

## Alteração Transmissível do *Imprinting* Genómico em Pacientes Inférteis por Oligozoospermia e Azoospermia

Cristina Joana Marques\*, Bruno Vaz\*, Paula Costa\*, Sónia Sousa†, Filipa Carvalho\*, Susana Fernandes\*, Joaquina Silva†, Mário Sousa†‡, Alberto Barro†

\*Serviço de Genética, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; †Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros; ‡Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

**Introdução:** Efectuamos um estudo de pacientes com oligozoospermia e azoospermia para determinar se o *imprinting* genómico dos espermatozóides se encontra alterado.

**Métodos:** Analisaram-se 23 amostras de sémen de pacientes em estudo de infertilidade conjugal, 7 com normozoospermia (controles) e 16 com oligozoospermia (9 moderada; 7 severa); e 7 pacientes azoospermicos sujeitos a biópsia testicular para microinjecção intracitoplasmática de espermatozóide, 3 com espermatogénese conservada (controles: 2 anejaculação, 1 azoospermia obstrutiva secundária) e 4 com hipoespermatogénese (HP). O DNA dos espermatozóides foi descondensado, purificado e sujeito a mutagénese dirigida por tratamento com bissulfito de sódio. Amplificou-se por PCR ("Polymerase Chain Reaction") a região diferencialmente metilada (18 CpGs) do gene *H19* (metilação paterna), incluindo o local-6 de ligação da proteína CTCF ("parental-allele specific CCCTC-binding factor") que é igualmente responsável pelo controlo da expressão do gene *IGF2* ("Insulin-like Growth Factor 2"). Os fragmentos de PCR foram clonados em plasmídeos e o estado de metilação de cada citosina foi determinado por sequenciação automática.

**Resultados:** Verificou-se uma proporção significativamente mais elevada de: 1) hipometilação global do *H19* na HP ( $p=0,001$ ), 2) atingimento de  $\geq 3$  CpGs na oligozoospermia severa e HP ( $p<0,001$ ) e 3) de todas as 18 CpGs na HP ( $p<0,001$ ). Em relação ao local-6 de ligação da CTCF, observou-se uma proporção significativamente mais elevada de 1) hipometilação de  $\geq 3$  CpGs na HP ( $p<0,001$ ) e 2) de todas as 5 CpGs na HP ( $p<0,001$ ).

**Conclusões:** O estabelecimento do *imprinting* genómico não se encontra conservado na espermatogénese dos pacientes masculinos inférteis com oligozoospermia severa e azoospermia secretora, agravando-se com a severidade da lesão testicular.

**Palavras-chave:** azoospermia; oligozoospermia; espermatozóides; *H19*; *imprinting* genómico; infertilidade masculina.

ARQUIVOS DE MEDICINA, 21(2):41-5

### INTRODUÇÃO

Experiências de transferência nuclear permitiram verificar a existência de anomalias fetais e da placenta nos casos de implantação de embriões ginogénicos (zigotos com dois pronúcleos maternos), tendo sido então descrito um mecanismo - *imprinting* genómico - que regula diferencialmente a expressão dos genomas materno e paterno, resultando na expressão monoalélica dos genes *imprinted* (1). Estes genes desempenham importantes funções na regulação do desenvolvimento embrionário e da função da placenta, tendo também influência ao nível comportamental. As marcas parentais (*imprints*) que controlam a expressão dos genes *imprinted* consistem na metilação de conjuntos de dinucleotídeos CpG (ilhas CpG) presentes nas zonas

diferencialmente metiladas (DMR) dos dois alelos. Estas marcas são transmitidas ao embrião pelos gâmetas durante a fecundação, e resistem à onda de reprogramação epigenética que ocorre no início do desenvolvimento embrionário pré-implantação. São depois apagadas nas células primordiais germinativas e posteriormente restabelecidas, de acordo com o sexo parental, durante a gonadogénese fetal (2).

O *H19* (11p15.5) é um exemplo de gene *imprinted*, em que o alelo paterno se encontra metilado (3). A DMR do *H19* regula em simultâneo a expressão de um outro gene, o *IGF2* ("Insulin-like Growth Factor 2"). Na presença de metilação, a proteína CTCF ("parental-allele specific CCCTC-binding factor") perde o acesso à DMR, pelo que, no alelo paterno, o *H19* não é expresso e o *IGF2* é expresso. Pelo contrário, no alelo materno, em que o *H19*

não se encontra metilado, a ligação da CTCF à DMR impede o acesso de proteínas ativadoras ao promotor do *IGF2*, permitindo a expressão do *H19* e reprimindo a transcrição do *IGF2*. Dos sete locais de ligação da CTCF, apenas a metilação do local-6 influencia determinante a expressão dos dois genes (4).

Existem patologias relacionadas com a desregulação dos genes *imprinted*, tais como o síndrome de Angelman e de Beckwith-Wiedemann, estando em debate um possível aumento da incidência destas patologias em crianças concebidas com o auxílio das técnicas de reprodução medicamente assistida (2,5). Apesar da origem destes erros ter sido atribuída à perturbação da manutenção dos *imprints* maternos durante a manipulação *in vitro* dos gametas e embriões, essa origem pode no entanto também ser explicada pela existência de anomalias nos ovócitos, decorrentes do estado infértil e/ou da estimulação hormonal do ovário (6). O nosso grupo descreveu, pela primeira vez, a existência de uma associação entre infertilidade masculina e erros no estabelecimento das marcas de *imprinting*, ao observarmos um aumento significativo da desmetilação do *H19* nos espermatozóides de pacientes inférteis com oligozoospermia (7). O presente estudo foi desenhado para verificar, por técnicas de clonagem molecular, se o estabelecimento das marcas de *imprinting* em situações graves de compromisso da função testicular se encontra alterado.

## MÉTODOS

### Pacientes

A amostra inclui 30 pacientes masculinos em estudo de infertilidade conjugal ou com infertilidade comprovada, todos apresentando cariótipos normais, ausência de mutações no gene da fibrose cística (*CFTR*) e de microdeleções no cromossoma Y (*SRY*, *AZF*).

### Isolamento de espermatozóides do ejaculado

Sob consentimento informado, estudaram-se 23 ejaculados, 7 com normozoospermia ( $\geq 20 \times 10^6$  espermatozóides/ml) e 16 com oligozoospermia, 9 moderada ( $5-20 \times 10^6$ /mL) e 7 severa ( $< 5 \times 10^6$ /mL) (8). Após liquefacção (30 min, 37°C), o sémen foi submetido a centrifugação (20 min, 1500 rpm) de gradientes *Suprasperm* (Medicult, Copenhagen, Denmark; 1 ml sémen, 2 ml 55%, 2 ml 80%, 1 ml 90%) para selecção dos espermatozóides morfológicamente normais e móveis, com remoção de outras células e partículas. O *pellet* foi lavado (2x10 min, 1500 rpm) em *Sperm Preparation Medium* (SPM, Medicult), suavemente recoberto com 0.1-1 ml SPM, e incubado (1 h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em ar filtrado e humidificado) para recolher a fracção *swim-up* que contém, de modo purificado, os espermatozóides morfológicamente normais e com mobilidade progressiva rápida (7). A ausência de contaminação por outras células

foi ainda verificada ao microscópio de contraste de fase (Nikon, Tokyo, Japan).

### Isolamento de espermatozóides testiculares

Sob consentimento informado, foram incluídos 7 pacientes azoospermicos em tratamento para microinjecção intracitoplasmática de espermatozóide com biópsia testicular associada (9). Destes, 3 apresentavam espermatogénese conservada (2 com anejaculação e 1 com azoospermia obstrutiva secundária), enquanto que 4 pacientes apresentavam espermatogénese alterada (hipoespermatogénese). O tecido foi dissociado mecanicamente e lavado em SPM (2x15 min, 1000 rpm), retendo-se o *pellet*. Os eritrócitos foram removidos por incubação em 2 ml de *erythrocyte-lysing buffer* (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA, pH 7.2) (Sigma, Barcelona, Spain) durante 5 min a 33°C (5% CO<sub>2</sub>). Seguiu-se a dissociação celular enzimática por incubação (1 h, 33°C) em SPM contendo 25 µg/ml DNase e 1000 U/ml collagenase-IV (Sigma, cell cultured tested). Após lavagem em SPM (2x5 min, 1000 rpm), o *pellet* foi resuspenso em 50-100 µl de meio IVF (Medicult) e incubado até ser usado (32°C, 5% CO<sub>2</sub>) (9).

Cerca de 10 µl da suspensão celular foram diluídos numa microgota de 60 µl de SPM que foi colocada numa placa de cultura (Nunc, cell culture tested; Roskilde, Denmark) e recoberta com óleo mineral leve (Medicult, embryo tested). Esta placa foi colocada num microscópio Nikon invertido, com óptica Hoffman e estativo térmico (33°C), sendo os espermatozóides isolados utilizando micromanipuladores Narishige (Nikon) e micropipetas com 6-8 µm de diâmetro interno (SweMed, Frolunda, Sweden). Para cada paciente estudado, foram isolados cerca de 300 espermatozóides. Estes foram depois transferidos para tubos de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) estéreis *DNase/RNase-free* (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) com controlo estereomicroscópico (Nikon) e pipetas Pasteur estéreis de calibre <20 µm e controle oral com tubagem equipada com filtros 0.2 µm (Vygon, Écouen, France) (7).

### Extracção e modificação do DNA com bissulfito de sódio

O DNA dos espermatozóides foi descondensado e extraído por adição de um tampão de lise alcalino, 1 M KOH (Merck, Darmstadt, Germany) com 0,05 M DTT (*Dithiothreitol*) (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) e incubação a 80°C (banho-maria) durante 20 min, seguindo-se a adição de igual volume de tampão de neutralização, 0,9 M Tris-HCl (Sigma, Steinheim, Germany), 0,3 M KCl, 0,2 M HCl, pH 8,3 (Merck). O DNA foi então submetido a tratamento com bissulfito de sódio com o *CpGenome DNA Modification Kit* (Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, de modo a converter as citosinas não-metiladas em uracilo, permanecendo inalteradas as citosinas metiladas (7). De seguida, procedeu-se à

amplificação do DNA por PCR e armazenou-se o restante DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Amplificação, clonagem e sequenciação do DNA

O DNA foi amplificado por PCR tal como descrito anteriormente (3,7). Os produtos de PCR foram visualizados num gel de 2% de agarose, após electroforese em 0,5X TBE (0,89M Tris-Borate pH 8,3 + 20mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), a 120V durante 1 h à temperatura ambiente e coloração com brometo de etídio (7). Para o gene *H19*, foi amplificada uma região pertencente à DMR, com uma sequência de 231 bp e contendo 18 CpGs (GenBank accession N<sup>o</sup> AF087017; nucleótidos

fragmento nele inserido. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose e purificados. Após purificação, efectuou-se a sequenciação dos clones utilizando o *BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1 Ready Reaction kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o sequenciador automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) com *software* adequado (DNA Sequencing Analysis; Applied Biosystems) (7).

#### Análise estatística

As comparações entre grupos foram efectuadas com o *software* SPSS (vs 12) (SPSS Inc), usando-se o teste

Tabela 1 - Resultados da hipometilação global (18CpGs) do *H19*.

		CpG				
		Total	1	2	$\geq 3$	18
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Sémen	NZ	53/104 (51,0) <sup>a</sup>	39/104 (37,5)	10/104 (9,6)	4/104 (3,8) <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>
	OZ	151/266 (56,8)	99/266 (37,2)	20/266 (7,5)	32/266 (12,0)	5/266 (1,9)
	MOZ	75/145 (51,7) <sup>a</sup>	51/145 (35,2)	15/145 (10,3)	9/145 (6,2) <sup>c</sup>	3/145 (2,1) <sup>e</sup>
	SOZ	76/121 (62,8) <sup>a</sup>	48/121 (39,7)	5/121 (4,1)	23/121 (19,0) <sup>d</sup>	2/121 (1,7) <sup>e</sup>
Testículo	Controlos	6/72 (8,3)	2/72 (2,8)	4/72 (5,6)	0	0
	HP	48/55 (87,3) <sup>b</sup>	27/55 (49,1)	9/55 (16,4)	12/55 (21,8) <sup>d</sup>	11/55 (20,0) <sup>f</sup>

Normozoospermia (NZ); oligozoospermia (OZ); oligozoospermia moderada (MOZ); oligozoospermia severa (SOZ); controlos (anejaculação, azoospermia obstrutiva secundária); hipoespermatogénese (HP). OZ=MOZ+SOZ. Significância por colunas: (a,b)  $p=0,001$ ; (c,d, e,f)  $p<0,001$ .

6115-6326) (3,7).

Para o estudo do padrão de metilação de cada espermatozóide individualmente, foi utilizada a técnica de clonagem molecular. Os produtos de PCR foram purificados com o *GFX PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England), de acordo com as instruções do fabricante. Seguidamente, utilizamos 1-4  $\mu\text{l}$  do produto de PCR purificado para a reacção de clonagem, que foi efectuada com o *TOPO TA cloning kit* (Invitrogen), usando a estirpe de *E. coli* Mach1-T1 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Por cada amostra, estudaram-se 10-20 clones por amplificação das bactérias com os *primers* M13 que se ligam ao plasmídeo e amplificam o

de Pearson Chi-square, 2-sided, com nível de significância de  $p<0,05$ .

## RESULTADOS

No total, analisaram-se 370 clones de espermatozóides do ejaculado (fracção *swim-up*), 104 clones para os casos controlo (normozoospermia) e 266 clones para os casos de oligozoospermia, 145 para a oligozoospermia moderada e 121 para a oligozoospermia severa. Em relação aos espermatozóides de origem testicular, analisaram-se 127 clones no total, 72 clones para os casos controlo (anejaculação e azoospermia obstrutiva

secundária) e 55 clones para os casos de azoospermia secretora (hipoespermatogénese). Os dados são apresentados na tabela 1. A análise estatística mostrou um aumento significativo de: 1) hipometilação global do *H19* na hipoespermatogénese ( $p=0,001$ ), 2) hipometilação de  $\geq 3$  CpGs na oligozoospermia severa e na hipoespermatogénese ( $p<0,001$ ) e 3) hipometilação de todas as 18 CpGs (hipometilação completa) na hipoespermatogénese ( $p<0,001$ ). Nestes casos, a hipometilação completa ocorreu em apenas um paciente de cada grupo, correspondendo a 1/9 (11,1%) na oligozoospermia moderada, 1/7 (14,3%) na oligozoospermia severa e 1/4 (25,0%) na hipoespermatogénese ( $p<0,05$ ). Em relação à análise do local-6 de ligação da proteína CTCF (Tabela 2), observamos um aumento significativo de hipometilação de  $\geq 3$  CpGs e de todas as 5 CpGs (desmetilação completa) na hipoespermatogénese ( $p<0,001$ ).

Utilizando técnicas de clonagem molecular, que permitem avaliar o estado de metilação do *H19* em cada espermatozóide, os estudos efectuados em espermatozóides de ratinho descreveram também uma metilação completa do gene *H19*, apesar de alguns clones terem apresentado hipometilação de 1-3 CpGs (11,12). Também nos ratinhos, outro estudo permitiu verificar que a desmetilação experimental causa uma perturbação da histologia testicular com diminuição da produção de espermatozóides (13). Num estudo posterior (7), mais alargado e controlado, foi possível demonstrarmos existir um aumento significativo da hipometilação na oligozoospermia, sendo esta mais acentuada na oligozoospermia severa. Nesse estudo, verificamos que a hipometilação pode ser uma causa de infertilidade masculina, apesar de nenhum dos pacientes apresentar uma hipometilação total do *H19* (7).

No presente trabalho, com recurso à clonagem mo-

Tabela 2 - Resultados da hipometilação das 5 CpG do CTCF *binding site-6*.

		CpG				
		Total	1	2	$\geq 3$	18
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Sémen	NZ	16/104 (15,4) <sup>a</sup>	14/104 (13,5)	2/104 (1,9)	0 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>
	OZ	99/266 (37,2)	87/266 (32,7)	3/266 (1,1)	9/266 (3,4)	6/266 (2,3)
	MOZ	37/145 (25,5) <sup>a</sup>	32/145 (22,1)	0/145 (0,0)	5/145 (3,4) <sup>c</sup>	3/145 (2,1) <sup>e</sup>
	SOZ	62/121 (51,2) <sup>b</sup>	55/121 (45,5)	3/121 (2,5)	4/121 (3,4) <sup>d</sup>	3/121 (2,5) <sup>e</sup>
Testículo	Controlos	5/72 (6,9)	5/72 (6,9)	0	0	0
	HP	21/55 (38,2) <sup>a,b</sup>	9/55 (16,4)	1/55 (1,8)	11/55 (20,0) <sup>d</sup>	11/55 (20,0) <sup>f</sup>

Normozoospermia (NZ); oligozoospermia (OZ); oligozoospermia moderada (MOZ); oligozoospermia severa (SOZ); controlos (anejaculação, azoospermia obstrutiva secundária); hipoespermatogénese (HP). OZ=MOZ+SOZ.

Significância por colunas: (a,b)  $p=0,001$ ; (c,d, e,f)  $p<0,001$ .

## DISCUSSÃO

Estudos prévios haviam sugerido que o gene *H19* se encontrava normalmente metilado nos espermatozóides humanos do sémen (3). Pelo contrário, outros autores descreveram uma diminuição da metilação global do DNA dos espermatozóides de pacientes com parâmetros seminais abaixo do normal em relação à morfologia e mobilidade dos espermatozóides, tendo também verificado uma correlação entre os níveis de hipometilação do genoma paterno e as falhas de fertilização (10).

lecular, verificamos que a hipometilação do *H19* apenas se encontra significativamente aumentada na hipoespermatogénese ( $p=0,001$ ). Também verificamos que existem espermatozóides com hipometilação total do *H19* na oligozoospermia moderada (2,1%), na oligozoospermia severa (1,7%) e na hipoespermatogénese (20,0%), sendo que esta diminuição na metilação apenas é significativa na hipoespermatogénese ( $p<0,001$ ). Em relação ao local-6 de ligação da proteína reguladora CTCF, verificamos a existência de clones com hipometilação de  $\geq 3$  CpGs na oligozoospermia moderada



(3,4%), na oligozoospermia severa (3,3%) e na hipoespermatogénese (20,0%), bem como de clones com hipometilação de todas as 5 CpG na oligozoospermia moderada (2,1%), na oligozoospermia severa (2,5%) e na hipoespermatogénese (20,0%), sendo que esta diminuição na metilação apenas é significativa na hipoespermatogénese ( $p < 0,001$ ). Como a hipometilação completa do local de ligação da proteína CTCF implica que o alelo paterno destes espermatozóides terá uma expressão anormal do *H19* e uma inativação anormal do *IGF2*, os embriões resultantes apresentarão anormalmente uma dose dupla do *H19* e uma ausência completa da expressão do *IGF2*.

Em conclusão, o presente estudo demonstra a ocorrência de erros de *imprinting* paternos devido à hipometilação do *H19* nos casos com perturbações severas da espermatogénese. Embora tenha sido descrita, em ratinhos, uma actividade de remetilação durante a passagem dos espermatozóides pelo epidídimo (14), o que poderia levar à reparação da hipometilação anormal encontrada nos espermatozóides testiculares, os nossos resultados sugerem que, pelo menos nos pacientes com perturbações da espermatogénese, a hipometilação patológica do *H19* permanece nos espermatozóides ejaculados. Assim sendo, e sabendo-se que a hipometilação do *H19* no alelo paterno se encontra associada a casos de neoplasia maligna da bexiga (4) e de síndrome de Silver-Russel (15), será de ponderar a avaliação sistemática da metilação dos espermatozóides em casos de infertilidade masculina severa ou o despiste pré-natal do *imprinting* genómico.

#### Agradecimentos

Agradece-se o trabalho clínico de Cristiano Oliveira, José Teixeira da Silva (Ginecologia e Obstetrícia) e Luís Ferraz (Urologia) e o apoio laboratorial de Ana Gonçalves (Andrologia) e Paulo Viana (IVF) do Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros. Agradecemos também ao Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto pelos cariótipos e estudo molecular do gene *CFTR* e do cromossoma Y. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FCT (SFRH/BD/19967/2004; POCI/SAU-MMO/60709/04, 60555/04, 59997/04; UMIB).

#### REFERÊNCIAS

- 1 - Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984;308:548-50.
- 2 - Arnaud P, Feil R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res, part C, Embryo Today* 2005;75:81-97.
- 3 - Kerjean A, Dupont J-M, Vasseur C, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human *H19* and *MEST/PEG1* genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2000;9:2183-7.
- 4 - Takai D, Gonzales FA, Tsai YC, Thayer MJ, Jones PA. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human *H19* promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:2619-26.
- 5 - Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 2003;361:1975-7.
- 6 - Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005;42:289-91.
- 7 - Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004;363:1700-2.
- 8 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction (4<sup>a</sup> ed.) Cambridge: Cambridge University Press.
- 9 - Sousa M, Cremades C, Alves C, Silva J, Barros A. Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. *Hum Reprod* 2002;17:161-72.
- 10 - Benchaib M, Ajina M, Lornage J, Niveleau A, Durand P, Guérin JF. Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study. *Fertil Steril* 2003;80:947-53.
- 11 - Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, Bestor TH, Trasler JM. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 2002;79:530-8.
- 12 - Li J-Y, Lees-Murdock DJ, Xu G-L, Walsh CP. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 2004;84:952-60.
- 13 - Doerksen T, Benoit G, Trasler JM. Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology. *Endocrinology* 2000;141:3235-44.
- 14 - Ariel M, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet* 1994;7:59-63.
- 15 - Blik J, Terhal P, van den Boogaard M-J, et al. Hypomethylation of the *H19* gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am J Hum Genet* 2006;78:604-14.

#### Correspondência:

Dr.<sup>a</sup> Cristina Joana Marques  
Serviço de Genética  
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto  
Alameda Prof. Hernâni Monteiro  
4200-319 Porto

e-mail: cmarques@med.up.pt