

Juliana de Barros Cruz

**Estudo Clínico e Molecular de pacientes
com Displasia Septo-Óptica ou
Deficiência Hormonal Hipofisária
(gene *HESX1* e *PROP1*)**

Dissertação de mestrado apresentado ao
programa de pós-graduação Fisiopatologia em
Clínica Médica para obtenção do título de
mestre – Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Cruz, Juliana de Barros.

Estudo clínico e molecular de pacientes com displasia septo-óptica ou deficiência hormonal hipofisária (gene HESX1 e PROP1) / Juliana de Barros Cruz. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientadora: Célia Regina Nogueira

Assunto CAPES: 40101002

**1. Hipófise 2. Hormônios da hipófise – Fisiologia 3.
Endocrinologia clínica - Aspectos genéticos**

CDD 616.43

Palavras-chave: Deficiência hormonal hipofisária; Displasia septo-óptica; Gene *HESX1*; Gene *PROP1*; Mutação

Dedicatória



Ao meu noivo, Eduardo, pelo eterno companheirismo.

*Aos meus pais, Paulo e Lea, por sempre estarem presentes e me
apoando na minha trajetória pessoal e profissional.*

Agradecimentos

- ✚ Aos meus pais, Paulo e Lea, pelo exemplo de família, amor incondicional e apoio constante em todas as etapas da minha vida.
- ✚ Ao meu irmão, Marcos, à minha cunhada Juliana e à minha linda sobrinha Júlia, por fazerem parte dessa família maravilhosa que temos.
- ✚ Ao meu sogro e minha sogra, Edson e Bete, pelo acolhimento e apoio que me deram todos estes anos.
- ✚ À minha orientadora, Dra Célia Regina Nogueira, pessoa maravilhosa, que sempre me estimulou e ajudou, tanto na parte científica, como em momentos da vida pessoal.
- ✚ À Dra Denise Perone, pela orientação dada e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.
- ✚ À Sueli Ap. Clara, pelo tempo e paciência ao me ajudar a formatar o texto.
- ✚ À Elza Guedes, que me estimulou em momentos importantes da minha vida.
- ✚ A toda equipe do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica, pela convivência e amizade.
- ✚ Às médicas endocrinologistas Adriana Mendes, Bibiana Colenci, Gláucia Mazeto e Walkíria Pimenta pelo apoio, carinho e convivência durante todos esses anos.
- ✚ Aos amigos Flávio Miano, Vânia Nunes, Nancy Bueno, Tricia Nunes e Larissa Chambô, pelo afeto, companheirismo, amizade sincera e presença em todos os momentos dessa trajetória.

Sumário



Resumo

Abstract

1. Introdução.....	01
1.1. Embriogênese hipofisária.....	02
1.2. Gene <i>HESX1</i>.....	05
1.3. Gene <i>PROP1</i>.....	09
2. Objetivo.....	12
3. Pacientes e Métodos.....	14
3.1. Avaliação Clínica.....	15
3.2. Avaliação Hormonal.....	24
3.3. Avaliação Radiológica.....	26
3.4. Análise Molecular.....	26
3.4.1. Extração do DNA.....	26
3.4.2. Reação de Polimerização (PCR).....	26
3.4.3. Sequenciamento dos exons amplificados.....	29
4. Resultados.....	30
4.1. Estudo molecular.....	31
5. Discussão.....	37
6. Conclusão.....	46
7. Bibliografia.....	48
Anexos.....	59

Lista de Figuras



Figura 1	Embriogênese Hipofisária.....	04
Figura 2	Representação gráfica do gene <i>HESX1</i>	07
Figura 3	Representação gráfica do modelo do efeito do HESX1 mutante no desenvolvimento hipofisário dependente do <i>PROP1</i>	08
Figura 4	Representação gráfica do gene <i>PROP1</i>	10
Figura 5	Amplificação dos exons 1, 2,3 e 4 do gene <i>HESX1</i>	31
Figura 6	Amplificação dos exons 1, 2 e 3 do gene <i>PROP1</i>	32
Figura 7	Representação gráfica do sequenciamento genético do paciente 2.....	33
Figura 8	Representação gráfica do sequenciamento genético dos pacientes 4 e 5.....	34
Figura 9	Representação gráfica do sequenciamento genético do paciente 10.....	34
Figura 10	Representação gráfica do sequenciamento genético dos pacientes 4,5 e 10.....	35
Figura 11	Mutações descritas no gene <i>HESX1</i>	40

Lista de Tabelas

Tabela 1	Característica clínica, laboratorial e radiológica dos pacientes estudados.....	22
Tabela 2	Primers intrônicos utilizados – <i>HESX1</i>	27
Tabela 3	Primers intrônicos utilizados – <i>PROP1</i>	28
Tabela 4	Resultados encontrados no sequenciamento.....	36
Tabela 5	Mutações descritas no gene <i>HESX1</i>	39

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BMP2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
BMP4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
CPHD	<i>combined pituitary hormone deficiency</i>
DE	Dia embriônico do camundongo
DGH	Deficiência de hormônio de crescimento
DHHC	Deficiência hormonal hipofisária combinada
DNA	<i>Desoxiribonucleotídeo</i>
DP	Desvio padrão
DSO	Displasia Septo óptica
EH-1	<i>Engrailed homology domain</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GALA 4	Galactosidase 4
GATA 2	<i>Gata binding protein 2</i>
GH	hormônio de crescimento
GHRHR	Receptor do hormônio liberador de GH
Gro	Groucho
Hesx1	Homeobox embryonic stem cell - representação gene camundongo
HESX1	Homeobox embryonic stem cell – representação gene humano
HHA	Hipoplasia hipofisária anterior
HNO	Hipoplasia nervo óptico
IGFBP3	<i>Insulin like growth factor binding protein 3</i>
IGF1	<i>Insulin like growth factor 1</i>
ITT	<i>Insulin tolerant test</i>
LH	Hormônio luteinizante
LHX3	<i>Lim homeobox gene</i>
LIM	3 homeodomínios de proteínas Lin-11, Islet-1 (ISL1),e Mec-3

MCC	má formação de corpo caloso
NHE	neurohipófise ectópica
NeuroD1	<i>neurogenic differentiation 1</i>
Pax6	<i>Paired Box gene 6</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PIT 1	<i>Pituitary specific transcription factor 1</i>
Pitx1 / 2	<i>Paired-like homeodomain transcription factor 1 / 2</i>
PNA	prega neural anterior
PRL	Prolactina
PROP1	<i>prophet of Pit-1</i>
RNM	ressonância nuclear magnética
Rpx	<i>Rathke pouch homeobox</i>
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SOD	<i>Septo optic dysplasia</i>
TLE1	<i>Transducin-like enhancer of split 1</i>
TSH	Hormônio tireotrófico

Resumo

A hipófise anterior compõe-se de cinco tipos celulares que são definidos pelos hormônios que secretam. A diferenciação desses tipos celulares resulta de uma cascata temporalmente regulada de fatores transcricionais expressos no tecido hipofisário. Mutações de um desses fatores podem resultar tanto em defeitos estruturais da glândula como em deficiências hormonais, que podem ser isoladas (Déficit de hormônio do crescimento - DGH) ou combinadas (DHHC), dependendo do papel do fator transcricional mutado. A Displasia Septo – óptica (DSO) caracteriza-se pela presença de hipoplasia hipofisária, hipoplasia de nervo óptico e/ou má formações de estruturas da linha média. Foram avaliados 11 pacientes com quadro clínico de SOD, DGH e DHHC e realizado o sequenciamento genético do gene *HESX1* desses indivíduos. Nos casos de DHHC foi feita uma análise adicional do gene *PROP1*. A mutação *missense* em estado de heterozigose A1772G levando a substituição N125S foi identificada em um paciente portador de DSO, no gene *HESX1*. Essa troca já foi previamente relatada como um polimorfismo na população Afro-Caribenha. Encontramos três pacientes portadores da variante alélica A9A e N20S no exon 1 do gene *PROP1*, já descritos previamente na literatura como polimorfismos.

Palavras chave: Deficiência hormonal hipofisária; Displasia septo-óptica; Gene *HESX1*; Gene *PROP1*; Mutação

Abstract



The anterior pituitary is made of five types of cell defined according to the hormones they secrete. Differentiation among such cell types derives from a cascade of temporally regulated transcriptional factors expressed in the pituitary tissue. Mutation in one of these factors may result in both structural gland defects and hormonal deficiencies, which may be either isolated (DGH – Growth Hormone Deficiency) or combined, depending on the role of the mutated transcriptional factor. Septo-optic dysplasia (SOD) is characterized by pituitary hypoplasia, optic nerve hypoplasia and/or malformation of midline structures. Eleven patients with a clinical state of SOD, DGH and CPHD were assessed, and genetically sequenced for the *HESX1* gene. For CPHD cases, an additional analysis for the *PROP1* gene was also conducted. One SOD patient was found to have a missense mutation in A1772G heterozygous state, leading to the N125S replacement, in *HESX1* gene. Such replacement has already been reported as a polymorphism in the Afro-Caribbean population. We found three patients with the allelic variation A9S and N20A in exon 1 of *PROP1* gene, previously described as polymorphisms.

Key words: Pituitary hormone deficiency, Septo-optic dysplasia, *HESX1* gene, *PROP1* gene, mutation.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1. Embriogênese Hipofisária

A glândula hipofisária é composta pela adeno-hipófise, a qual compreende o lobo anterior e intermediário, e pela neuro-hipófise, que consiste nas projeções dos neurônios magnocelulares hipotalâmicos, também referida como hipófise posterior¹.

O desenvolvimento do lobo anterior se inicia entre a terceira e a sexta semanas de gestação. Aproximadamente na terceira semana, o ectoderma oral se invagina para formar o primórdio pituitário rudimentar, conhecido como bolsa de Rathke. Esta se prolifera em direção ao terceiro ventrículo, onde se funde com o lobo posterior. A porção da bolsa em contato com a neuro-hipófise forma o lobo intermediário, pouco evidente em seres humanos, já que ocorre sobreposição com as células da hipófise anterior².

O lobo posterior tem origem neural, derivando de uma evaginação do hipotálamo ventral e do terceiro ventrículo, sendo composto pelos axônios e terminações nervosas de neurônios hipotalâmicos³.

A análise da embriogênese dos camundongos evidencia que a parte anterior da placa neural (PNA), originará as estruturas não neurais tais como hipófise anterior, ectoderma da cavidade nasal e a placa olfatória, enquanto um tecido da placa neural imediatamente adjacente a PNA, dará

origem às estruturas neurais anteriores como hipotálamo, hipófise posterior, vesículas ópticas e porção ventral da região anterior do cérebro^{4, 5}.

Ao nascimento, a hipófise anterior compõe-se de cinco tipos celulares que são definidos pelos hormônios que secretam: corticotrofos (secretam ACTH), tireotrofos (TSH), somatotrofos (GH), gonadotrofos (FSH e LH) e lactotrofos (PRL).

Há uma série de fatores transcricionais tais como Pit1 (*pituitary specific transcription factor 1*), Prop1 (*prophet of Pit1*), Hesx1 (*Homeobox embryonic stem cell*), Lhx3 (*Lim homeobox gene 3*), Lhx4 (*Lim homeobox gene 4*), Pitx1/2 (*Paired-like homeodomain transcription factor 1/2*), Tpit (*T Box transcription factor*), que atuam de um modo temporalmente regulado para permitir a diferenciação progressiva desses tipos celulares⁶ (Figura 1).

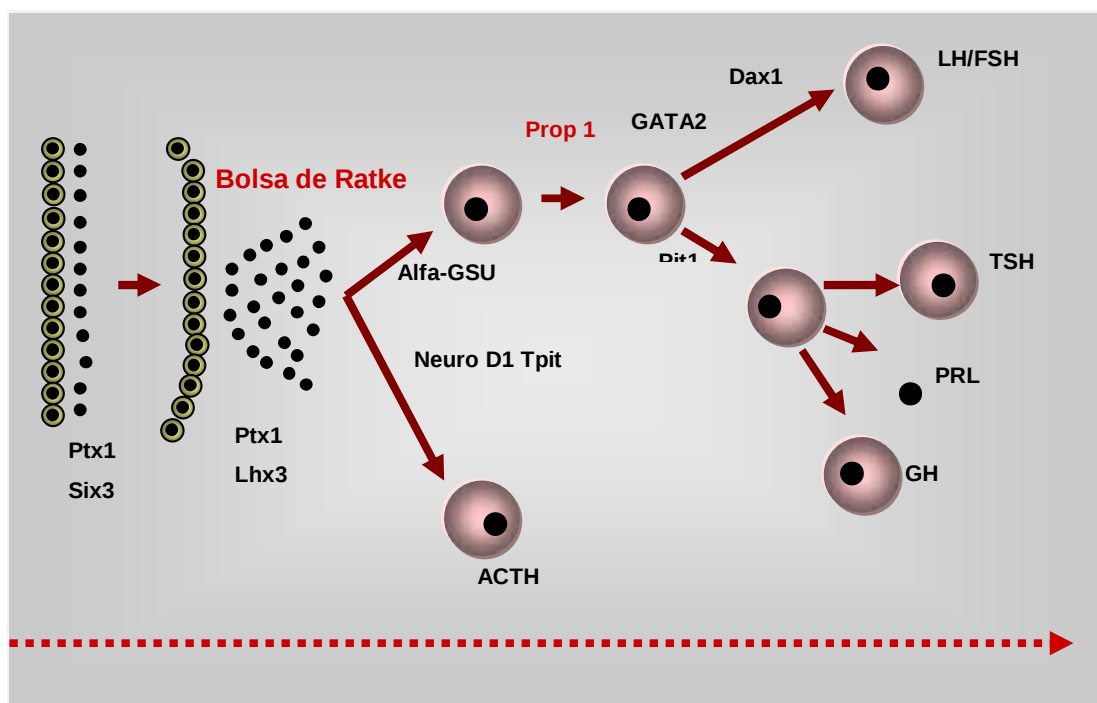


Figura 1. Adaptado de Asteria,C.- Embriogênese Hipofisária: fatores transcricionais envolvidos, cascata temporalmente regulada da expressão desses fatores ⁷.

Ptx1: *Paired-like homeodomain transcription factor*; Alfa-GSU: *alfa unidade do hormônio gonadotrófico*; Pit1: *pituitary specific transcription factor 1*; NeuroD1: *neurogenic differentiation 1*; GATA2: *gata binding protein 2*; Hesx1: *homeobox embryonic stem cell*; Tpit: *T Box transcription factor*; Dax1: *dosage-sensitive sex reversal congenital adrenal hypoplasia critical region on the X chromosome-1*; Lhx3/4: *Lim homeobox gene*; Prop1: profeta do *Pit1*; ACTH: Hormônio Corticotrófico; LH: Hormônio Luteinizante; FSH: Hormônio Folículo estimulante; TSH: Hormônio Tireotrófico; PRL: Prolactina; GH: Hormônio do crescimento

A falência dessas células em se diferenciarem ou proliferarem durante a embriogênese hipofisária, resulta em alterações hipofisárias congênitas, que podem ser estruturais (Displasia Septo óptica - DSO) ou deficiências hormonais. Esta por sua vez pode ser isolada, como o déficit de hormônio de crescimento (DGH); ou combinada, dependendo do fator transcricional mutado.^{8, 9,10}.

1.2. Gene *HESX1*

O gene *Hesx1* também conhecido como *Rpx* (*Rathke pouch homeobox gene*) regula os estágios iniciais do desenvolvimento hipofisário. Seus transcritos são detectados inicialmente no 6,5 DE (dia embriônico) no endoderma visceral anterior, coincidente com o início da gastrulação. No 7,5 DE a expressão é observada no ectoderma cerebral e no mesoderma axial anterior subjacente. No 8,5 DE o *Hesx1* se expressa no ectoderma neural rostral e também é detectado no ectoderma oral e na região do intestino anterior. No 9,5 DE sua expressão está restrita ao diencéfalo ventral e à bolsa de Rathke. No 10,5 DE os transcritos são detectados apenas na bolsa de Rathke. O *Hesx1* continua a ser expresso no desenvolvimento da hipófise anterior até o 11,5 DE, quando os transcritos desaparecem em uma seqüência espaço-temporal que corresponde à diferenciação hipofisária. Sua expressão se torna indetectável no 15,5 DE⁶.

Em 1998 Dattani *et al.* publicaram o resultado de um modelo com nocaute para o gene *HESX1* em camundongos. Os homozigotos apresentaram redução do tecido prosencefálico, anoftalmia ou microftalmia e anormalidades do corpo caloso e septo pelúcido, a hipófise anterior pequena e não conectada ao lobo posterior. Os defeitos de linha média cerebral no mutante, caracterizado pela ausência de septo pelúcido e ausência de corpo caloso e morfogênese anormal da hipófise anterior apresentam uma semelhança fenotípica com a síndrome da displasia septo-óptica (DSO) no homem¹¹.

A Displasia Septo-óptica (DSO) é uma condição bastante heterogênea, definida pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: hipoplasia do nervo óptico, anormalidades de linha média (como agenesia de corpo caloso e ausência de septo pelúcido) e hipoplasia hipofisária com deficiências hormonais. O fenótipo é bastante variável com aproximadamente 30% dos casos apresentando a manifestação completa¹². Essa doença ocorre com maior frequência em crianças que nascem de mães muito jovens, e recentemente casos de hipoplasia de nervo óptico isolada ou DSO tem sido descritos em áreas geográficas com alta taxa de gravidez em adolescentes¹³.

Baseado nessa associação entre o fenótipo apresentado pelos camundongos nocautes para o gene *Hesx1* e a DSO no homem, Dattani *et al.* clonaram, sequenciaram e mapearam o gene *HESX1* homólogo no ser humano a partir de uma biblioteca genômica, a fim de analisar esse gene em pacientes com defeitos de linha média cerebral,

malformação do sistema nervoso central, associado ou não às deficiências hormonais hipofisárias. O gene foi mapeado, seqüenciado e localizado no braço curto do cromossomo 3 na região 3p21.1-21.2. O locus do gene *HESX1* tem 1.7Kb distribuídos em 4 exons que codificam uma proteína de 185 aminoácidos (aa) que possui na sua porção N-terminal um domínio com 7 aa (resíduos 21-27) altamente conservado nas espécies denominado eh-1 (*engrailed homology domain*), a região implicada na repressão da transcrição, assim como um homeodomínio com 3 hélices, que se liga ao DNA, onde foi mapeado um outro domínio repressor⁶ (figura 2).

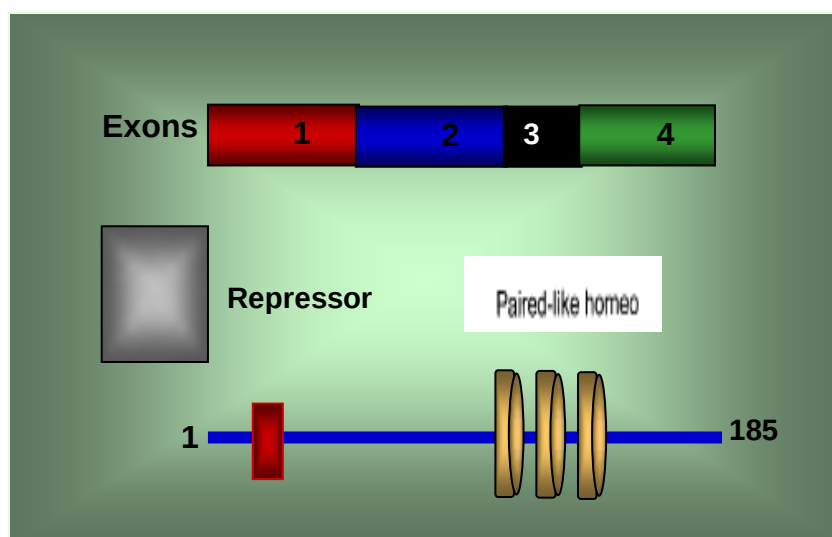


Figura 2. Representação gráfica do gene *HESX1*. O gene contém 4 exons, e seu transcrito, uma proteína de 185 aa, que contém o domínio repressor na região eh-1 e o domínio *paired* (*Prd*) que contém 3 hélices de ligação ao DNA. Adaptado Parks, JS⁸.

A proteína Hesx1 e um segundo fator *prd* -like (Prop1) são expressos em domínios temporalmente e espacialmente distintos. A

atenuação da expressão do *Hesx1* na glândula hipofisária coincide com a progressão da diferenciação celular dependente do *Prop1*¹⁴.

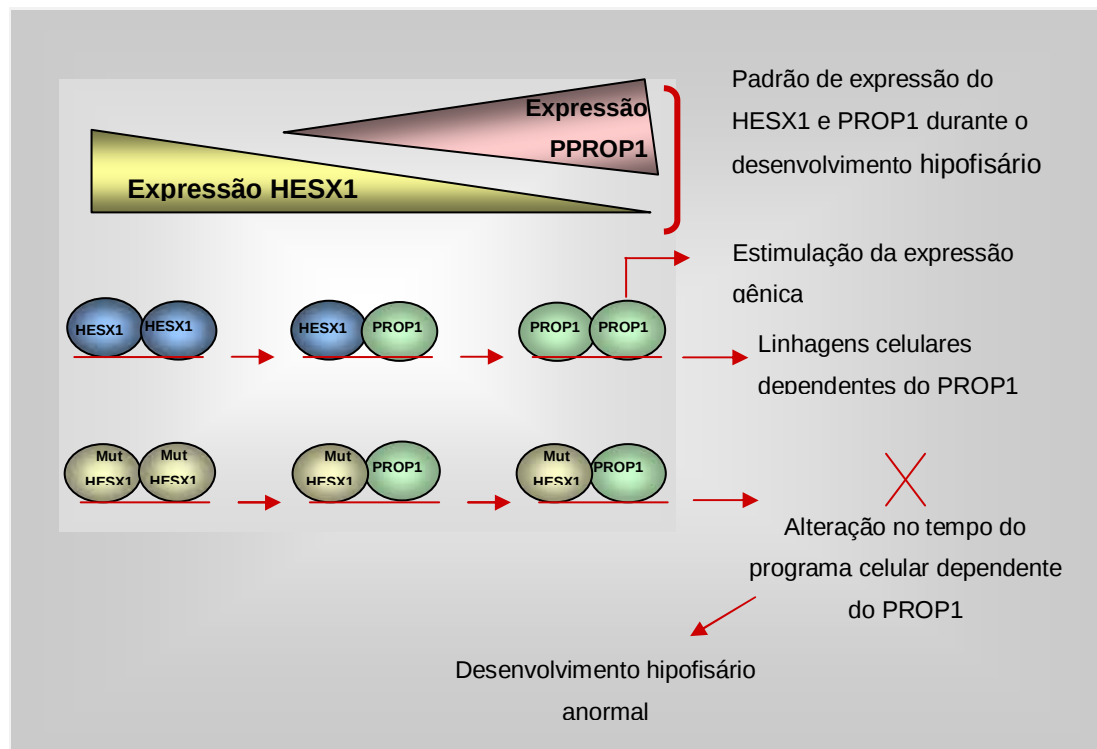


Figura 3: Modelo pelo qual o HESX1 mutante interfere no desenvolvimento hipofisário PROP1 dependente. Adaptado Cohen, RN¹⁵.

A proteína *hesx1* age como repressora que pode suprimir a ação de um ativador ao se ligar ao mesmo sítio de reconhecimento do DNA, em um processo conhecido como repressão heterodimérica. Conseqüentemente a proteína *hesx1* pode agir no contexto do complexo *Hesx1/Prop1* para suprimir a atividade do *PROP1*. Alguns fatores adicionais são necessários para essa repressão: receptor nuclear correpressor (Ncor), mSin3A/B, deacetilases de histona (recrutados pelo homeodomínio) e correpressores da família Groucho, como o TLE1 (recrutado pelo domínio eh1)¹⁵.

Atualmente são descritas onze mutações no gene *HESX1* que podem levar a fenótipos variados, incluindo deficiência hormonal hipofisária combinada, DSO e DGH¹³.

1.3. Gene *PROP1*

A proteína Prop1 é um fator transcricional *paired-like*, expresso exclusivamente na glândula hipofisária embriônica. Sua expressão é inicialmente detectada na porção dorsal da bolsa de Rathke murina, em uma região que se sobrepõe à expressão do domínio do Hesx1. A expressão máxima do *Prop1* ocorre no 12 DE, tornando-se indetectável no 15,5 DE. O camundongo *Ames dwarf* abriga uma substituição natural da serina por prolina (S83P) no homeodomínio do *Prop1*, resultando em uma proteína anômala com afinidade oito vezes menor ao se unir no sítio de ligação do DNA do que a proteína *wild-type*. Quando essa mutação ocorre em homozigose, o camundongo se apresenta com grave nanismo, hipotireoidismo e infertilidade, e apesar de o desenvolvimento hipofisário inicial ser semelhante ao camundongo *wild-type*, a glândula hipofisária é hipoplásica na vida adulta apresentando uma redução de aproximadamente 50% do seu tamanho com deficiência de GH, TSH e prolactina, além de expressão reduzida dos gonadotrofos.

Após a identificação do Prop1 como o gene responsável pelo fenótipo do camundongo *ames dwarf*, Wu *et.al.* descreveram a primeira

mutação no gene *PROP1* em pacientes humanos com déficit de GH, TSH, PRL, LH e FSH¹⁶.

O gene foi mapeado, seqüenciado e localizado no braço longo do cromossomo 5. O locus do gene *PROP1* tem 3 Kb distribuídos em 3 exons que codificam uma proteína de 223 aminoácidos (aa) cuja porção N-terminal apresenta um domínio de ativação da transcrição gênica, assim como um homeodomínio com 3 hélices, que se liga ao DNA¹⁷ (Figura 4).

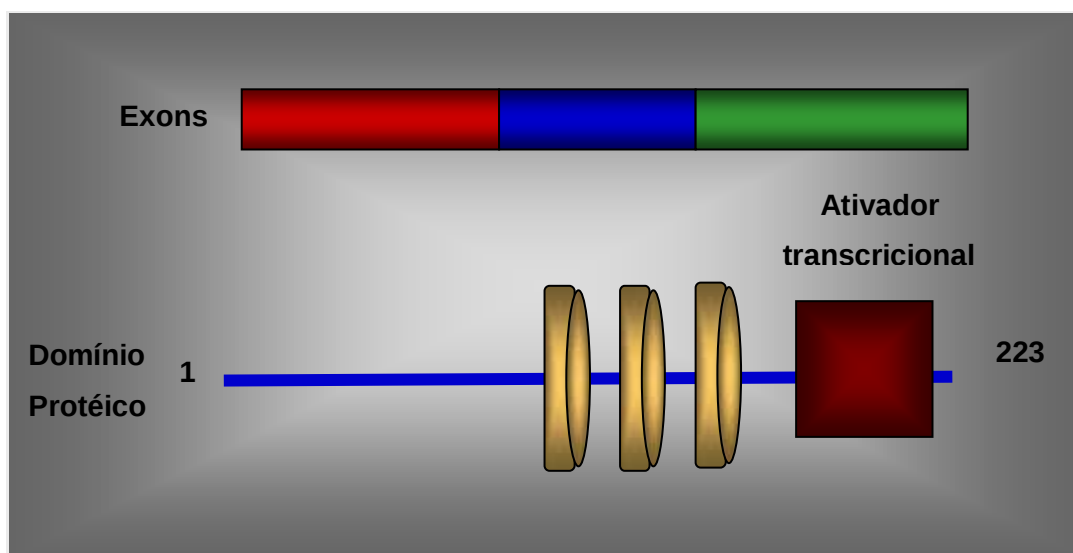


Figura 4. Representação gráfica do gene *PROP1*. O gene contém 3 exons, e seu transcrito, uma proteína de 223 aminoácidos, que contém o domínio ativador e o domínio *paired* (*Prd*) com 3 hélices de ligação ao DNA. Adaptado Parks, JS⁸.

Até a atualidade, existem 22 mutações descritas no gene *PROP1*, identificadas em mais de 170 pacientes com deficiência hormonal hipofisária combinada. Mutações neste gene são responsáveis por aproximadamente 50% dos casos familiares desta patologia.¹⁶

Considerando-se a escassez na literatura de estudos do gene *HESX1* e *PROP1* em casos esporádicos, nosso trabalho tem por finalidade avaliar a presença de mutação nesse perfil de paciente. Portanto, indivíduos com deficiência hormonal hipofisária combinada são candidatos para o rastreamento genético do gene *HESX1* e *PROP1*, enquanto que pacientes com DSO e DGH devem ser rastreados para mutações no *HESX1*.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos clínicos, de propedêutica armada e molecular de indivíduos com Displasia Septo óptica (gene *HESX1*), déficit de GH (gene *HESX1*) e deficiência hormonal hipofisária combinada (gene *HESX1* e gene *PROP1*).

Pacientes e Métodos

3. PACIENTES E MÉTODOS

Estudamos 11 pacientes acompanhados no ambulatório de crescimento, da disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de 2005 e 2006. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética médica. Após a assinatura do termo de consentimento informado livre e esclarecido, os membros foram incluídos no estudo.

3.1. Avaliação clínica

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos retrospectivamente do prontuário médico, e incluiu história de consangüinidade, história familiar, parâmetros auxológicos e avaliação hormonal.

Os critérios de inclusão foram:

- Déficit de hormônio de crescimento: Pacientes com altura menor que dois desvios-padrão, com dois testes de estímulo confirmando a deficiência de hormônio de crescimento. Em crianças com valores subnormais de IGF-1 e IGFBP-3 associados à baixa velocidade de crescimento e deficiência de outros hormônios hipofisários, os testes de estímulo não foram realizados. Utilizamos como critérios de diagnóstico de deficiência de GH, níveis de pico de GH após estímulo < 7.0 ng/mL no método de radioimunoensaio.

- Deficiência hormonal hipofisária combinada: déficit de dois ou mais hormônios do eixo hipofisário comprovada laboratorialmente por exames endocrinológicos específicos.
- Displasia Septo-óptica: duas ou mais das seguintes características: 1) hipoplasia do nervo óptico, 2) anormalidades de linha média (como agenesia de corpo caloso e ausência de septo pelúcido, 3) hipoplasia hipofisária com deficiências hormonais.

Foram estudados três pacientes com DSO (pacientes 1, 2 e 3), três pacientes com DGH (pacientes 6,7 e 8 – tabela 1) e cinco pacientes com deficiência hormonal hipofisária combinada (pacientes 4,5,9, 10 e 11 – tabela 1).

Paciente 1:

Deu entrada no ambulatório da disciplina de Endocrinologia e Metabologia da FMUNESP aos 3 anos e 3 meses de idade. Apresentava história de astenia, fraqueza, constipação intestinal e episódios de hipoglicemia de repetição. Durante a avaliação endocrinológica, foram observados déficit de cortisol, de IGF1 e de IGFBP3, bem como níveis baixos de hormônio tireoidiano com níveis inapropriadamente normais de tireotrofina. Com esses parâmetros foi diagnosticada insuficiência adrenal secundária, hipotireoidismo central e déficit de GH. Apresentava hipoplasia de nervo óptico esquerdo avaliado pela fundoscopia, e ressonância nuclear magnética evidenciando hipoplasia de hipófise anterior e neuro-hipófise

ectópica. Não tinha antecedente de consangüinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 2:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço com 1 ano e 3 meses de idade. Apresentava quadro de convulsões desde o nascimento, além de astenia e fraqueza. Durante a avaliação endocrinológica foram observados déficit de cortisol, níveis diminuídos de IGF1 e IGFBP3 bem como déficit de hormônio tireoidiano. Com esses parâmetros foi diagnosticada insuficiência adrenal secundária, hipotireoidismo central e déficit de GH. Apresentava hipoplasia de nervo óptico esquerdo avaliado pela fundoscopia, e ressonância nuclear magnética evidenciando hipoplasia de hipófise anterior e neuro-hipófise ectópica. Não tinha antecedente de consangüinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 3:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço aos 3 anos e 5 meses de idade. Apresentava quadro de baixa estatura, com parâmetros auxológicos expressivos (desvio padrão para altura de -5,8). Além disso, queixava-se de astenia e, durante o acompanhamento ambulatorial, foi observado ausência de desenvolvimento puberal, foi diagnosticado déficit de GH, hipotireoidismo e hipogonadismo central. Diagnosticou-se coloboma em olho esquerdo, e a ressonância nuclear magnética evidenciou hipoplasia de

hipófise anterior e má formação de corpo caloso. Não tinha antecedente de consangüinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 4:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço aos 3 anos e 5 meses de idade. Apresentava quadro de baixa estatura, com desvio padrão para altura de -3,48. Queixava-se também astenia, fraqueza, poliúria e polidipsia. Após investigação endocrinológica específica, foram detectados s déficits de GH, de hormônio tireoidiano, de cortisol e de hormônio antidiurético. Com esses parâmetros foi feito o diagnóstico de déficit de GH, hipotireoidismo central, insuficiência adrenal secundária e diabetes insípido central. A ressonância nuclear magnética evidenciou hipoplasia hipofisária anterior e neuro-hipófise ectópica. Não tinha antecedente de consangüinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 5:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço aos 13 anos e 10 meses de idade. Apresentava quadro de baixa estatura significativa (desvio padrão para altura de -5,7), infantilismo sexual (estádio M1P1 de Tanner), hipoglicemia de repetição, fadiga, desânimo, astenia. Após investigação endocrinológica específica, foram detectados déficit de GH, de hormônio tireoidiano, de cortisol e de gonadotrofinas. Com esses parâmetros foi feito o diagnóstico de déficit de GH, hipotireoidismo central, insuficiência adrenal secundária e hipogonadismo hipogonadotrófico. A ressonância

nuclear magnética evidenciou hipoplasia hipofisária anterior. Não tinha antecedente de consangüinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 6:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço aos 14 anos e 3 meses de idade. Apresentava quadro de baixa estatura (desvio padrão para altura de $-2,6$), sem outras características relevantes. Após investigação endocrinológica específica, foi detectado déficit isolado de GH, com os demais eixos hipofisários preservados. Não apresentava alterações à ressonância nuclear magnética. Não tinha antecedente de consangüinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 7:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço aos 18 anos e 5 meses de idade. Apresentava quadro de baixa estatura significativa (desvio padrão para altura de $-6,4$), sem outras características relevantes. Após investigação endocrinológica específica, foi detectado déficit isolado de GH, com os demais eixos hipofisários preservados. Não apresentava alterações à ressonância nuclear magnética. Não tinha antecedente de consangüinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 8:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço aos 14 anos e 10 meses de idade. Apresentava quadro de baixa estatura significativa

(desvio padrão para altura de $-3,0$), sem outras características relevantes. Após investigação endocrinológica específica foi detectado déficit isolado de GH, com os demais eixos hipofisários preservados. Não apresentava alterações à ressonância nuclear magnética. Não tinha antecedente de consanguinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 9:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço aos 16 anos e 9 meses de idade. Já apresentava diagnóstico de déficit de GH. Apresentava quadro de baixa estatura significativa (desvio padrão para altura de $-6,0$), mesmo tendo feito uso prévio de hormônio de crescimento em outro serviço. Apresentava infantilismo sexual (estádio M1P1 de Tanner), fadiga, desânimo, astenia. Após investigação endocrinológica específica, além do diagnóstico prévio de DGH, apresentava diminuição de hormônio tireoidiano, cortisol e gonadotrofinas. Com esses parâmetros foi feito o diagnóstico de déficit de GH, hipotireoidismo central, insuficiência adrenal secundária e hipogonadismo hipogonadotrófico.

A ressonância nuclear magnética evidenciou hipoplasia hipofisária anterior. Não tinha antecedente de consanguinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 10:

Iniciou acompanhamento em nosso serviço aos 9 anos e 3 meses de idade. Apresentava quadro de baixa estatura significativa (desvio

padrão para altura de $-4,49$), infantilismo sexual (estádio M1P1 de Tanner), fadiga, desânimo, astenia. Após investigação endocrinológica específica, foi detectado déficit de GH, de hormônio tireoidiano, de cortisol e de gonadotrofinas. A ressonância nuclear magnética evidenciou hipoplasia hipofisária anterior e neuro-hipófise ectópica. Não tinha antecedente de consanguinidade ou casos semelhantes na família.

Paciente 11:

Iniciou seguimento em nosso serviço aos 14 anos. Apresentava história de criptorquidia bilateral e hipospádia, com correção cirúrgica previamente. Apresentava também baixa estatura, com desvio padrão para altura de $-2,91$, infantilismo sexual (estádio G1P1 de Tanner), com micropênis (pênis tracionado menor que 2,5 desvio-padrão). Após investigação endocrinológica específica, foram confirmados os déficits de GH, hormônio tireoidiano e gonadotrofinas. A ressonância nuclear magnética evidenciou hipoplasia hipofisária anterior. Não tinha antecedente de consanguinidade ou casos semelhantes na família.

Tabela 1. Características clínica, laboratorial e radiológica dos pacientes estudados

<i>Paciente</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Score Z</i> (altura)	<i>T₄ Livre</i> (ng/dL) (0,8-1,9)	<i>TSH</i> (uU/mL) (0,4-4)	<i>PRL</i> (ng/mL) M:2,5-17 F:1,9-25
1	M	3 anos e 3 meses	-0,4	0,77	6,05	24,2
2	F	1 ano e 3 meses	-0,85	0,55	6,47	6,5
3	M	3 anos e 5 meses	-5,8	1,00	2,69	64,5
4	M	3 anos e 5 meses	-3,48	0,7	1,9	15,9
5	F	13 anos e 10 meses	-5,7	0,535	6,5	13,3
6	M	14 anos e 3 meses	-2,6	1,3	2,6	4,13
7	M	18 anos e 5 meses	-6,4	1,13	2,88	6,7
8	M	14 anos e 3 meses	-3,0	1,65	3,74	18,1
9	F	16 anos e 9 meses	-6,0	0,71	3,02	#
10	F	9 anos e 3 meses	-4,49	0,63	0,005	22
11	M	14 anos	-2,9	0,71	1,33	8,77

<i>Paciente</i>	<i>FSH/LH (mUi/mL)</i>	<i>Cortisol (ug/dL)</i>	<i>Testosterona livre (pg/mL)</i>	<i>IGF1/ IGFBP3 (ng/mL)</i>	<i>Pico do GH no ITT (ng/mL)</i>	<i>RNM</i>
1	0,52/0,17	3,52	15,07	27/1610	#	HHA/NH E/HNO
2	#	5,8	#	8,8/1086	#	HHA/NH E/HNO
3	<0,1/0,1	7,74	0,01	#	#	HHA/MC C/Colobo ma
4	<1,0/0,6	3,9	0,7	#	0,5	HHA
5	0,32/0,1	1,89	#	#	0,54	Normal
6	4,13	10,98	0,34	#	6,5	Normal
7	6,7	18,6	9,74	#	0,33	Normal
8	18,1	14,5	0,96	#	0,73	Normal
9	#	2,57	#	#	#	HHA
10	22	<1	#	#	<0,25	HHA/NH E
11	8,77	15,5	0,84	#	5,6	HHA

: Dados não disponíveis no prontuário médico

M: sexo masculino

F: sexo feminino

HHA: hipoplasia de hipófise anterior

NHE: neuro hipófise ectópica

HNO: hipoplasia de nervo óptico

MCC: Má formação de corpo caloso

Parâmetros de Normalidade: LH: M: 0,8-7,6 mUi/mL, F: 1,1-11 mUi/mL, FSH: M: 0,7-11,1 mUi/mL, F: 2,8-11,3 mUi/mL, Cortisol: 5-25 ug/dL, Testosterona livre: 8,8-27 pg/mL, IGF1: 20-200, IGFBP3: 1400-4250ng/ml, pico do GH no ITT<7ng/ml.

3.2. Avaliação Hormonal

Os seguintes exames e testes endocrinológicos foram usados para confirmar o diagnóstico clínico dos pacientes:

- Para acessar a função da hipófise anterior, dosagens hormonais basais foram realizadas (TSH, T4 livre, PRL, LH, FSH, GH, IGF-1, IGFBP3, Cortisol, Testosterona).
- Dosagem de TSH, T4 livre, PRL, LH, FSH, Cortisol – Quimioluminescência, aparelho Immolite 2000 (*Kits* DPC, Los Angeles, CA).

Os valores de referência utilizados foram:

- TSH → 0,4 – 4 uUI/mL
- T4 livre → 0,8-1,9 ng/dL
- Prolactina → Sexo feminino: 1,9-25 ng/mL
→ Sexo masculino: 2,5-17 ng/mL
- LH → Sexo feminino: 1,1-11,6 mUI/mL
→ Sexo masculino: 0,8-7,6 mUI/mL
- FSH → Sexo feminino: 2,8-11,3 mUI/mL
→ Sexo masculino: 0,7-11,1 mUI/mL
- Cortisol → 5-25 ug/dL

- Dosagem de IGF-I: Ensaio imunorradiométrico após extração do etanol utilizando anticorpos monoclonais específicos (kit da Diagnostic Systems Laboratories Inc (DSL), Webster, TX, EUA).
O seguinte valor de referência foi utilizado para crianças até 6 anos: 20-200 ng/mL.
- Dosagem de IGFBP3 – Ensaio imunorradiométrico (Kit da DSL, Webster, TX, EUA).
O seguinte valor de referência foi usado para crianças de 3-4 anos: 1400-4250 ng/mL.
- Dosagem de GH e testosterona livre - Radioimunoensaio (RIE).
Para a dosagem de GH no teste de estímulo, foi considerado um valor menor do que 7 ng/mL como não responsivo.
Para a testosterona livre o valor de referência utilizado foi: 8,8-27 pg/nL (20-39 anos).
- Teste da clonidina: (administrado 100 ug/m² de superfície corporal, vo) com coletas de sangue para dosagem de GH no tempo basal, e nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após administração da clonidina.
- Teste combinado para avaliar função hipofisária: inclui a hipoglicemia induzida pela administração iv de 0,1U/Kg de peso de insulina (ITT) + 200ug de TRH + 100 ug de GnRH com coletas de sangue periférico para dosagem de glicemia, GH, cortisol, TSH, PRL, LH e FSH nos tempos -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a administração da medicação.

3.3. Avaliação Radiológica

A região hipotálamo-hipofisária foi avaliada por ressonância magnética obtendo-se cortes coronais e sagitais em T1 com TR 350 ms e TE=20 ms utilizando-se um aparelho Tesla 0,5 (Sigma GE, Milwaukee, Wiscosin, USA).

3.4. Análise Molecular

3.4.1. Extração de DNA

A extração, amplificação, sequenciamento do DNA e análise dos resultados foram realizados no laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

O DNA foi extraído pelo método de *Salting out*¹⁸.

3.4.2. Reação de Polimerização (PCR)

O exon 1 do *HESX1* dos onze pacientes em estudo, foi amplificado por PCR utilizando-se *primers* intrônicos previamente descritos¹¹ enquanto que o exon 2, exon 3 e exon 4 foram amplificados utilizando-se *primers* intrônicos desenhados em nosso laboratório, após padronização da reação com DNA controle (tabela 2).

Tabela 2: Primers intrônicos utilizados – HESX1

Exon	Seqüência 5'-3'
Exon 1	1F 5'-AGCTGTTGCTCTGTGCAGACCACGAGA-3' 1R 5'-ACAAAGAATTGAAACAATTAAGCTGTGGCA-3'
Exon 2	2F 5'-TTGACCATCTAAGACAGGGC-3' 2R 5'-AAGTGAGTGGGCTTTTGCTC-3'
Exon 3/4	3F 5'-GAGCAAAAGCCCACTCACTT-3' 4R 5'-CCACTGATTCTTCATGCTCT-3'

Exon 1 (*primer* sense -1F e anti sense -1R); Exon 2 (*primer* sense -2F e anti sense -2R); Exon 3 e 4 (*primer* sense -3F e anti sense -4R)

A reação foi realizada utilizando-se 300ng do DNA genômico em um volume final de 50 µL contendo: 20mmol/L Tris-HCL (ph 8,3); 50mmol/L KCL; 0,2 mmol/L de deoxy-NTP; 1,5mmol/L MgCl₂; 1,75 U Taq DNA polimerase e 20 pmol/L de cada *primer* específico (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

As condições da PCR usadas para amplificação do *HESX1* foram: 94 C° por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94C° por 30 segundos, 55 por 30 segundos, 72C° por 30 segundos com extensão final de 72C° por 10 minutos. Os produtos de PCR foram inicialmente purificados utilizando-se o *Kit Rapid PCR Purification Systems* (Marligen Bioscience).

Os exons 1,2 e 3 do gene *PROP1* dos cinco pacientes com deficiência hormonal hipofisária combinada foram amplificados utilizando-se primers intrônicos previamente descritos (tabela 3)¹⁷.

Tabela 3. Primers intrônicos utilizados – *PROP1*

Exon	Seqüência 5'-3'
Exon 1	1F 5'-ACCTACACACACATTTCAGAGACAG -3' 1R 5'-TGGAGCCTATGCTTTTCAGC -3'
Exon 2	2F 5'-AAAGACTGGAGCAGCACAGGACGCA- 3' 2R 5'-CTCAATGCAGTTGCTCTGATG -3'
Exon 3	3F 5'-GCCTTGTGGAAGAGCTTTACTCC 3' 4R 5'-ATTTCTAATCGCTGAGCTGACCC -3'

Exon 1 (*primer* sense -1F e anti sense -1R); Exon 2 (*primer* sense -2F e anti sense -2R); Exon 3 (*primer* sense -3F e anti sense -3R)

A reação foi realizada utilizando-se 300ng do DNA genômico em um volume final de 50 µL contendo: 20mmol/L Tris-HCL (ph 8,3); 50mmol/L KCL; 0,2 mmol/L de deoxy-NTP; 1,5mmol/L MgCl₂; 1,75 U Taq DNA polimerase e 15 pmol/L de cada *primer* específico (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

As condições da PCR usadas para amplificação do *PROP1* foram: 95C° por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95C°, 30 segundos a 60C°, 2 minutos a 72C°, ° e cinco minutos a 72C°. Os produtos

de PCR foram inicialmente purificados utilizando-se o *Kit Rapid PCR Purification Systems* (Marligen Bioscience).

3.4.3. Seqüenciamentos dos Exons Amplificados

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado o seguinte protocolo: 1 µL de *sense primer* a 1,6 pmol/µL, 2 µL de Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystems Foster City, CA, EUA), 1 µL de tampão Save Money, 1,5 µL de amostra, 4,5 µL de água.

O termociclador foi programado da seguinte forma: um ciclo de 10 segundos à temperatura de 96°C, um ciclo de 5 segundos à temperatura de 50°C e um ciclo de 4 segundos à temperatura de 60°C; repetido 25 vezes todas as etapas anteriores, terminando com a temperatura de 4°C. Para atingir as várias temperaturas desejadas, foi realizado um escalonamento de 1°C por 1 segundo.

Após a reação de seqüenciamento, os produtos foram submetidos à precipitação alcoólica e lidos no seqüenciador ABI Prism 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

As seqüências de DNA obtidas dos pacientes foram comparadas com as dos indivíduos normais (*PROP1 geneID*: 5626 e *HESX1 geneID*: 8820).

Resultados



4. Resultados

Os 11 pacientes portadores de deficiência de GH isolada, deficiência hormonal hipofisária combinada ou displasia septo-óptica foram divididos em 3 grupos de acordo com o quadro clínico.

1. Displasia septo-óptica (pacientes 1,2,3)
2. Deficiência isolada de GH (pacientes 6,7,8)
3. Deficiência hormonal hipofisária combinada (pacientes 4,5,9,10,11)

4.1. Estudo molecular

Todos os exons do gene *HESX1* dos 11 pacientes estudados foram adequadamente amplificados nos tamanhos esperados.

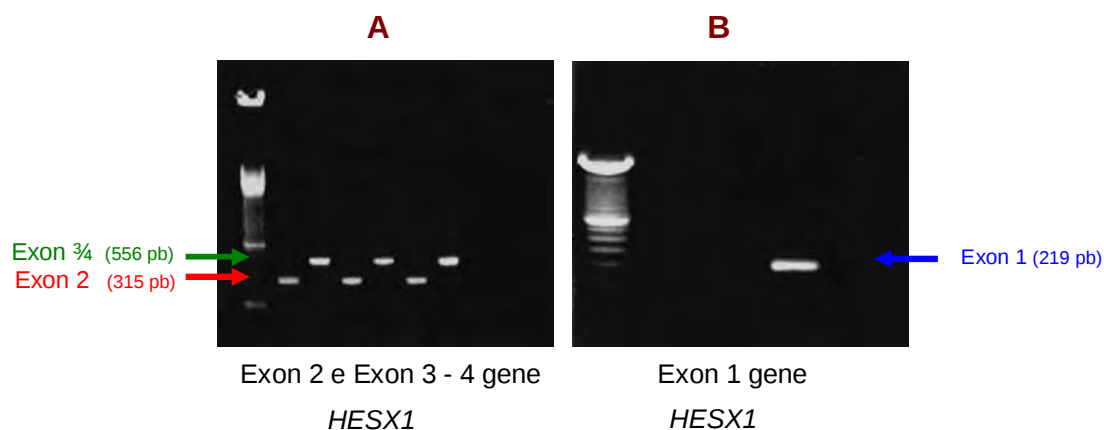


Figura 5. A: Amplificação dos exons 2 e 3 - 4 do gene *HESX1*

B: Amplificação do exon 1 do gene *HESX1*

pb: pares de base

Todos os exons do gene *PROP1* dos cinco pacientes estudados foram adequadamente amplificados nos tamanhos esperados.

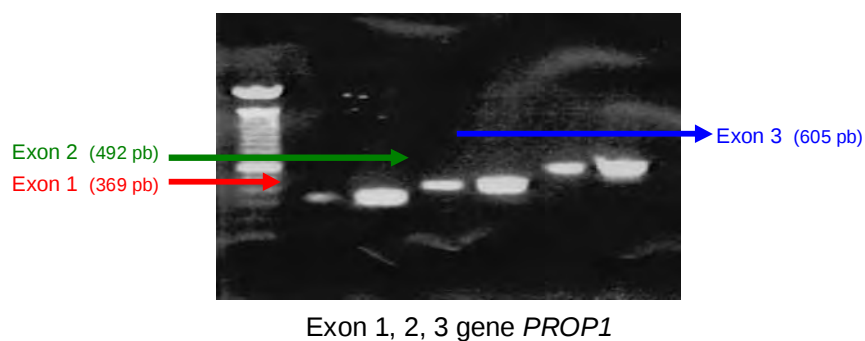


Figura 6. Amplificação dos exons 1, 2 e 3 do gene *PROP1*

pb: pares de base

Grupo 1. Pacientes com DSO

No estudo molecular dos três pacientes com DSO estudados, encontramos a mutação *missense* A1772G com a substituição de uma asparagina por uma serina na posição 125 (N125S) em estado de heterozigose no paciente 2 (figura 7).

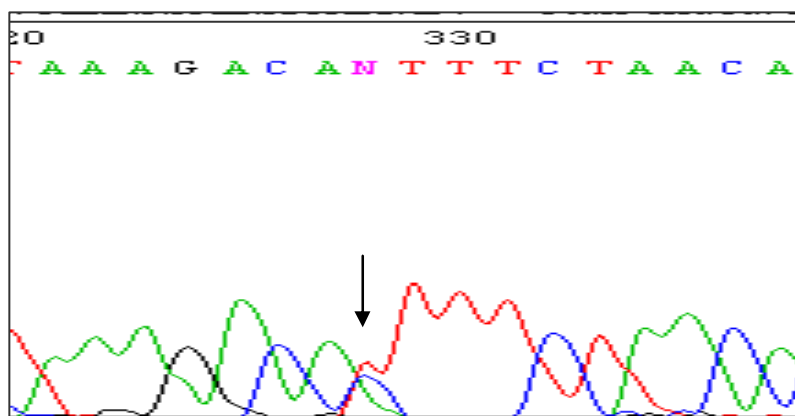


Figura 7: Resultado do sequenciamento da fita antisense do Exon 3 do gene *HESX1* do paciente 2. A seta assinala a troca do nucleotídeo T pelo C em heterozigose, levando a substituição de uma asparagina por serina no códon 125 (tabela 4)

Grupo 2. Pacientes com DGH

Não encontramos alterações no estudo molecular do gene *HESX1* dos três pacientes estudados.

Grupo 3. Pacientes com Deficiência hormonal hipofisária combinada

Nos cinco pacientes com deficiência hormonal hipofisária combinada estudados, não encontramos mutações do gene *HESX1*.

No estudo genético do *PROP1*, encontramos a variante alélica T27C em heterozigose nos pacientes 4 e 5 (figura 7) e em homozigose no paciente 10 (figura 8). Essa troca de nucleotídeos pode ser

considerada uma mutação silenciosa, já que não leva alteração do aminoácido codificado, que se mantém como alanina (A9A).

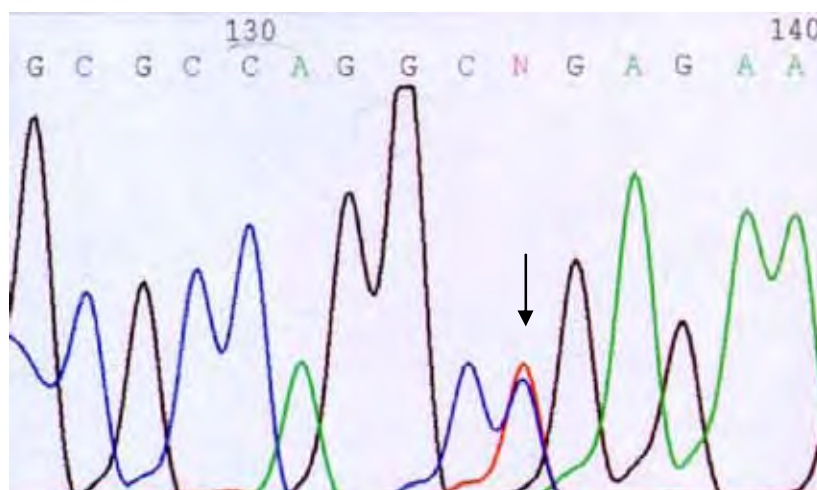


Figura 8: Resultado do sequenciamento da fita sense do Exon 1 do gene *PROP1* dos paciente 4 e 5. A seta assinala a troca do nucleotídeo T pelo C em heterozigose, sem promover alteração do aminoácido alanina no códon 9 (tabela 4).

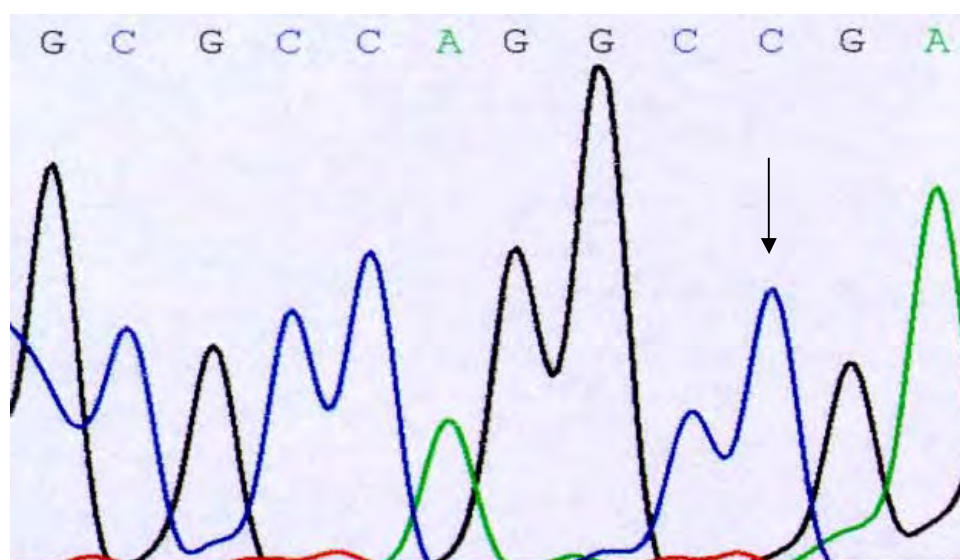


Figura 9: Resultado do sequenciamento da fita sense do Exon 1 do gene *PROP1* do paciente 10. A seta assinala a troca do nucleotídeo T pelo C em homozigose, sem promover alteração do aminoácido alanina no códon 9 (tabela 4).

Encontramos a variante alélica A59G em homozigose no códon 20 do exon 1 , caracterizada pela substituição de uma asparagina por serina, também nos pacientes 4,5 e 10 (figura 8).

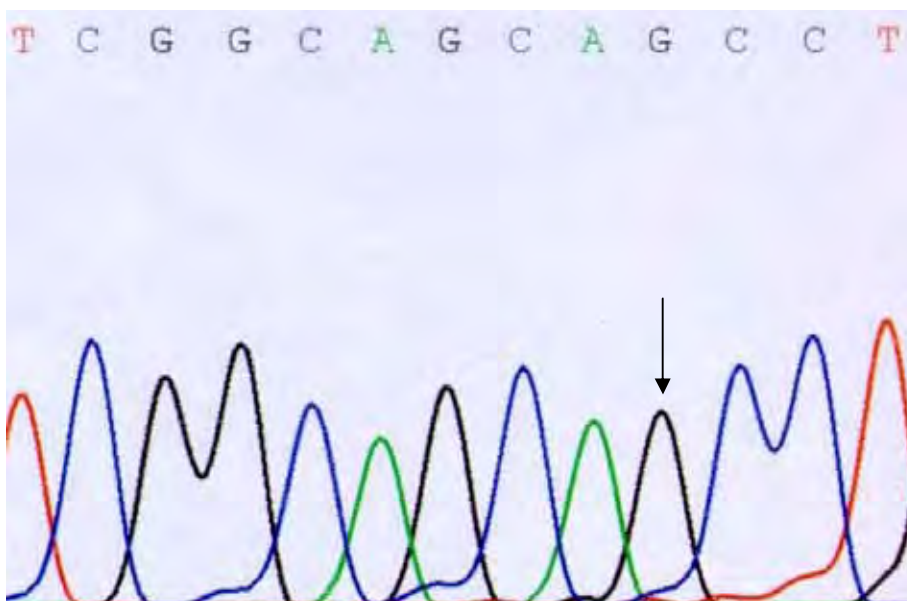


Figura 10: Resultado do sequenciamento da fita sense do Exon 1 do gene *PROP1* dos pacientes 4, 5 e 10. A seta assinala a troca do nucleotídeo A pelo G em homozigose, levando a substituição de uma asparagina por serina no códon 20 (tabela 4).

Tabela 4. Resultados encontrados no sequenciamento

Paciente	Quadro Clínico	Gene	Estudo Molecular
2	DSO	<i>HESX1</i>	N125S
4	DHHC	<i>PROP1</i>	A9A/N20S
5	DHHC	<i>PROP1</i>	A9A/N20S
10	DHHC	<i>PROP1</i>	A9A/N20S

DSO: Displasia septo-óptica, DHHC: deficiência hormonal hipofisária combinada, N: asparagina, S: serina, A: alanina.

Discussão



5. Discussão

Devido a grande variabilidade fenotípica relacionada às mutações no gene *HESX1*, estudamos pacientes com DGH isolado, deficiência hormonal hipofisária combinada e DSO.

A incidência descrita de DSO é 1/10. 000 nascidos vivos, e é igualmente prevalente no sexo feminino e masculino. Apesar de a condição ser geralmente esporádica, casos familiares têm sido descritos. Até a atualidade, Dattani *et al.*, rastrearam mais de 800 pacientes com DSO e deficiência hormonal hipofisária e identificaram mutações em menos de 1% dos indivíduos, confirmando a raridade de mutações no *HESX1*¹⁹.

Atualmente são descritas onze mutações do gene, que podem levar a fenótipos variados, incluindo defeitos de linha média, hipoplasia do nervo óptico, neuro-hipófise ectópica e hipoplasia hipofisária associada a deficiências hormonais¹³ (tabela 5 e figura 4). Indivíduos homozigotos para mutação recessiva Arg160Cys apresentam displasia septo-óptica (DSO/síndrome de Morsier) com agenesia do corpo caloso e deficiência hormonal hipofisária combinada¹². Já indivíduos com mutação heterozigótica dominante exibem fenótipos mais brandos, consistentes com haploinsuficiência da proteína *hesx1*²⁰.

Tabela 5. Mutações descritas no gene *HESX1*

Mutação	Fenótipo	RNM	Referência
Arg160Cys	DHHC/HNO	MCC/HHA	11
Gln6His	DHHC	HHA/NHE	21
Ser170Leu	DGH/HNO	Normal ou HHA e NHE	21
Thr181Ala	DGH	HHA	21
Ile26Thr	DHHC	HHA/NHE	14
306/307 ins AG	DHHC/HNO	HHA/NHE	20
1684delG	DHHC	MCC	15
Alu insertion exon 3	DHHC/coloboma	HHA	22
C.449_450delAC	DHHC/Hipoglicemia e insuficiência respiratória grave	Aplasia Hipofisária	23
C, 357 + 2Tb>C	DHHC/Hipoglicemia e insuficiência respiratória grave	Aplasia Hipofisária	23
Glu149Lys	DHHC/ Dedos supranumerários	HHA	13

HHA: Hipoplasia Hipofisária Anterior, NHE: Neurohipófise Ectópica.

HNO: Hipoplasia Nervo Óptico, MCC: Má Formação de Corpo Caloso

DHHC: Deficiência hormonal hipofisária combinada, DGH: déficit de hormônio de crescimento, DSO: displasia septo óptica.

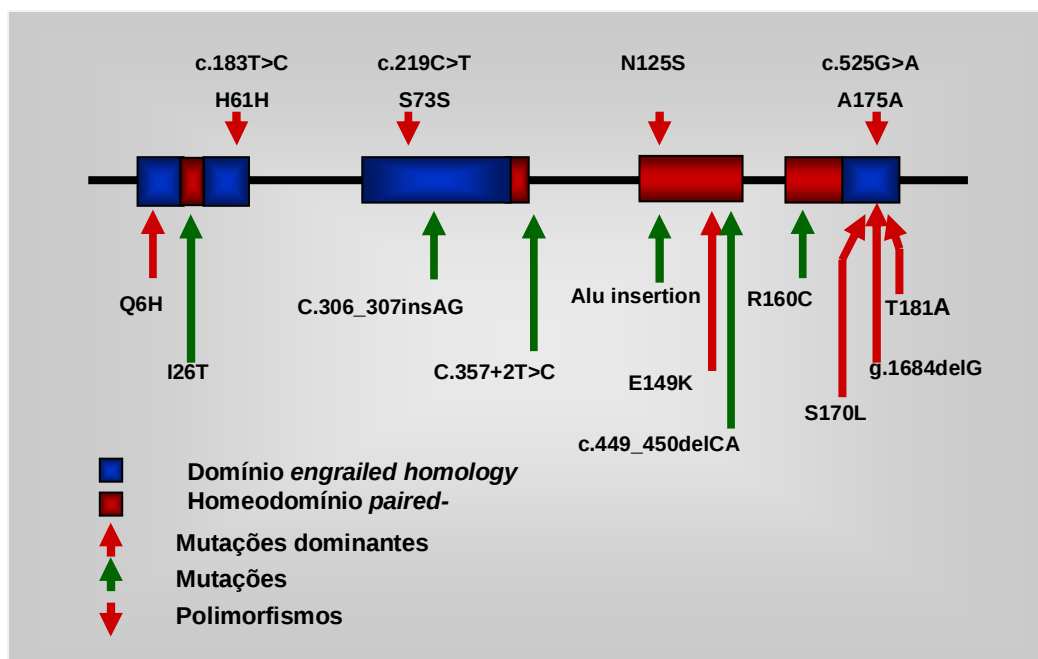


Figura 11. Adaptado Kelberman, D. Mutações descritas no gene *HESX1*¹⁹

A frequência de mutações no gene *HESX1* é baixa, sugerindo que mutações em outros genes, tais como *SOX3* e *SOX2*¹⁹, associados a fatores ambientais tais como crianças que nascem de mães muito jovens, contribuem para o surgimento da DSO. Além disso, mutações em outros fatores transcricionais, como o *PROP1*²⁴, contribuem para o fenótipo de deficiência hormonal hipofisária combinada familiar enquanto que mutações no gene *GH-1* ou no gene que codifica o receptor GHRH (*GHRHR*) são responsáveis pela maioria dos casos de DGH²⁵.

Até a atualidade, existem 22 mutações descritas no gene *PROP1*, identificadas em mais de 170 pacientes, sugerindo que mutações neste gene sejam as causas mais comuns de deficiência hormonal hipofisária combinada, contribuindo com aproximadamente 50% dos casos familiares. A incidência de mutações em casos esporádicos é muito menor¹⁶.

Em 2005, Dattani *et al.*, realizaram um *screening* mutacional em uma coorte de pacientes com deficiência hormonal hipofisária combinada, incluindo 189 casos esporádicos e 44 casos familiares. A prevalência de mutação no gene *PROP1* nos casos esporádicos foi muito baixa (1,1%), quando comparados aos casos familiares (29,5%)²⁶. No mesmo ano, Kirk *et.al.*, estudaram o gene *PROP1* em 27 crianças de 26 famílias com deficiência hormonal hipofisária combinada (apenas 3 famílias com mais de 1 membro afetado), e encontraram apenas um aumento da incidência do polimorfismo A9A, e não detectaram mutação no gene. Os autores atribuem esse achado às diferenças étnicas dos grupos estudados, e pela provável presença de efeito fundador em determinadas regiões com grande número de pacientes afetados²⁷.

Nos casos familiares, todos os indivíduos afetados apresentam herança recessiva, e a maioria das mutações descritas até o momento ocorre no sitio de ligação do DNA, no homeodominio, que é uma região altamente conservada nos camundongos e seres humanos, apresentando em torno de 91% de homologia entre os nucleotídeos. Como consequência dessas mutações, ocorre a perda da função da proteína, decorrente da incapacidade de ligação ao DNA e ativação da transcrição gênica. A mutação mais comum no gene *PROP1*, e que corresponde a 50-72% de todos os casos familiares, é a deleção de 2 pares de base no exon 2, resultando em uma mutação *frameshift* no códon 101 e introdução de um códon de parada na posição 109¹⁶.

Em 2005 Reynaud *et al.* descreveram a primeira mutação no gene *PROP1 downstream* ao homeodominio, levando a substituição de um resíduo de triptofano e introdução de um códon de parada na posição 194 no domínio de transativação, dando origem a uma proteína mutada apresentando apenas 34% da atividade quando comparada com a *wild-type*²⁸.

O modo de herança recessivo das mutações no gene se associa a deficiências hormonais combinadas, de GH, TSH, PRL e gonadotrofinas, apesar de serem variáveis o grau de severidade e o momento de aparecimento das deficiências. A maioria dos pacientes apresenta um quadro precoce de déficit de GH com atraso do crescimento, entretanto crescimento normal na infância já foi descrito em um paciente que atingiu estatura normal sem a reposição hormonal²⁹.

O déficit de TSH também é bastante variável, e em alguns casos já foi descrito como manifestação inicial, enquanto que em outros, como uma manifestação tardia^{30, 31, 32}.

Indivíduos com mutação no *PROP1* apresentam o eixo ACTH/cortisol preservado na infância, mas geralmente evoluem com deficiência do cortisol no decorrer da vida, se correlacionando positivamente com o aumento da idade³²⁻³⁶.

Apesar de o fator *Prop1* ser essencial para a diferenciação dos gonadotrofos na vida fetal, o espectro da deficiência de gonadotrofinas é

bastante variável, podendo variar de hipogonadismo com ausência completa do desenvolvimento puberal até casos com início puberal tardio e incompleto evoluindo com deficiência hormonal posterior com necessidade de reposição hormonal^{30, 31, 37,38}. A morfologia hipofisária nos pacientes com mutação no *PROP1* também é bastante variável, a maioria dos pacientes apresenta haste hipofisária e lobo posterior com desenvolvimento normal, e o lobo anterior hipoplásico¹⁶. Entretanto, já foi descrito em alguns pacientes o aumento hipofisário detectado por ressonância nuclear magnética, com posterior regressão e involução desse aumento glandular^{32, 35, 38, 39,40}.

O aumento hipofisário descrito consiste de uma massa que se interpõe entre o lobo anterior e posterior, originando-se possivelmente do lobo intermediário⁴⁰. Até a atualidade o mecanismo de involução dessa massa permanece incerto, existe apenas um caso descrito de biópsia dessa massa, e a histologia evidenciou a presença de material amorfo sem sinais de apoptose^{41, 42}.

Conseqüentemente a esta grande variabilidade fenotípica associada às mutações no gene *PROP1*, não pode ser identificada correlação genótipo-fenótipo nos pacientes afetados¹⁶.

Não encontramos mutação no gene *PROP1* nos 5 pacientes com deficiência hormonal hipofisária combinada estudados. Nosso resultado está de acordo com a literatura, já que a incidência de mutação em casos esporádicos é muito baixa. Verificamos três pacientes portadores da

variante alélica A9A e N20S, já descritos previamente na literatura como polimorfismos⁴³.

Nos pacientes com DSO, encontramos um paciente portador da variante alélica N125S em heterozigose, descrita previamente como polimorfismo Afro-Caribenho. Brickman *et al.* analisando o DNA de 461 pacientes encontraram 5 pacientes com quadros variáveis de SOD portadores dessa variante alélica, todos de descendência Afro-caribenha¹². Nesse mesmo estudo, analisando o DNA de 42 indivíduos normais de ascendência Afro-caribenha encontraram 5 indivíduos homozigotos para o alelo normal, 17 indivíduos homozigotos e 20 heterozigotos para a variante alélica. Embora seja considerada um polimorfismo, Brickman *et al.* sugerem que essa variação pode não ser inteiramente silenciosa, já que a substituição de uma serina por prolina na posição 18 análoga no homeodomínio do Prop1 tem sido implicada no fenótipo de camundongos Ames dwarf⁴⁴.

A ausência de mutação nos pacientes com DSO está de acordo com as outras séries de *screening* mutacional no gene *HESX1*, sugerindo que os fatores ambientais possam contribuir de forma importante para a patogênese da DSO, e que provavelmente outros genes ainda não descritos, estejam envolvidos nessa patogênese.

Os polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (*linkage*). Desta forma, se um gene próximo a

um marcador causa uma doença, todos os indivíduos afetados na família recebem tanto o marcador como o gene causador da doença. Embora o determinante genético para uma determinada patologia seja identificado através de uma mutação com herança mendeliana simples, os determinantes para a idade de início da doença e a variabilidade clínica existente entre indivíduos com a mesma mutação ainda são ignorados. Uma explicação possível seria que fatores ambientais, ou uma segunda mutação ou polimorfismo estaria interferindo na evolução da doença. Existe uma hipótese de que a troca de base na molécula do DNA cause a criação de um *splicing* alternativo levando a uma proteína alterada, ou então que o nucleotídeo modificado esteja em desequilíbrio de ligação com uma variante funcional ainda não conhecida⁴⁵.

Conclusões



6. Conclusão

Na análise do gene *HESX1* em 11 pacientes portadores de deficiência de GH, deficiência hormonal hipofisária combinada e DSO, encontramos em 1 paciente a variante alélica N125S, já descrita previamente como polimorfismo em pacientes Afro-Caribenhos.

Não verificamos mutação no gene *PROP1* nos 5 pacientes com deficiência hormonal hipofisária combinada estudados. Nosso resultado está de acordo com a literatura, já que a incidência de mutação em casos esporádicos é muito baixa. Encontramos três pacientes portadores da variante alélica A9A e N20S, já descritos previamente na literatura como polimorfismos.

A teoria de que o nucleotídeo modificado no polimorfismo esteja em desequilíbrio de ligação com uma variante funcional ainda não conhecida, favorece a hipótese de que essa alteração possa interferir na evolução da doença.

Referências Bibliográficas*

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.
National Library of Medicine. List of journal indexed in Index Medicus. Washington; 2003. 240p.

7. Referências Bibliográficas

1. CARRIÈRE, C., GLEIBERMAN, A., LIN, C., ROSENFELD, M. From panhypopituitarism to combined pituitary deficiencies: do we need the anterior pituitary? **Rev. Endocr. Metab. Disord**, v.5, n.1, p.5-13, 2004.
2. GLEIBERMAN, A. S., FEDTSOVA, N. G., ROSENFELD, M. G. Tissue interactions in the induction of pituitary: role of the ventral diencephalons, mesenchyme, and notocord. **Dev. Bio**, v. 213, n.2, p.340-353, 1999.
3. ARON, D. C., HOWLETT, T. A. Pituitary incidentalomas. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.**, v.29, n.1, p.205-221, 2000.
4. EAGLESON, G. W., HARRIS, W. A. Mapping of the presumptive regions in the neural plate of *Xenopus laevis*. **J.Neurobiol.**, v.21, p.427-440, 1990.
5. COULY, G., Le DOUARIN, N. M. The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo. **Development**, v. 103, (suppl.), p.101-113, 1988.
6. CARVALHO, L. R. S. **Análise do gene HESX1 em pacientes portadores de deficiência do hormônio do crescimento associada ou não a defeitos de linha média**. 2003. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

7. ASTERIA, C. T-box and isolated ACTH deciciency. **Eur. J Endocrinol.**, v.146, p.463-465, 2002.
8. PARKS, J. S., BROWN, M. R., HURLEY, D. L., PHELPS, C. J., WAJNRAJCH, M. P. Heritable disorders of pituitary development. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v.84, p.4362-4370, 1999.
9. MACHINIS K., PANTEL J., NETCHINE I., LEGER J., CAMAND O. J., SOBRIER, M. L., DASTOT-LE MOAL, F., DUQUESNOY, P., ABITBOL, M., CZERNICHOW, P., AMSELEM, S. Syndromic short stature in patients with germline mutation in the LIM homeobox LHX4. **Am J Hum Genet.**, v.69, n.5, p.961-968, 2001.
10. NETCHINE, I., SOBRIER M. L., KRUDE, H., SCHNABEL, D., MAGHNIE, M., MARCOS, E., DURIEZ, B., CACHEUX, V., MOERS, A., GOOSSENS, M., GRUTERS, A., AMSELEM, S. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combine pituitary hormone deficiency. **Nat Genet.**, v.25, n.2, p.182-186, 2000.
11. DATTANI, M., BARBERA, J., THOMAS, P., BRICKMAN, J., GUPTA, R. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. **Nat Genet.**, v.19,, p. 125-133, 1998.
12. BRICKMAN, J. M., CLEMENTS, M., TYRELL, R., MCNAY, D., WOODS, K., WARNER, J., STEWARD, A., BEDDINGTON, R. S., DATTANI, M. T. Molecular effects of novel mutations in Hesx1/HESX1 associated

- with human pituitary disorders. **Development**, v.128, n.24, p.5189-5199, 2001.
13. MCNAY, D. E., TURTON, J. P., KELBERMAN, D., WOODS, K. S., BRAUNER, R., PAPADIMITRIOU, A., KELLER, E., KELLER, A., HAUFS, N., KRUDE, H., SHALET, S. M., DATTANI, M. T. HESX1 Mutations are uncommon cause of Septooptic dysplasia and hypopituitarism. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v.92, n.2, p.961-967, 2006.
14. CARVALHO, I. R., WOODS, K. S., MENDONÇA, B. B., MARCAL, N., ZAMPPARINI, A. L., STIFANI, S., BRICKMAN, J. M., ARNHOLD, I. J. P., DATTANI, M. T. A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 1192-1201, 2003.
15. COHEN, R. N., COHEN, L. E., BOTERO, D., YU, C., SAGAR, A., JURKIEWICZ, M., RADOVICK, S. Enhanced repression by HESX1 as a cause of hypopituitarism and septooptic dysplasia. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v.88, p.4832-4839, 2003.
16. DATTANI, M.T, KELBERMAN, D. Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology. **Eur. J Endocrinol.**, v.157, p.3-14, 2007.
17. REYNAUD, R., CHADLI-CHAIEB, M., VALLETTE-KASIC, S., BARLIER, A., SARLES, S., PELLEGRINI-BOUILLER, I., ENJALBERT, A.,

- CHAIEB, L., BRUE, THIERRY. A familial form of congenital hypopituitarism due to a *PROP1* mutation in a large kindred: phenotypic and *in vitro* functional studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.89, n.11, p.5779-5789, 2004.
18. SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
19. KELBERMAN, D., DATTANI, M. T. Genetics of septo-optic dysplasia. **Pituitary**, v.10, p.393-407, 2007.
20. TAJIMA, T., HATTORRI, T., NAKAJIMA, T., OKUHARA, K., SATO, K., ABE, S., NAKAE, J., FUJIEDA, K. Sporadic heterozygous frameshift mutation of *HESX1* causing pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.88, p.45-50, 2003.
21. THOMAS, P. Q., DATTANI, M. T., BRICKMAN, J. M., MCNAY, D., WARNE, G., ZACHARIN, M., CAMERON, F., HURST, J., WOODS, K., DUNGER, D., STANHOPE, R., FORREST, S., ROBINSON, I. C., BEDDINGTON, R. S. Heterozygous *HESX1* mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. **Hum Mol Genet.**, v.10, n.1, p.39-45, 2001.
22. SOBRIER, M. L., NETCHINE, I., HEINRICHS, C., TRIBAUD, N., VIELUTON, M. P., VAN VLIET, G., AMSELEM, S. Alu-element insertion in

the homeodomain of HESX1 and aplasia of the anterior pituitary. **Hum Mutat.**, v.25, n.5, p.503-511, 2005.

23. SOBRIER, M. L., MAGHNIE, M., VIE-LUTON, M. P., SECCO, A., DI IORGI, N., LORIRI, R., AMSELEM, S. Novel HESX1 mutations associated with a life-threatening neonatal phenotype, pituitary aplasia, but normally located posterior pituitary and no optic nerve abnormalities. **J Clin Endocrinol Metabol.**, v.91, n.11, p.4528-4536, 2006.
24. REYNAUD, R., GUEYDAN, M., SAVEANU, A., VALLETTE-KASIC, S., ENJALBERT, A., BRUE, T., BARLIER, A. Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: experience in 195 patients. **J Clin Endocrinol Metabol.**, v.91, n.9, p.3329-3336, 2006.
25. DATTANI, M. T. Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? **Clin. Endocrinol.**, v.63, p.121-130, 2005.
26. TURTON, J.P, MEHTA, A., RAZA, J., WOODS, K.S, TIULPAKOV, A., CASSAS, J., CHONG, K., THOMAS, P.Q., EUNICE, M., AMMINI, A.C., BOULOUX, P.M., STARZYK, J., HINDMARSH, P.C., DATTANI, M.T. Mutations within the transcription factor PROP1 are a rare in a cohort of patients with sporadic combined pituitary hormone deficiency (CPHD). **Clin Endocrinol.**, v.63, n.1, p.10-8, 2005.

27. RAINBOW, L.A, REESE, S.A, SHAIKH, M.G, SHAW, N.J, COLET, T., BARRETT, T.G, KIRK, J.M.W. Mutation analysis of POUF-1, PROP-1 and HESX-1 show low frequency of mutations in children with sporadic forms of combined pituitary hormone deficiency and septo-optic dysplasia. **Clin Endocrinol.**, v.62 2005; 62: 163-68.
28. REYNAUD, R., BARLIER, A., VALLETTE-KASIC, S., SAVEANU, A., GUILLET, M.P, SIMONI, G., ENJALBERT, A., VALENSI, P., BRUE, T. An uncommon phenotype with familial central hypogonadism caused by a novel PROP1 gene mutant truncated in the transactivation domain. **J. Clin Endocrinol Metabol.**, v.90, p.4880-4887, 2005.
29. ARROYO, A., PERNASETTI, F., VASILYEV, V.V, AMATO, P., YEN, S.S, MELLON, P.L. A unique case of combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation (R120C) associated with normal height and absent puberty. **Clin Endocrinol.**, v.57, p. 283-291, 2002.
30. DELADOEY, J., FLUCK, C., BUYUKGEBIZ, A., KUHLMANN, B.V, EBLE, A., HINDMARSH, P.C, WU, W., MULLIS, P.E. 'Hot spot' in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. **J. Clin Endocrinol Metabol.**, v.84, p.1645-1650, 1999.
31. FLUCK, C., DELADOEY, J., RUTISHAUSER, K., EBLE, A., MARTI, U., WU, W., MULLIS, P.E. Phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation resulting in the substitution of Arg-Cys at codon 120 (R120C). **J. Clin Endocrinol Metabol.**, v.83, p.3727-3734, 1998.

32. MENDONÇA, B.B, OSORIO, M.G, LATRONICO, A.C, ESTEFAN, V., LO, L.S, ARNHOLD, I.J. Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP1 gene. **J. Clin Endocrinol Metabol.**, v.84, p.942-945, 1999.

33. ASTERIA, C., OLIVEIRA, J.H, ABUCHAM, J., BECK-PECCOZ, P. Central hypocortisolism as part of combined pituitary hormone deficiency due to mutations of PROP-1 gene. **Eur. J. Endocrinol.**, v.143, p.347-352, 2000.

34. PERNASETTI, F., TOLEDO, S.P, VASILYEV, V.V., HAYASHIDA, C.Y., COGAN, J.D, FERRARI, C., LOURENCO, D.M., MELLON, P.L. Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301-302delAG) in the prophet of *Pit-1* gene. **J. Clin Endocrinol Metabol.**, v.85, p.390-397, 2000.

35. RIEPE, F.G, PARTSCH, C.J, BLANKENSTEIN, O., MONIG, H., PFAFFLE, R.W., SIPPELL, W.G. Longitudinal imaging reveals pituitary enlargement preceding hypoplasia in two brothers with combined pituitary hormone deficiency attributable to *PROP1* mutation. **J. Clin Endocrinol. Metabol.**, v.85, p.390-397, 2000.

36. BOTTNER, A., KELLER, E., KRATZSCH, J., STOBBE, H., WEIGEL, J. F., KELLER, A., HIRSCH, W., KIESS, W., BLUM, W.F., PTAFFLE, R.W. *PROP1* mutations cause progressive deterioration of anterior

pituitary function including adrenal insufficiency: a longitudinal analysis.

J. Clin Endocrinol. Metabol., v.89, p.5256-5265, 2004.

37. VATTETTE-KASIC, S., BARLIER, A., TEINTURIER, C., DIAZ, A., MANAVELA, M., BERTHEZENE, F., BOUCHARD, P., CHAUSSAIN, J.L., BRAUNER, R., PELLEGRINI-BOUILLER, I., JAQUET, P., ENJALBERT, A., BRUE, T. *PROP1* gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and high incidence of corticotroph deficiency. **J. Clin Endocrinol Metabol.**, v.86, p.4529-4535, 2001.
38. WU, W. , COGAN, J.D., PFAFFLE, R. W., DASEN, J. S., FRISCH, H., O'CONNELL, S. M. ,FLYNN, S. E, BROWN, M. R., MULLIS, P.E, PARKS, J. S, PHILLIPS, J. A III, ROSENFELD, M. G.Mutations in *PROP1* cause familial combined pituitary hormone deficiency. **Nat. Genet.**, v.18, p.147-149, 1998.
39. FOFANOVA, O., TAKAMURA, N., KINOSHITA, E., VORONTSOV, A., VLADIMIROVA, V., DEDOV, I., PETERKOVA, V., YAMASHITA, S. Mr imaging of the pituitary gland in children and young adults withcongenital combined pituitary hormone deficiency associated with *PROP1* mutations. **Am. J. Roentgenol.**, v.174, p.555-559, 2000.
40. VOUTETAKIS, A., ARGYROPOULOU, M., SERTEDAKI, A., LIVADAS, S., XEKOUKI, P., MANIATI-CHRISTIDI, M., BOSSIS, I., THALASSINOS, N., PATRONAS, N., DACOU-VOUTETAKIS, C. Pituitary magnetic resonance imaging in 15 patients with *Prop1* gene

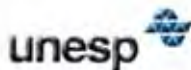
mutations: pituitary enlargement may originate from the intermediate lobe. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, v.89, p.2200-2206, 2004.

41. PARKS, J.S., BROWN, M.R., BAUMBACH, L., SANCHEZ, J.C., STANLEY, C.A., GIANELLA-NETO D, WU, W., OYESIKU, N. Natural history and molecular mechanisms of hypopituitarism with large sella turcica. In: ANNUAL MEETING OF THE ENDOCRINE SOCIETY, 80., 1998, New Orleans. Proceedings... New Orleans, 1998. p.470.
42. CUSHMAN, L. J., WATKINS-CHOW, D. E, BRINKMEIER, M. L., RAETZMAN, L. T, RADAK, A. L., LLOYD, R. V., CAMPER, S. A. Persistent Prop1 expression delays gonadotrope differentiation and enhances pituitary tumor susceptibility. **Hum. Mol. Genet.**, v.10, p.1141-1153, 2001.
43. NCB. **Management Incorporated Services**. Disponível em: <<http://www.ncbi.com>>. Acesso em: dia, 18 jul. 2008.
44. SORNSON, M. W., WU, W., DASEN, J. S., FLYNN, S. E., NORMAN, D. J., O'CONNELL, S. M., GUKOVSKY, I., CARRIERE, C., RYAN, A. K., MILLER, A. P., ZUO, L., GLEIBERMAN, A. S., ANDERSEN, B., BEAMER, W. G., ROSENFELD, M. G. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. **Nature**, v.384, pn.6607, p.327-333, 1996.
45. ROCHA, A. P., MAGALHÃES, P. K. R., MAIA, A. L., MACIEL, L. M. Z. Polimorfismos Genéticos: implicações na patogênese do carcinoma

medular de tireóide. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v 51, p. 723-730, 2007.

Anexos





Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 03 de outubro de 2.005

OF. 331/2005-CEP

*Ilustríssima Senhora
Prof.ª Dr.ª Célia Regina Nogueira
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Dr.ª Célia,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Pesquisa de mutações nos genes PROP 1 e HESX 1 em pacientes portadores de deficiência hormonal hipofisária combinada (CHPD)", de autoria de Juliana de Barros Cruz e Sandro José Conde, orientados por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/10/2005.

Situação do projeto perante o CEP: APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP, haja vista cumprir a Resolução 340/2004.

Atenciosamente,

*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

BOTUCATU, SP – RUBIÃO JÚNIOR – CEP: 18618-970 – CP: 584 – FONE: (14) 3811-2969 – FAX: (14) 3882-2238

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa de mutações nos genes PROP1 e HESX1 em pacientes portadores de deficiência hormonal hipofisária combinada (CHPD).

Eu, _____, declaro-me informado (a) a respeito do trabalho acima, do qual, ao assinar esse termo, passarei a fazer parte, declarando-me ciente e tendo sido me explicado que:

1. O estudo se iniciará com a coleta do meu sangue para pesquisa de mutações relacionadas com a minha doença. Fui esclarecido sobre o significado do termo mutação, que se trata de uma alteração no meu gen (material transmitido de pai /mãe para filho) que posso transmitir para meus filhos ou que meus pais e irmãos possam transmitir aos seus filhos.
2. Não sou obrigado a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso leve a que eu deixe de ser tratado como os demais pacientes assistidos na instituição.
3. Os resultados obtidos poderão ser usados a meu favor, já que saberei como a doença que eu tenho é transmitida.
4. O sigilo médico será garantido.
5. Serei informado dos resultados e se necessário, as informações também serão dadas para os demais membros da minha família.
6. Qualquer dúvida adicional que vier ter durante o acompanhamento será devidamente esclarecida pelo médico responsável.

Estando ciente e de acordo, assino a presente nas duas vias de igual teor, juntamente com o médico responsável.

Botucatu, de _____ 2005

 Paciente ou responsável

 Juliana de Barros Cruz
 campos Sales, 954, Botucatu
 38131494
juendocinho@yahoo.com.br

 Dra. Célia Regina Nogueira
 HC UNESP-Departamento de Clínica Médica
 38116213
nogueira@fmb.com.br