe neuropsychomotor delay, suggesting another disorder could be associated to primary microcephaly in this subject.

Their three siblings had head circumference measurements 2-3 SD below the expected mean (borderline for microcephaly), but only one of them had normal intelligence whilst the two others presented mental retardation of mild to moderate severity. The study of these three families resulted in the mapping of a novel locus (the sixth one) for autosomal recessive primary microcephaly and revealed that at least one more locus exist and awaits identification.

Key words: microcephaly, MCPH6, autozygosity mapping.