ADRIANA FARRANT BRAZ

Farmacogenética do tratamento com hormônio de
crescimento em pacientes com síndrome de Turner

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Braz, Adriana Farrant

Farmacogenética do tratamento com hormônio de crescimento em pacientes
com síndrome de Turner / Adriana Farrant Braz. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Síndrome de Turner 2.Farmacogenética 3.Medicina
individualizada 4.Hormônio do crescimento humano/genética 5.Hormônio do
crescimento humano/uso terapêutico 6.Receptores da somatotropina/genética
7.Fator de crescimento insulín-like I/genética 8.Proteínas de ligação a fator de
crescimento insulín-like/genética 9.Polimorfismo genético/efeitos de drogas

USP/FM/DBD-161/13

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM 42) e na Unidade de Endocrinologia Genética (LIM 25), da disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com apoio financeiro do CNPq 05/04726-0 e bolsa de doutorado direto CAPES demanda social.

INVICTUS

Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.

In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.

Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.

It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.

William Ernest Henley

DEDICATÓRIA

Amar e ser amado: o sentido da vida.

Ser profundamente amado por alguém nos dá força.
Obrigada, Mamãe e Papai, por seu amor incondicional.

Amar alguém intensamente nos dá coragem e razão para viver. Obrigada, Tiaguinho (Tiago) e Guga (Gustavo), por terem me permitido ser mãe e sentir o que é amar sem medidas.

AGRADECIMENTOS

Audaciosa... Minha definição por Alex, meu orientador.

Obrigada, mestre querido, amigo, por ter acreditado que uma mãe de dois filhos, arrimo de família, longe de sua terra natal e de sua família, com escassos recursos financeiros, recém-saída da especialização em Endocrinologia Pediátrica, pudesse se transformar em pesquisadora. Sua dedicação nos inspira, seu conhecimento nos ensina, sua exigência extrai o nosso melhor, sua paciência permite que nos escute e compreenda, e, sobretudo, sua sabedoria o deixa aprender conosco.

O bom aluno – aquele que normalmente se distingue entre os melhores – é o que sabe intuir o professor. Superando-o. Assim foi e é meu mestre, Alex. O melhor professor é aquele que ensina sem receio de ser ultrapassado por quem aprende. Superando-se e sendo capaz de construir a maior das riquezas, o conhecimento. Assim foram e são os mestres de meu mestre, Dra. Berenice e Dr. Ivo. Agradeço muitíssimo a ambos pela oportunidade de conviver e aprender com essas duas lendas da Endocrinologia Pediátrica.

Sou também grata pelos ensinamentos e amizade dos assistentes da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - LIM42, todos bons alunos dos mestres do meu mestre: Dra. Ana Cláudia, Dra. Tânia, Dr. Vinícius, Dra. Elaine, Dra. Sorahia, Dra. Cândida, Dra. Luciani e Dra. Regina. Assim como agradeço a amizade dos mais novos assistentes, discípulos dos assistentes seniores: Madson, Letícia, Larissa, Antônio, Milena e Éricka.

O meu muito obrigada a todos os funcionários e pós-graduandos do LIM 42 e LIM 25 pela convivência e carinho. Cidinha e Mariana, biólogas do LIM 42, obrigada pelo auxílio na bancada, assim como Éricka, pesquisadora do LIM 25.

Agradeço a oportunidade de ter conhecido as minhas amigas e companheiras da pós-graduação, integrantes do Grupo de Crescimento: Débora, Luciana, Everlayny, Marcela, Alexsandra, Patrícia, Aline, Andrea, Fernanda, Ana, Renata, Ândria e Gabriela. Todas me ensinaram, incentivaram, ajudaram e transformaram esses quatro anos em dias de agradável convivência. Em especial, agradeço a Evy que, como pós-graduanda sênior e predecessora da minha linha de pesquisa, ensinou-me tudo o que sabia de biologia molecular e estatística. Da mesma forma, agradeço a Luciana, outra de nossas pós-graduandas seniores, pelo treinamento e ajuda na bancada. Também não poderia deixar de agradecer muito a Renata pelo auxílio na coleta, no atendimento e na organização dos dados de minha casuística de Síndrome de Turner, da mesma forma que sou muito grata a Alexsandra, responsável por iniciar a casuística do trabalho e por me ajudar a atender as pacientes. Aline e Ana, obrigada por me acolherem com tanto carinho. Amigas, Chaplin já dizia que “cada pessoa que

passa na nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa pela nossa vida passa sozinha, não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Aos nossos colaboradores, Sonir Antonini e Gil Guerra-Júnior, muito obrigada por enriquecerem a casuística desse trabalho, partilhando conosco os dados de suas pacientes com Síndrome de Turner. Também gostaria de agradecer a meus professores e preceptores da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo pela sólida formação clínica que me proporcionaram nos 5 anos de residência de Pediatria e Endocrinologia Pediátrica.

A meus pacientes, minha gratidão por serem instrumento de meu conhecimento e por, diariamente, fazerem-me acreditar no exercício da profissão de médico.

Alexandre, não poderia deixar de agradecer-lhe por me fazer compreender o que disse Lao-Tsé: “conhecer os outros é inteligência, conhecer-se a si próprio é verdadeira sabedoria”. Esta tese foi um dos caminhos que trilhei em busca do autoconhecimento. Os outros estão sendo descobertos com sua ajuda.

Yolanda e Ana Cristina, minhas amigas-irmãs, obrigada por aparecerem em minha vida assim que saí da faculdade e mudei-me para São Paulo. Vocês duas me inspiraram a fazer Pediatria. Muito obrigada por serem minha família aqui em São Paulo e terem me dado todo o apoio e, Yo, até mesmo um lar. Sábias são as palavras de Shakespeare quando disse que “amigos são a família que nos permitiram escolher”.

E a **minha família**... O que seria de mim sem ela?!

Meus amados filhos, Tiaguinho e Guga, como posso agradecer-lhes pelo sacrifício que fizeram ao me apoiarem a viver esse sonho, mesmo que significasse viver longe de sua mãe por 3 longos anos e terem de se contentar com minha presença quinzenal e meus telefonemas diários? Foram dias difíceis, suportados apenas pelo amor que nos une e pela certeza de que essa conquista seria importante, para que pudéssemos ter uma vida futura mais estruturada que permitisse uma maior convivência e trocas. Hoje, sabemos o quanto isso é verdadeiro.

Meus queridos pais, Eliezer e Rilda, e irmãos, Teca (Maria Ester), Eli (Eliezer) e Claudinha (Cláudia), obrigada por serem meus alicerces. Obrigada por amarem e cuidarem de meus filhos enquanto estive longe e por me encorajarem a nunca desistir. Também gostaria de agradecer aos meus caros sobrinhos, Larissa, Safira, Ester, Lucas e Davi, assim como a meu cunhado, Fábio, e minha cunhada, Risele, pelo ajuda e carinho.

Meus estimados padrinhos e tios, Edgar e Ester, obrigada pelas visitas que me fizeram em São Paulo. Seu amor e apoio foram indispensáveis, para que concluísse este trabalho.

A todos meus tios e tias, assim como primas e primos, agradeço a doce convivência e o apoio.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Farmacogenética	6
1.1.1 Farmacogenética e estudos de associação genética	7
1.1.2 Farmacogenética do tratamento com rhGH	9
1.2 Polimorfismos candidatos	13
1.2.1 Gene do Receptor do Hormônio do Crescimento (<i>GHR</i>)	13
1.2.1.1 Presença ou ausência do éxon 3 do <i>GHR</i>	14
1.2.2 Gene da proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile (<i>IGFBP3</i>)	16
1.2.2.1 Polimorfismo -202 A/C da região promotora do <i>IGFBP3</i>	17
1.2.3 Gene do Fator de Crescimento Insulina Símile-1 (<i>IGF1</i>)	18
1.2.3.1 Microsatélite (CA) _n da região promotora do <i>IGF1</i>	19
2 OBJETIVOS	21
3 MÉTODOS	23
3.1 Considerações éticas	24
3.2 Casuística	24
3.2.1 Critérios de inclusão	25
3.2.2 Controles	25
3.3 Protocolo de acompanhamento clínico	26
3.4 Dosagens hormonais	27
3.5 Coleta de dados para análises multivariadas	27
3.6 Estudos Moleculares	28
3.6.1 Preparação das amostras- extração de DNA genômico <i>Salting-out</i>	28
3.6.2 Metodologias de genotipagem	29
3.6.2.1 Presença ou ausência do éxon 3 do <i>GHR</i>	29
3.6.2.2 Polimorfismo -202 A/C da região promotora do <i>IGFBP3</i>	30
3.6.2.3 Microsatélite (CA) _n na região promotora do <i>IGF1</i>	33
3.7 Análises Estatísticas	35
4 RESULTADOS	38
4.1 Caracterização da casuística	39
4.2 Distribuição genotípica	41
4.3 Análises das variáveis clínicas que influenciam a resposta ao tratamento com rhGH	42
4.4 Análises das variáveis genéticas que influenciam a resposta ao tratamento com rhGH	43
4.4.1 Microsatélite (CA) _n do <i>IGF1</i>	43

4.4.2	Presença ou ausência do éxon3 do <i>GHR</i>	45
4.4.3	Polimorfismo -202 A/C do <i>IGFBP3</i>	50
4.4.4	Efeito interativo entre os polimorfismos estudados	54
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	65
7	REFERÊNCIAS	67

LISTAS

ABREVIATURAS

19/19 CA	Genótipo homozigoto para o alelo de 19 repetições CA
a.C	Antes de Cristo
AF	Altura final
ALS	Subunidade ácido lábil
(CA) _n	Repetições citosina – adenosina de número variável
COLIA1	Colágeno tipo1 α 1
DGH	Deficiência de hormônio de crescimento
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GH	Hormônio de crescimento
GHR	Receptor de hormônio de crescimento
GHRd3	Alelo do <i>GHR</i> com deleção do éxon 3
GHRd3/*	Genótipo apresentando pelo menos 1 alelo GHRd3
GHRfl	Alelo do <i>GHR</i> completo (sem deleção do éxon 3)
GWAS	Estudos de associação global do genoma
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC	Idade cronológica
IFMA	Ensaio imunofluorimétrico
IGF-1	Fator de crescimento insulina-símile tipo 1
IGFBP-3	Proteína ligadora de IGFs tipo 3
IGFBPs	Proteínas ligadoras de IGFs (IGF binding proteins)
IMC	Índice de massa corporal
IO	Idade óssea
IQMA	Ensaio de quimioluminescência
IRMA	Ensaio imunorradiométrico
LD	Desequilíbrio de ligação
NaCl	Cloreto de sódio
não 19CA	Alelo do <i>locus</i> (CA) _n IGF1 diferente de 19 repetições CA

não 19CA / *	Genótipo contendo pelo menos 1 alelo não 19CA
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia
NH ₄ HCO ₃	Carbonato de amônia
PAR 1	Região pseudo-autossômica 1
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIG	Pequeno para idade gestacional
rhGH	Hormônio de crescimento recombinante humano
RIA	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
SHOX	Short Stature Homeobox
SNP	Polimorfismo de base única
SOCS	<i>Supressors of cytokine signaling</i>
ST	Síndrome de Turner
Stat5b	<i>Signal transducers and activator of transcription B</i>
TH	<i>Target height</i> (altura-alvo)
VC	Velocidade de crescimento
VNTR	Variações no número de sequências repetidas
Z	Escore de desvio-padrão
Z AF – Z TH	Z da altura final ajustado pelo Z da <i>target-height</i>

SÍMBOLOS

<	Menor
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
Δ	Delta
μl	Microlitro
cm/ano	Centímetros por ano
K	Kilo
Kb	Kilobase
M	Molar
mg/ml	Miligramma por mililitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
ng/ml	Nanograma por mililitro
ng/μl	Nanograma por microlitro
nm	Nanômetro
U/kg/dia	Unidades por kg por dia
μg/kg/d	Micrograma por kg por dia
μg/ml	Micrograma por mililitro

FIGURAS

Figura 1 -	Variabilidade de respostas de crescimento em pacientes com síndrome de Turner, tratadas na Unidade de Endocrinologia de Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP.....	4
Figura 2 -	Representação esquemática da estrutura do gene do <i>GHR</i>	13
Figura 3 -	Representação esquemática da estrutura do gene <i>IGFBP-3</i> e do polimorfismo -202 A/C <i>IGFBP-3</i>	18
Figura 4 -	Representação esquemática da estrutura do gene <i>IGF-1</i> e do microssatélite (CA) _n da região promotora do <i>IGF1</i>	20
Figura 5 -	PCR <i>multiplex</i> para genotipagem da presença ou ausência do éxon 3 do <i>GHR</i>	30
Figura 6 -	Foto de gel de agarose contendo produtos de digestão enzimática da genotipagem do SNP rs2854744.....	31
Figura 7 -	Genotipagem por PCR em tempo real utilizando o ensaio TaqMan [®] do SNP rs2854744	33
Figura 8 -	Análise dos fragmentos do microssatélite (CA) _n do <i>IGF-1</i> por <i>Gene Scan</i> de um paciente heterozigoto para os alelos 19CA/18CA, o fragmento de 192 pb corresponde ao alelo com 19 repetições CA e o fragmento de 190 pb corresponde ao alelo com 18 repetições.....	35
Figura 9 -	Distribuição genotípica dos polimorfismos estudados.....	41
Figura 10 -	Influência do genótipo do <i>microssatélite (CA)_n IGF1</i> na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.....	43
Figura 11 -	Influência do genótipo do microssatélite (CA) _n <i>IGF1</i> na altura final de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.....	44
Figura 12 -	Influência do genótipo do <i>GHR</i> éxon 3 na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.....	45

Figura 13 -	Metanálise: Impacto do polimorfismo do <i>GHR</i> éxon 3-deletado na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento com rhGH de pacientes com síndrome de Turner. Resultados positivos indicam uma resposta ao tratamento favorável aos carreadores de uma ou duas cópias do alelo <i>GHR</i> -d3	46
Figura 14 -	Influência do genótipo do <i>GHR</i> éxon 3 na altura final (cm) de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.....	47
Figura 15 -	Influência do genótipo -202 A/C <i>IGFBP3</i> nas concentrações de IGFBP3 pré e pós-tratamento de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH	50
Figura 16 -	Influência do genótipo do <i>GHR</i> éxon 3 na velocidade de crescimento do 1º ano de tratamento de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH	51
Figura 17 -	Influência do genótipo do <i>GHR</i> éxon 3 na altura final (cm) de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.....	54
Figura 18 -	Influência dos genótipos combinados do <i>GHR</i> éxon 3 e do -202 A/C <i>IGFBP3</i> na altura final (cm) de pacientes com Síndrome de Turner tratadas com rhGH.....	56

TABELAS

Tabela 1 -	Fatores clínicos preditivos de resposta ao tratamento com rhGH de crianças com síndrome de Turner que atingiram estatura final	6
Tabela 2 -	Características clínicas de 112 pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH	40
Tabela 3 -	Características clínicas e laboratoriais de 112 pacientes com síndrome de Turner conforme genótipo do <i>GHR</i> -éxon 3.....	48
Tabela 4 -	Características clínicas dos 74 controles (pacientes com síndrome de Turner não tratadas com rhGH) conforme genótipo do <i>GHR</i> -éxon 3	49
Tabela 5 -	Características clínicas e laboratoriais de 112 pacientes com síndrome de Turner conforme genótipo -202 A/C <i>IGFBP3</i>	52
Tabela 6 -	Características clínicas dos 74 controles (pacientes com síndrome de Turner não tratadas com rhGH) conforme genótipo do -202 A/C <i>IGFBP3</i>	53
Tabela 7 -	Características clínicas e laboratoriais de 112 pacientes com síndrome de Turner conforme genótipos combinados <i>GHR</i> -éxon 3 e -202 A/C <i>IGFBP3</i>	57

RESUMO

Braz AF. *Farmacogenética do tratamento com hormônio de crescimento em pacientes com síndrome de Turner* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013. 84 p.

A resposta individual ao tratamento com hormônio de crescimento recombinante humano (rhGH) na síndrome de Turner (ST) é muito variável. A falta de individualização da dose pode justificar a variabilidade de respostas e os resultados insatisfatórios de algumas pacientes mesmo quando diagnosticadas e tratadas em condições ideais. Como a resposta ao tratamento com rhGH reflete fatores genéticos e não genéticos, o objetivo do presente estudo é avaliar a influência de fatores genéticos no tratamento com rhGH das portadoras de ST. Foram estudadas 112 pacientes com ST, em tratamento ou que interromperam a terapia, após atingir a altura final. O DNA genômico de todas as pacientes foi obtido para estudo de três polimorfismos em genes envolvidos na ação do GH: a presença ou ausência do éxon 3 do receptor do GH (*GHR*), VNTR presente na região promotora do gene do fator de crescimento insulina-símile-1 (*IGF1*) e polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) presente na região promotora do gene da Proteína 3 de Ligação a Fator de Crescimento Insulina-símile (*IGFBP3*). Os achados moleculares foram correlacionados com a velocidade de crescimento no primeiro ano de tratamento (n=112) e com altura adulta (n=65) após uso de rhGH por meio de análises de regressão linear simples e múltipla, ajustadas para as demais variáveis clínicas relacionadas à resposta ao tratamento com rhGH em ST. Dois desses polimorfismos – a presença (*GHR-fl*) ou ausência (*GHR-d3*) do éxon 3 do *GHR* e o polimorfismo -202 A/C *IGFBP-3*- influenciaram de forma independente e interativa a capacidade de resposta ao tratamento com rhGH em pacientes com ST; e o VNTR de repetições (CA)_n da região promotora do *IGF1* não demonstrou influência sobre nenhum dos parâmetros analisados. Pacientes carreadoras de, pelo menos, um alelo *GHR-d3* apresentaram melhor velocidade de crescimento e maior altura final após tratamento com rhGH do que as homozigotas para o alelo *GHR-fl*. Similarmente, as carreadoras de, pelo menos, um alelo -202 A/*IGFBP3* apresentaram melhor velocidade de crescimento e maior altura final após tratamento com rhGH, além de maiores concentrações séricas de *IGFBP-3*, do que as homozigotas para o alelo -202 C/*IGFBP3*. Finalmente, a análise conjunta dos genótipos *GHR-éxon 3* e -202 A/C *IGFBP3* mostrou uma clara influência epistática, parcialmente aditiva, desses dois polimorfismos comuns na altura adulta de pacientes com ST tratadas com rhGH (efeito isolado do *GHR-éxon 3*, $R^2 = 0,27$; efeito isolado do -202 A/C *IGFBP3*, $R^2 = 0,24$; influência combinada desses polimorfismos, $R^2 = 0,37$). Em conjunto com as variáveis clínicas, altura ao início do tratamento ($p < 0,001$) e idade cronológica ao início da puberdade ($p < 0,001$), estes dois polimorfismos são capazes de prever 61% da variabilidade da altura adulta, após uso de rhGH. Embora estudos de validação sejam ainda necessários, acredita-se que as informações geradas por este e outros estudos - direcionados a um melhor entendimento das bases moleculares envolvidas na capacidade de resposta ao tratamento com rhGH - possam servir no futuro como importante ferramenta de individualização do tratamento com rhGH.

Descritores: 1.Síndrome de Turner 2.Farmacogenética 3.Medicina Individualizada 4.Hormônio do crescimento humano/genética 5.Hormônio do crescimento humano/uso terapêutico 6.Receptores da somatotropina/genética 7.Fator de crescimento insulina -símile I/genética 8.Proteínas de ligação a fator de crescimento insulina-símile/genética 9.Polimorfismo genético/efeitos de drogas

SUMMARY

Braz AF. *Growth hormone pharmacogenetics in patients with Turner syndrome* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013. 84p.

Individual response to treatment with recombinant human growth hormone (rhGH) in Turner syndrome (TS) is very variable. The lack of individualization of rhGH dosing may explain the variability of response and the unsatisfactory results for some patients even when diagnosed and treated in ideal conditions. As the response to treatment with rhGH reflects genetic and nongenetic factors, the objective of this study is to evaluate the influence of genetic factors on rhGH treatment of patients with TS. We studied 112 patients with TS in rhGH therapy or who have discontinued therapy after adult height. Genomic DNA from all patients was obtained for the study of three polymorphisms in genes involved in GH action: the presence or absence of exon 3 of the GH receptor (GHR), VNTR in the promoter region of the gene for insulin-like growth factor-1 (IGF1) and a single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of the gene insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3). Molecular findings were correlated with the first-year growth velocity ($n = 112$) and adult height ($n = 65$) after rhGH therapy using simple and multiple linear regressions analysis adjusting for other clinical variables related to the response to rhGH treatment on TS. Two of these polymorphisms - the presence (GHR-fl) or absence (GHR-d3) of the GHR exon 3 polymorphism and -202 A / C IGFBP-3 independently and interactively influenced the response to rhGH treatment in patients with TS, whereas the VNTR in the promoter region of the gene for IGF1 showed no influence on any of the parameters analyzed. Patients carrying at least one d3-GHR allele have better first-year growth velocity and greater adult height after rhGH treatment than those homozygous for GHR-fl allele. Similarly, the carriers of at least one -202 A-IGFBP3 allele showed better first-year growth velocity and greater adult height after rhGH treatment, besides higher serum IGFBP-3 levels, than those homozygous for -202 C-IGFBP3 allele. Finally, the combined analysis of GHR-exon 3 and -202 A / C IGFBP3 genotypes have demonstrated a clear epistatic influence, partially additive, of these two common polymorphisms on adult height of patients with TS treated with rhGH (isolated effect of GHR-exon 3, $R^2 = 0.27$; isolated effect of the -202 A / C IGFBP3, $R^2 = 0.24$; combined influence of these polymorphisms, $R^2 = 0.37$). In conjunction with the clinical variables, baseline height (SDS) ($p < 0.001$) and chronological age at onset of puberty ($p < 0.001$), these two polymorphisms are able to predict 61% of the variability in adult height after rhGH therapy. Although validation studies are still needed, we believe that the information brought by this and other studies whose efforts are to understand the molecular basis involved in responsiveness to rhGH treatment can serve as an important tool in the future individualization of treatment with rhGH.

Descriptors: 1. Turner Syndrome; 2. Pharmacogenetics; 4. Growth Hormone; 5. Receptors, Somatomedin; 6. Insulin-Like Growth Factor I; 7. Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins; 8. Polymorphism, Genetic; 8. Individualized Medicine

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Turner é caracterizada pela perda total ou parcial de um dos cromossomos sexuais em fenótipo feminino^(1, 2). É uma das anomalias cromossômicas mais comuns, responsável por 7% a 10% de todos os abortamentos espontâneos. Afeta 3% de todos os conceptos do gênero feminino, mas apenas 1% desses conceptos sobrevive a termo, o que resulta em uma prevalência de 1:2500 recém-nascidos do gênero feminino⁽³⁾. Nos centros de referência para tratamento de síndrome de Turner, metade das pacientes têm cariótipo 45,X, 20%-30% são mosaicismos e o restante são anormalidades estruturais^(4, 5). Em mulheres normais, um dos cromossomos X é inativado nas células somáticas durante a embriogênese⁽⁶⁾. Entretanto, 15%-25% dos genes presentes no X inativo continuam sendo expressos e permanecem ativos em ambos os cromossomos X. Trinta e um dos 34 genes conhecidos que escapam à inativação estão no braço curto do X e muitos têm genes homólogos no cromossomo Y, compondo a região pseudoautossômica 1 (PAR1) dos cromossomos sexuais⁽⁷⁾. Parte do fenótipo da síndrome de Turner resulta da haploinsuficiência desses genes que escapam à inativação⁽⁸⁾. A baixa estatura e a disgenesia gonadal são as características fenotípicas mais frequentes nesta síndrome, com incidência acima de 90%⁽⁹⁾. A baixa estatura tem início pré-natal, persiste por toda a infância e agrava-se na puberdade pela ausência de estirão de crescimento em razão da falência ovariana, o que resulta em estatura final 20 cm abaixo da média populacional^(1, 9, 10).

A perda de uma das cópias do gene *SHOX*, ou seja, sua haploinsuficiência, é responsável por dois terços da baixa estatura observada nas pacientes com síndrome

de Turner, bem como explica alguns aspectos dismórficos e malformações característicos desta síndrome como: micrognatia, palato ogival, cúbito valgo, 4º metacarpo curto, deformidade de Madelung e surdez neurossensorial⁽¹¹⁻¹³⁾. O *SHOX* faz parte de uma família de fatores de transcrição tipo *homeobox* que está relacionada com a regulação do desenvolvimento. O *SHOX* ocupa uma região de, aproximadamente, 40 kb na PAR1 (Xp22.3 e Yp11.3). Durante o período embrionário, sua expressão restringe-se aos membros e aos arcos faríngeos, podendo ser detectada nos osteoblastos de embriões humanos a partir do segundo mês de gestação⁽⁸⁾. Esses achados sustentam a ideia de que o gene é fundamental para o desenvolvimento ósseo. A exata função do *SHOX* ainda não é conhecida. Estudos sugerem que o *SHOX* atue como repressor da diferenciação dos condrócitos, retardando a fusão das cartilagens de crescimento⁽⁹⁾. Também é sugerido que o *SHOX* atue na organização colunar das células em proliferação na cartilagem de crescimento⁽⁹⁾. A haploinsuficiência do *SHOX*, portanto, poderia levar a uma diferenciação prematura dos condrócitos, acelerando a fusão da cartilagem epifisária o que resultaria em parada prematura do crescimento⁽⁹⁾.

Nessa síndrome, embora não haja deficiência de hormônio de crescimento, o uso terapêutico do hormônio de crescimento recombinante humano (rhGH) é amplamente empregado para promover a melhora da altura final⁽¹⁰⁾. Estudos prospectivos randomizados mostram que as pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH ganham em média um desvio padrão ao final do tratamento⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. O início precoce e a utilização de doses suprafisiológicas (50 µg/Kg/dia ou 0,15 UI/kg/dia) melhoram a resposta ao tratamento com rhGH na síndrome de Turner⁽¹⁸⁻²¹⁾. Todavia, as respostas terapêuticas em curto e longo prazo são muito variáveis^{(22,}

²³⁾ como podemos observar pelas velocidades de crescimento de 112 pacientes com síndrome de Turner no primeiro e segundo anos de tratamento com rhGH, assim como pela altura adulta de 65 dessas pacientes tratadas com 0,15 UI/kg/dia rhGH na Unidade de Endocrinologia de Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP (Figura 1).

Figura 1 - Variabilidade de respostas de crescimento em pacientes com síndrome de Turner tratadas na Unidade de Endocrinologia de Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP.

Com o objetivo de antever e explicar em parte a variabilidade da resposta ao tratamento com rhGH, foram desenvolvidos modelos preditivos de crescimento⁽²⁴⁻²⁶⁾. Tais modelos de predição são algoritmos derivados de análises de regressão linear múltipla, contendo variáveis clínicas que influenciam o crescimento em resposta ao tratamento com GH em determinado grupo de indivíduos durante determinado período. Com base no conhecimento da importância relativa de cada variável, são geradas fórmulas matemáticas que permitem obter uma medida objetiva do potencial

de crescimento de cada indivíduo em resposta ao tratamento com GH em distintas causas de baixa estatura a fim de se obter o máximo de custo-efetividade com a menor dose cumulativa possível. Já foram desenvolvidos diversos modelos de previsão de resposta ao tratamento com GH em diferentes causas de baixa estatura^(27, 28) (Tabela 1). Os melhores modelos explicam de 46% a 61% da variabilidade interindividual da resposta no primeiro ano de tratamento na síndrome de Turner e são menos capazes de prever a altura adulta após o tratamento com rhGH^(23, 27-30). A incapacidade de prever a resposta terapêutica de cada paciente com precisão inviabiliza a individualização da dose empregada e pode, em parte, justificar a variabilidade de respostas e os resultados insatisfatórios de algumas pacientes^(31, 32).

A baixa aplicabilidade clínica dos modelos de predição de resposta ao tratamento com rhGH vigentes, decorrente do baixo poder preditivo e da baixa precisão da previsão, tem gerado crescente interesse pela incorporação de variáveis adicionais, como marcadores bioquímicos e genéticos que possam melhorar a acurácia da previsão e, assim, permitir que, no futuro, o tratamento com rhGH possa ser individualizado, conforme as necessidades específicas de cada paciente⁽²⁴⁾.

Tabela 1 - Fatores clínicos preditivos de resposta ao tratamento com rhGH de crianças com síndrome de Turner que atingiram estatura final.

Variáveis de predição	Efeito	Referência
Características no início do tratamento		
1. Idade de início do tratamento	-	(23, 29, 30)
2. Z da altura ao iniciar o tratamento	+	(23, 30)
3. Idade óssea ao iniciar o tratamento	-	(29, 30)
4. Z de peso inicial	-	(30)
Características inerentes ao paciente		
5. Altura dos pais	+	(23, 30)
6. Comprimento ao nascimento	+	(30)
Aspectos do tratamento		
7. Dose de rhGH	+	(23, 30)
8. Resposta do tratamento no primeiro ano	+	(23)
9. Tempo de tratamento antes da puberdade	+	(29)
10. Duração do tratamento com rhGH	+	(30)
11. Idade do início da puberdade	+	(23, 30)

Variáveis com efeito positivo (+) estão diretamente relacionadas com variáveis de desfecho (velocidade de crescimento, ganho de altura ou altura final), enquanto as variáveis com efeito negativo (-) são inversamente correlacionadas com as variáveis-alvo.

1.1 Farmacogenética

As diferenças quanto às respostas terapêuticas entre os indivíduos podem estar associadas com polimorfismos genéticos presentes em genes que afetam a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) ou a farmacodinâmica (ação no tecido-alvo e cascata de sinalização). Tais polimorfismos podem alterar a expressão e/ou a função de uma proteína envolvida na cinética e/ou na ação de uma determinada medicação, com consequente modulação de seus efeitos^(33, 34). A farmacogenética, ciência que estuda a contribuição da carga genética

sobre as variações individuais de resposta a tratamentos farmacológicos⁽³⁴⁻³⁶⁾, desenvolveu-se nesse contexto.

Já em 510 a.C. Pitágoras observou que a ingestão de determinadas favas provocava intoxicação em alguns indivíduos, mas não em todos (favismo)⁽³⁷⁾. Em 1956, Alving *et al.* descobriram que o aparecimento de anemia hemolítica após a ingestão dessas favas, bem como de ácido acetilsalicílico, primaquina, fenacetina e sulfonamidas devia-se à deficiência enzimática de glicose-6-fosfato-desidrogenase⁽³⁸⁾. O termo farmacogenética foi cunhado, em 1959, pelo farmacologista e geneticista alemão Friedrich Vogel, 2 anos após Arno Motulsky publicar um artigo⁽³⁹⁾ em que sugeria, pela primeira vez, que as diferenças interindividuais na eficácia ao tratamento com algumas drogas, bem como no aparecimento de efeitos adversos a medicações, poderiam ser parcialmente atribuídos às diferenças genéticas herdadas.

1.1.1 Farmacogenética e estudos de associação genética

A maior parte dos estudos de farmacogenética usa os estudos de associação, como abordagem para estabelecer relação genótipo-fenótipo⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Classicamente, há dois tipos de estudos: gene-candidato e estudos envolvendo todo genoma (*genome wide association studies*- GWAS). A primeira estratégia utiliza conhecimentos de fisiologia, fisiopatologia ou estudos de *linkage*, para a seleção dos genes mais provavelmente envolvidos na determinação do efeito na variável em estudo, resultando, portanto, em menor custo financeiro e operacional de genotipagem, além de um menor “custo estatístico”, por minimizar o efeito dos “múltiplos testes” sobre o poder estatístico do estudo^(41, 43). No caso da farmacogenética, a escolha dos genes

candidatos baseia-se na farmacocinética e na farmacodinâmica da droga de interesse⁽³⁶⁾. Definidos os genes candidatos, polimorfismos nestes genes que podem ser deleções, inserções, substituições de base única (SNP), ou variações no número de sequências repetidas (VNTR) – microssatélites - são utilizadas como marcadores genéticos para detectar a associação de interesse, tal como o perfil de resposta ao tratamento farmacológico. Os polimorfismos de base única (SNPs) são os marcadores mais usados nesses estudos em razão de sua alta frequência (cerca de 1 SNP a cada 300pb) e facilidade de genotipagem. Os estudos de associação que envolvem todo genoma (GWAS) utilizam tecnologia de *microarray* para genotipar centenas de milhares de SNPs (500.000 a 1 milhão) simultaneamente e testam a associação destes com o fenótipo investigado^(44, 45). É uma abordagem que permite a identificação de genes que não seriam escolhidos na estratégia de gene candidato e, desta forma, permite o desenvolvimento de novos paradigmas, porém seu custo efetivo é alto.

Em qualquer dessas abordagens, a associação entre uma determinada variante e o fenótipo estudado é estabelecida pela análise de regressões logísticas para variáveis-alvo nominais ou pela análise de regressões lineares para variáveis-alvo contínuas, em geral corrigindo para outros fatores que possam influenciar as variáveis alvo. A presença de associação nem sempre implica causalidade. Os marcadores genéticos podem estar tanto diretamente relacionados à variabilidade observada (variante funcionalmente importante) como estar em desequilíbrio de ligação (associação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci*, não necessariamente no mesmo cromossomo) com outra variante que não foi diretamente estudada, mas que é causativa⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Com relação à seleção dos polimorfismos a serem estudados, uma metodologia comumente utilizada é a chamada “estratégia do polimorfismo candidato” em que poucos polimorfismos de importância funcional previamente descrita ou altamente provável são selecionados para estudo⁽⁴⁹⁾. Entretanto, embora seja muito eficiente, esta estratégia nem sempre é possível, já que o número de polimorfismos de importância funcional conhecida é reduzido. Assim, quando não há evidências de um possível “polimorfismo candidato” nos genes de interesse ou, simplesmente, quando se pretende conhecer toda variabilidade comum de determinado gene, pode-se utilizar uma segunda estratégia que use os chamados *Tag SNPs*, que são um conjunto de SNPs cuidadosamente escolhidos com base no padrão de desequilíbrio de ligação de determinada população, capazes de capturar a maior parte da variabilidade genética da região do genoma selecionada^(41, 48, 50). Dentro de um bloco haplótipo, ocorre pouca ou nenhuma recombinação e seus SNPs tendem a serem passados juntos nas gerações posteriores. Portanto, o emprego de *Tag SNPs* é capaz de distinguir cada haplótipo⁽⁴⁷⁾.

1.1.2 Farmacogenética do tratamento com rhGH

Os estudos de farmacogenética do tratamento com rhGH iniciaram-se em 2004, quando Dos Santos *et al.*⁽⁵¹⁾ demonstram a influência positiva de um polimorfismo comum no gene do receptor de GH (*GHR*) - a ausência do éxon 3 (*GHRd3*) - na resposta ao tratamento com rhGH de crianças, com baixa estatura idiopática e nascidas pequenas para a idade gestacional. A melhor resposta ao tratamento de pacientes com este polimorfismo foi também observada em relação à velocidade de crescimento e altura final em pacientes com deficiência de GH em

nosso grupo⁽⁵²⁾ e em crianças com síndrome de Turner por Binder *et al.*^(53, 54). Alguns estudos não conseguiram replicar esses achados⁽⁵⁵⁾, três deles em síndrome de Turner^(56, 57), mas duas metanálises recentes confirmaram a importância desse polimorfismo em modular a resposta ao tratamento com rhGH em diversas condições clínicas^(55, 58). Como a altura tem herança complexa, supõe-se que a modulação da resposta ao tratamento com rhGH deva estar sob influência de mais de um gene chave, o que motivou novos estudos nessa área empregando a abordagem de gene candidato.

Um SNP localizado na posição -202 da região promotora do *IGFBP3* (rs2854744), uma troca de adenosina por citosina, também demonstrou estar envolvido na farmacogenética do rhGH, pois modula de forma independente as concentrações séricas de IGFBP-3, assim como a resposta ao tratamento com rhGH de crianças com DGH⁽⁵⁹⁾ e pequenas para idade gestacional (PIG)⁽⁶⁰⁾. Indivíduos homozigotos para o alelo A no locus -202 da região promotora do *IGFBP3* apresentam velocidades de crescimento e concentrações séricas de IGFBP-3 superiores às de indivíduos homozigotos para o alelo C durante o tratamento com rhGH.

Outro polimorfismo do eixo GH/IGF1 que foi associado à resposta ao tratamento com rhGH em indivíduos com DGH é um microssatélite (CA)_n na região promotora do *IGF1* (D12S0043i)⁽⁶¹⁾. Os indivíduos homozigotos para o alelo de 19 repetições CA na região promotora do *IGF1* apresentam velocidade de crescimento e altura final inferiores às dos indivíduos carreadores de, pelo menos, um alelo alternativo.

Estudos de farmacogenética no tratamento com hormônio de crescimento envolvendo genes fora do eixo GH/IGF1, associaram um SNP no gene *COL1A1* (colágeno tipo1 $\alpha 1$) à resposta ao tratamento de adultos com deficiência de GH que usaram injeções subcutâneas de rhGH⁽⁶²⁾. Os indivíduos homozigotos para o alelo G necessitam de doses maiores de rhGH e apresentam razões IGF1/GH menores que os que são homozigotos para o alelo T, sem que haja diferença nas concentrações séricas de IGF1 entre os genótipos.

Uma das limitações desses estudos é a falta de avaliação da interação entre duas ou mais variantes gênicas que, na maioria das vezes, não são claramente aditivas. A detecção e a caracterização de epistasias, ou interações não aditivas entre genes, ainda constituem um importante desafio para os estudos de associação genética, geralmente, requerendo um grande número de indivíduos para que se alcance adequado poder estatístico. Nosso grupo avaliou a interação do microssatélite (CA)_n do IGF1 com os polimorfismos -202 A/C *IGFBP3* e *GHR*-éxon 3 em crianças com DGH⁽⁶¹⁾. Os genótipos (CA)_n *IGF1* e -202 A/C *IGFBP3* influenciam de forma interativa a velocidade de crescimento no primeiro ano de tratamento com rhGH em crianças pré-púberes com DGH, enquanto os genótipos (CA)_n *IGF1* e *GHR*-éxon 3 influenciam de forma interativa a altura final, após tratamento com rhGH nesses pacientes⁽⁶¹⁾. Outro estudo recente mostrou um efeito aditivo do genótipo *GHR*- éxon 3 e do polimorfismo *COL1A1* nos pacientes adultos com DGH em uso de doses substitutivas de rhGH⁽⁶³⁾. Os pacientes carreadores de pelo menos um alelo com deleção para o éxon3 do *GHR* e homozigotos para o alelo T do polimorfismo *COL1A1* requerem doses menores de rhGH quando comparados

aos homozigotos para os alelos sem deleção do éxon 3 do *GHR* e G do polimorfismo *COL1A1*.

Os resultados das análises combinadas realizadas nesses estudos são ainda bastante limitados. No entanto, uma análise global da consistência dos resultados fornece indícios bastante interessantes de melhora do poder preditivo de resposta ao tratamento com rhGH, à medida que variáveis genéticas adicionais são incluídas no modelo de predição⁽⁵⁴⁾; sugerindo que estudos futuros com casuísticas maiores sejam capazes de fornecer dados mais conclusivos sobre a natureza dessas interações.

No presente estudo, optou-se pela estratégia do polimorfismo candidato, uma vez que já haviam sido descritos polimorfismos comuns e de importância funcional nos genes de interesse, propiciando, dessa forma, uma melhor relação de custo-efetividade no processo de investigação. O uso dos achados dos estudos de farmacogenética na prática clínica ainda é modesto e o impacto individual da maioria das variações genéticas é pequeno. No entanto, a interação de diversas variantes pode acarretar um efeito significativo no fenótipo. Por este motivo, este estudo visa a continuar a análise da associação de diferentes polimorfismos em genes-chave envolvidos nos mecanismos de ação do GH/IGF-1 com a resposta do tratamento com rhGH em pacientes com a síndrome de Turner.

1.2 Polimorfismos candidatos

1.2.1 Gene do Receptor do Hormônio do Crescimento (*GHR*)

O GHR é codificado por um único gene localizado no cromossomo 5 no locus p13.1-p12, apresentando 87 kb de extensão (Figura 2). A região codificadora é composta pelos éxons 2 a 10. O éxon 2 codifica os 11 pb finais da região 5' não traduzida, a sequência que codifica 18 aminoácidos (aa) sinalizadores para o transporte intracelular da proteína e os cinco primeiros aminoácidos da porção extracelular do GHR. Os éxons 3 a 7 codificam a maior parte da porção extracelular do GHR (238 aa, que corresponde ao domínio de ligação do hormônio ao receptor). O éxon 8 codifica os três últimos aminoácidos do domínio de ligação do hormônio, os 24 aa hidrofóbicos que compõem o domínio transmembrânico e os quatro primeiros aminoácidos do início da porção intracelular. Os éxons 9 e 10 codificam os 346 aa restantes do domínio intracelular, essenciais para a transdução do sinal; e o éxon 10 também codifica a sequência 3' não traduzida do *GHR*^(64, 65) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do gene do *GHR*.

1.2.1.1 Presença ou ausência do éxon3 do *GHR*

A ausência do éxon 3 é um polimorfismo comum do *GHR*, e, na população caucasiana, cerca de 43 % dos indivíduos são homozigotos para o *GHR full length* (*GHRfl/fl*), 12% são homozigotos para *GHR* com éxon 3 deletado (*GHRd3/d3*) e 46% são heterozigotos (*GHRfl/d3*)^(53, 66-69). Embora estudos iniciais tenham documentado um padrão de expressão tecido específico, evidências subsequentes demonstraram que a expressão dessas duas isoformas de *GHR* é específica para cada indivíduo e transmitida como um traço mendeliano^(70, 71). O mecanismo de origem das duas isoformas foi revelado por Pantel *et al.*, que demonstraram que a perda do éxon 3 resultava de um processo de recombinação homóloga entre duas sequências retrovirais flanqueadoras desse éxon que ocorreu exclusivamente em humanos⁽⁶⁸⁾. O *GHR* gerado pelo alelo *GHRd3* apresenta deleção de 22 aminoácidos, além da substituição do aminoácido ácido aspártico por alanina (conservado em espécies de mamíferos) na região amino-terminal do receptor, correspondente ao domínio de ligação ao GH⁽⁶⁸⁾. Estes aminoácidos não participam diretamente na ligação do hormônio ao receptor, de forma que ambas as isoformas, *GHRfl* e *GHRd3*, apresentam constantes de dissociação semelhantes com o ligante⁽⁷²⁾. Por outro lado, estudos funcionais demonstraram que células transientemente transfectadas com *GHRd3* induzem transdução do sinal após tratamento com GH 30% superior ao de células transfectadas com *GHRfl*⁽⁵¹⁾. Não houve diferença na atividade transcricional observada entre as células transfectadas com *GHRd3* isolado ou associado ao *GHRfl*, sugerindo efeito dominante do alelo *GHRd3*.

Em 2004, Dos Santos *et al.*⁽⁵¹⁾, ao estudarem 172 crianças divididas em duas coortes independentes de crianças nascidas pequenas para a idade gestacional e com

baixa estatura idiopática tratadas com doses semelhantes de rhGH, demonstraram que pacientes portadores de, pelo menos, um alelo *GHRd3* apresentavam incremento na velocidade de crescimento durante os primeiro e segundo anos de tratamento com rhGH de 2 a 3 cm/ano superior ao dos pacientes homozigotos para o alelo *GHRfl* ($p < 0,0001$). O genótipo em relação ao éxon 3 foi o principal fator preditivo de resposta ao tratamento com rhGH após ajuste para gênero, idade de início de tratamento e dose.

Em 2006, nosso grupo avaliou a influência desse mesmo polimorfismo sobre a resposta ao tratamento com rhGH de pacientes com DGH bem caracterizada. Pacientes homozigotos para o alelo *GHRfl* apresentaram menor velocidade de crescimento e menor ganho de altura no primeiro ano de tratamento, assim como menor altura final ao término do tratamento, quando comparados com pacientes carregando, pelo menos, um alelo *GHRd3*. A diferença média de altura final em escores de desvios-padrão entre os dois grupos foi de 0,9, favorecendo os pacientes carregadores de, pelo menos, um alelo *GHRd3*⁽⁵²⁾. Os resultados de estudos posteriores em pacientes com DGH^(66, 73-75), pequenos para idade gestacional⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾, com baixa estatura idiopática^(69, 79) e com síndrome de Turner^(53, 54, 56, 57) quanto à influência positiva do alelo *GHRd3* na resposta ao tratamento com rhGH não foram uniformes, mas duas metanálises envolvendo todas essas condições clínicas evidenciaram a presença de uma influência pequena, mas, significativa do genótipo *GHR* exon3 sobre a velocidade de crescimento no primeiro ano de tratamento com rhGH^(55, 58).

1.2.2 Gene da proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile (*IGFBP3*)

A IGFBP-3 (*Insulin-like growth factor binding protein 3*) é uma das seis proteínas transportadoras das IGFs (*insuline like growth factors*), contém 264 aminoácidos, e é a IGFBP mais abundante na circulação, ligando, aproximadamente, 85% a 90% do IGF-1 circulante. A IGFBP-3 apresenta concentrações séricas constantes sem aparente variação circadiana, e é responsável por aumentar a vida média das IGF-1 de 6 horas para 20 horas⁽⁸⁰⁾. As concentrações de IGFBP-3 mostram estreita correlação com as concentrações de GH e IGF-1.

Concentrações reduzidas de IGFBP-3 são observadas em pacientes com déficit de GH, nas síndromes de insensibilidade ao GH e em situações de restrição calórica, e concentrações elevadas são observadas em pacientes com acromegalia. A administração de GH a pacientes com déficit de GH induz a um aumento nas concentrações de IGFBP-3 circulante. A IGFBP-3 é capaz de modular as ações do IGF-1 em nível tecidual, pois além de atuar como reservatório de IGFs, pode também inibir ou potencializar suas ações. Além disso, apresenta ações independentes do IGF-1 sobre a proliferação celular, ações estas descritas, como inibitórias ou estimuladoras em função do tecido estudado, podendo ainda atuar na indução da apoptose celular⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾.

O gene da *IGFBP3* é altamente conservado entre as espécies e está presente, como uma cópia simples, no cromossomo 7p14-p12 (Figura 3). Estudos em gêmeos demonstram que cerca de 60% da variabilidade interindividual dos níveis séricos de IGFBP-3 sejam geneticamente determinados⁽⁸⁵⁾.

1.2.2.1 Polimorfismo -202 A/C da região promotora do *IGFBP3*

Em 2001, Deal *et al.*⁽⁸⁶⁾ identificaram uma série de polimorfismos na região promotora do *IGFBP3*. Entre estes, o mais relevante (rs2854744) constitui na troca de citosina por adenosina na posição -202 pb antes do sítio de início da transcrição, próximo a elementos que presumivelmente controlam a atividade promotora basal do gene (Figura 3). Demonstrou-se que a variação genotípica nesse locus estava altamente relacionada às concentrações séricas de IGFBP-3 em 478 adultos normais do gênero masculino, e as concentrações médias eram maiores nos indivíduos homozigotos para o alelo A e declinavam significativamente na presença de uma ou duas cópias do alelo C. Além disso, esses mesmos autores evidenciaram, por meio de estudos *in vitro* com duas linhagens celulares diferentes, que a atividade transcricional de sequências apresentando o alelo A era cerca de 50% superior à do alelo C, de forma coerente com os achados clínico-laboratoriais⁽⁸⁶⁾. A influência desse mesmo polimorfismo sobre as concentrações séricas de IGFBP-3 em adultos foi confirmada por outros estudos⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾. Nosso grupo identificou o efeito desse polimorfismo no tratamento com rhGH em uma coorte de 71 pré-púberes com DGH. Os pacientes homozigotos para o alelo A no locus -202 da região promotora do *IGFBP3* apresentaram velocidades de crescimento e concentrações séricas de IGFBP-3 superiores às de indivíduos homozigotos para o alelo C durante o tratamento com rhGH. A influência positiva do alelo A foi também observada em crianças PIG tratadas com rhGH⁽⁶⁰⁾.

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura do gene *IGFBP-3* e do polimorfismo -202 A/C *IGFBP-3*.

1.2.3 Gene do Fator de Crescimento Insulina Símile-1 (*IGF1*)

O IGF-1 é o principal peptídeo mediador das ações do GH e desempenha um importante papel estimulatório sobre o crescimento, além de exercer ações metabólicas insulina-símile. Embora 75% do IGF-1 circulante seja derivado do fígado, estudos demonstram que tanto o IGF-1 derivado do fígado como o produzido localmente podem estimular o crescimento longitudinal⁽⁹⁰⁾. O IGF-1 estimula a síntese de DNA e a proliferação celular atuando como regulador fundamental da progressão celular, por meio das diversas fases do ciclo, e constitui-se em potente estímulo mitogênico para grande número de tipos celulares. Além de promover a proliferação celular, o IGF-1 pode inibir a apoptose, induzir a diferenciação celular e a síntese de proteínas específicas. Há evidências de que as concentrações séricas de IGF-1 sofram importante determinação genética, já que estudos em gêmeos

demonstraram concordância de até 91% entre os monozigóticos, e entre os dizigóticos a concordância não ultrapassa os 40%^(85, 91).

O gene do *IGF-1* está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q 22-23). É constituído por 6 éxons e mede 85 Kb; e codifica duas proteínas, produtos de *splice* alternativo nos éxons 5 e 6: a IGF-1A e a IGF-1B. Especula-se que a isoforma IGF-1B exerça seu papel principal na vida intrauterina, e a mesma função é exercida, na vida pós-natal, pelo IGF-1A⁽⁹²⁾.

1.2.3.1 Microssatélite (CA)_n da região promotora do *IGF1*

Desde 1998, um polimorfismo situado na região promotora desse gene tem sido implicado na regulação genética das concentrações séricas da proteína⁽⁹³⁾. Trata-se de um microssatélite representado por uma sequência de tamanho variável de repetições citosina-adenosina (CA), altamente polimórfico, localizado cerca de 1 Kb, antes do sítio de início da transcrição (D12S0043i; UniSTS 49688) (Figura 4).

O número de repetições CA varia entre 10 e 24. Conforme o número de repetições e o tamanho da sequência amplificada correspondente, foram identificados dez diferentes alelos (182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200 pb)^(93, 94). Estudos em populações caucasianas demonstraram que cerca de 60% dos indivíduos são portadores de, pelo menos, um alelo de 19 repetições CA (correspondente a fragmentos de 192 pb após amplificação padronizada), sugerindo que este é o alelo selvagem^(93, 95).

Inúmeros estudos avaliaram a influência desse microssatélite sobre as concentrações séricas de IGF-1 em adultos^(93, 96, 97) e sobre diversas variáveis

relacionadas às ações desse hormônio, tais como: comprimento e peso ao nascer^(97, 98), estatura adulta^(95, 99), densidade mineral óssea⁽¹⁰⁰⁾, distribuição de gordura corporal⁽¹⁰¹⁾, risco de câncer^(102, 103), risco de diabetes⁽¹⁰⁴⁾ e risco de microalbuminúria em diabéticos tipo 1⁽¹⁰⁵⁾.

A influência desse polimorfismo no tratamento com rhGH foi demonstrada por nosso grupo em uma coorte de 84 crianças com DGH pré-púberes⁽⁶¹⁾. Os pacientes homozigotos para o alelo de 19 repetições CA na região promotora do *IGF1* apresentam velocidade de crescimento e altura final inferiores às dos indivíduos carreadores de, pelo menos, um alelo alternativo.

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura do gene *IGF-1* e do microssatélite (CA)_n na região promotora do *IGF1*.

2 OBJETIVOS

Correlacionar a presença de polimorfismos no gene do *GHR*, *IGF1* e *IGFBP3*, de forma isolada ou combinada, com a resposta terapêutica e as concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3, durante o tratamento com rhGH em pacientes com a síndrome de Turner.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. O consentimento por escrito foi obtido de todas as pacientes ou pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisa fossem iniciados. O protocolo de estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Instituição e aprovado (número de protocolo de pesquisa na CAPPesq: 847/06).

3.2 Casuística

Dados clínicos e laboratoriais de 244 pacientes com síndrome de Turner acompanhadas na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (n=184) e na Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (n=60) foram coletados e informatizados para análise. No intuito de se obter a maior homogeneidade possível da amostra, optou-se por incluir no estudo apenas as pacientes selecionadas que preenchessem os seguintes critérios:

3.2.1 Critérios de Inclusão

- Cariótipo com monossomia completa ou parcial do cromossomo X ;
- Uso regular e contínuo de rhGH por, pelo menos, 1 ano;
- Ausência de puberdade no primeiro ano de tratamento;
- Dados clínicos e laboratoriais disponíveis; e
- Ausência de doenças crônicas que pudessem interferir na resposta ao tratamento com rhGH.

Das 244 pacientes avaliadas, finalmente, foram selecionadas 94 pacientes provenientes do HC-FMUSP e 18 da USP-RP (total de 112). Todas foram avaliadas quanto à resposta ao tratamento com rhGH em curto prazo, refletida pela velocidade de crescimento (VC) ao final do primeiro ano de tratamento. Entre estas, 65 atingiram altura adulta (definida por $VC < 1$ cm/ano), após um período médio $5 \pm 2,5$ anos de tratamento com rhGH sendo, portanto, selecionadas para avaliação da resposta em longo prazo (Z altura final com e sem ajuste para o Z da altura-alvo).

3.2.2 Controles

Para avaliar apropriadamente o efeito farmacogenético dos polimorfismos estudados, foram selecionados 74 controles, pacientes com síndrome de Turner acompanhadas no HC-FMUSP que não usaram hormônio de crescimento e que haviam atingido altura final.

3.3 Protocolo de acompanhamento clínico

O diagnóstico da síndrome de Turner foi baseado em dados clínicos e confirmado por cariótipo. Todas as pacientes selecionadas para o estudo receberam rhGH administrado por via subcutânea em uma dose diária média de 48 µg/kg/d (0,14 UI/kg/d), que era ajustada de acordo com mudanças no peso a cada consulta. Todas as pacientes foram avaliadas antes do tratamento e a cada 4 meses durante a terapia de reposição. No primeiro ano de tratamento, a velocidade de crescimento foi determinada, após um período de observação de, pelo menos, 12 meses. Entre as que completaram o crescimento, a altura adulta foi determinada, em média, 3 anos após a suspensão do rhGH.

As avaliações quadrimestrais foram feitas sempre pela manhã e incluíam medidas de peso (medido por balança digital) e altura de pé (determinada com um estadiômetro, por meio da média de três medidas seguidas). A altura e o índice de massa corpórea foram expressos na forma de escores de desvio-padrão (Z)⁽¹⁰⁶⁾. A altura-alvo foi calculada $[(\text{altura do pai} - 13 + \text{altura da mãe}) / 2]$ e também expressa na forma de escore-Z. Raios X de mão e punho esquerdo foram obtidos para determinação da idade óssea e avaliados pelo método de Greulich e Pyle⁽¹⁰⁷⁾. As concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3 foram medidas antes e durante o tratamento.

3.4 Dosagens hormonais

As concentrações de IGF-1 foram obtidas no início do tratamento e ao final do primeiro ano de tratamento em 80% das pacientes. As medidas foram obtidas por meio de radioimunoensaio após extração com etanol (Diagnostic Systems Laboratories - DSL, Webster, TX) em 73% das pacientes e por quimioluminescência (IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA) em 23% das pacientes.

As concentrações de IGFBP-3 foram obtidas no início do tratamento e ao final do primeiro ano de tratamento em 60% das pacientes. As medidas foram obtidas por meio de radioimunoensaio (Diagnostic Systems Laboratories - DSL, Webster, TX) em 66% dos pacientes e por quimioluminescência (IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA) em 34% das pacientes. Os valores de IGF-1 e IGFBP-3 foram expressos como Z-escore em relação aos padrões de normalidade para gênero e idade fornecidos pelos respectivos kits.

3.5 Coleta de dados para análises multivariadas

Todos os registros médicos das pacientes avaliadas foram verificados para a coleta de dados referentes a peso e comprimento ao nascimento; cariótipo; altura dos pais; idade cronológica, idade óssea, altura, peso e estágio puberal ao início e ao final do primeiro ano de tratamento; data de início da puberdade; proporção entre puberdade induzida e espontânea; doses de rhGH utilizadas ao longo do tratamento; duração do tratamento; altura final, IGF-1 e IGFBP-3 antes e durante o tratamento.

3.6 Estudos Moleculares

3.6.1 Preparação das amostras- extração de DNA genômico *Salting- out*

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico das pacientes arroladas na pesquisa. Dez mililitros de sangue venoso foram colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se um volume de solução de lise (NH_4Cl a 114 mM, NH_4HCO_3 a 1 mM) duas vezes maior que o volume de sangue, incubado a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 4.000 g (Sorvall, RT7, Germany), sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido uma vez. O botão de células brancas foi suspenso em nove ml de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 180 μL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 μL de proteinase K na concentração de 10 mg/ml (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), e incubado a 37°C por 18 horas. Após esse período, 3,6 ml de solução saturada de NaCl a 6 M foi adicionada, seguida de agitação do conjunto, vigorosamente, durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 4.000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado, acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, em seguida, lavado em etanol a 70% durante 5 minutos, repetindo-se a operação por mais três vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto, seguido de secagem por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após o

procedimento, o DNA foi ressuspenso em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

3.6.2 Metodologias de genotipagem

3.6.2.1 Presença ou ausência do éxon3 do *GHR*

Para a genotipagem dos indivíduos quanto à distribuição dos alelos *GHRfl* e *GHRd3*, utilizou-se a metodologia descrita por Pantel *et al.*⁽⁶⁸⁾, que consiste na realização de uma reação de polimerização em cadeia (PCR) *multiplex* – envolvendo três *primers*, um *primer sense* (**G1**: 5'-TGTGCTGGTCTGTTGGTCTG-3') e dois *primers antisense* (**G2**: 5'-AGTCGTTCCCTGGGACAGAGA-3' e **G3**: 5'-CCTGGATTAACACTTTGCAGACTC-3') que flanqueiam a região do éxon3. O seguinte programa de amplificação foi usado: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minutos e, no último ciclo, 7 minutos a 72°C para extensão final. As amostras amplificadas foram avaliadas em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio e observadas em transiluminador ultravioleta. Os *primers* G1 e G2 são específicos para amplificação do fragmento que apresenta deleção do éxon 3 e geram um produto de PCR com 532pb (*GHRd3*) e os *primers* G1 e G3 apenas amplificam os alelos que possuem o éxon 3, resultando em um produto de PCR com 935pb (*GHRfl*) (Figura 5).

Figura 5 - (A) Localização dos *primers* e produtos de amplificação resultantes da PCR multiplex para genotipagem da presença ou ausência do éxon3 do GHR. (B) gel de agarose com o padrão das bandas para cada um dos genótipos do GHR-éxon 3 após eletroforese.

3.6.2.2 Polimorfismo -202 A/C da região promotora do *IGFBP3*

O estudo do polimorfismo (*rs 2854744*) -202 A/C da região promotora do *IGFBP3* foi realizado por duas metodologias.

A primeira, foi realizada, conforme protocolo descrito por Deal *et al.*⁽⁸⁶⁾: O DNA genômico foi amplificado por meio de PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos (*IGFBP3* sense: 5'-GAGTTGGCCAGGAGTGACTG-3'; *IGFBP3* antisense: 5' GTGGAATCCAGGCAGGAAG-3'). Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo. Para um volume final de 25 µL, cada reação continha 5 ng de DNA genômico, 0,5 µmol/L de cada *primer*, 0,2 mmol/L de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,5 U de Hotstar Taq DNA polimerase (Qiagen, Valencia CA), 1 x tampão de PCR Qiagen, 2,5 µL do tampão da enzima. A reação de PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 15

minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; além de um último ciclo de 7 minutos a 72°C para extensão final. Dez microlitros do produto de PCR foram digeridos com 5 U da enzima de restrição *FspI* (NEB, Beverly, MA), seguindo as instruções do fabricante em um volume de reação final de 20 µL. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio e, posteriormente, visualizados sob luz ultravioleta. Na presença do alelo A na posição -202, não ocorre digestão pela enzima *FspI*, sendo visualizada apenas uma banda de 376 bp. Na presença do alelo C, são originados fragmentos de 260 e 116 pb. Cada um dos genótipos identificados por digestão enzimática foi verificado por sequenciamento automático usando BigDye Terminator v3.1 kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). (Figura 6)

Figura 6 - Foto de gel de agarose contendo produtos de digestão enzimática da genotipagem do SNP rs2854744.

A segunda metodologia empregada para a análise desse polimorfismo foi o PCR em tempo real utilizando o ensaio TaqMan[®] (*Applied Biosystems*). Cada ensaio é composto por um par de *primers* e duas sondas alelo-específicas. Cada sonda

possui um fluorocromo em sua extremidade 5' (VIC[®] ou FAM[™]), um composto capaz de inibir a emissão de fluorescência em sua extremidade 3' (*quencher*) e MGB (*minor groove binding*) que confere uma maior especificidade na hibridização alelo específica. Durante a reação de PCR, a sonda liga-se ao DNA e, pela atividade de 5' nuclease da taq polimerase, ocorre a remoção do *quencher*. Com isso, a fluorescência associada à sonda é liberada, resultando na emissão de luz no comprimento da onda específica de cada fluorocromo. Neste estudo, utilizou-se o equipamento StepOne Plus na realização da PCR em tempo real para discriminação alélica (Figura 7). O ensaio empregado para a análise do polimorfismo -202 A/C *IGFBP-3* (rs 2854744) foi o TaqMan[®] SNP Genotyping Assay C___1842665_10 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Para cada reação de PCR, foram usados 0,75 µL de DNA (10 ng/µL), 2,5 µL de *TaqMan Genotyping Master Mix*, 0,16 µL do ensaio (20x diluído em TE) e 3,0 µL de água milliQ. As condições de ciclagem térmica foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 92°C por 15 segundos e 62°C por 60 segundos.

Figura 7 - Genotipagem por PCR em tempo real utilizando o ensaio TaqMan[®] do SNP rs2854744.

3.6.2.3 Microssatélite (CA)_n na região promotora do *IGF1*

O estudo da repetição (CA)_n da região promotora do gene do IGF-1 foi realizado, conforme protocolo descrito por Vaessen *et al.*⁽⁷⁶⁾: Um fragmento da região flanqueadora do polimorfismo foi amplificado por meio de PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos, sendo o *primer* reverso marcado com o fluorocromo FAM (sense: 5' ACCACTCTGGGAGAAGGGTA 3' e antisense: 5' GCTAGCCAGCTGGTGTATT 3'). Todas as amplificações foram realizadas utilizando-se um termociclador automático *GeneAmp PCR Instrument System 9600* (Prkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT, USA) e acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto o DNA) para um volume final de 25 µL, contendo 50 ng

de DNA genômico, 15 pmols de cada *primer*, 240 uM de dNTP, 1,5 nM de MgCl₂, 2U de Taq polimerase (GoTaq promega®) e 5 µL do tampão da enzima. A reação de PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; um último ciclo, 10 minutos a 72°C para extensão final. Em seguida, 2 µL do produto de amplificação foram misturados com 24 µL de formamida deionizada e 1µL do padrão de peso molecular Rox 2500 (Applied Biosystem) ou Rox 500 (Applied System), submetidos à desnaturação a 94°C por 4 minutos e resfriados em gelo por 5 minutos. Finalmente, estas amostras foram submetidas à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) e os fragmentos analisados pelo *software* de análise de fragmentos *GeneScan*. Por meio do sequenciamento de amostras aleatórias, certificou-se que os fragmentos correspondentes ao alelo de 192 pb observado no *Gene Scan* correspondiam às sequências de 19 repetições CA, tal como descrito em estudos anteriores^(68,75,76)(Figura 8).

Figura 8 - Análise dos fragmentos do microssatélite (CA)_n do *IGF-1* por *Gene Scan* de um paciente heterozigoto para os alelos 19CA/18CA, o fragmento de 192 pb corresponde ao alelo com 19 repetições CA enquanto o fragmento de 190 pb corresponde ao alelo com 18 repetições.

3.7 Análises Estatísticas

A resposta ao tratamento com rhGH em curto prazo foi avaliada pela velocidade de crescimento (VC) no primeiro ano de tratamento; e a resposta em longo prazo foi avaliada pelo escore de DP (Z) da altura final com e sem a correção pela altura-alvo. Como variáveis-alvo secundárias, foram avaliadas as concentrações de IGF-1 e IGFBP-3 durante o tratamento com rhGH; ganho de Z de altura ao final do primeiro ano de tratamento e total. No intuito de avaliar se as variações genéticas apresentavam significância prognóstica independente, prioritariamente foram realizadas análises de regressão linear múltipla, ajustando para os demais fatores moduladores da capacidade de resposta ao tratamento com rhGH. Inicialmente, foram feitas análises de regressão linear simples com o objetivo de identificar quais

as variáveis clínicas que se correlacionavam a cada parâmetro de resposta de crescimento em nossa casuística. As variáveis testadas foram as que classicamente correlacionam-se com a capacidade de resposta ao tratamento com rhGH em síndrome de Turner: peso e comprimento ao nascimento; Z da altura-alvo, Z de altura inicial, Z do IMC inicial; idade óssea e cronológica iniciais, dose média de rhGH utilizada; velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento com rhGH; idade cronológica ao início da puberdade e tempo de tratamento antes do início puberal e duração do tratamento.

A seguir, as variáveis que apresentavam $p < 0,1$, nas análises de regressão linear simples, foram selecionadas para as análises de regressão linear múltipla. Nessas análises, os genótipos foram representados sob a forma de coeficientes. Para os polimorfismos cujo modelo de herança genética já havia sido previamente estabelecido na literatura, manteve-se o modelo classicamente descrito. Para os polimorfismos cujo modelo não havia sido previamente descrito, testou-se a influência sob as diferentes formas de herança possíveis: recessivo, codominante e dominante⁽⁹⁵⁾. As pacientes foram ainda agrupadas conforme o genótipo para comparações diretas com relação a parâmetros clínicos e laboratoriais. Variáveis qualitativas foram listadas como frequências e percentagens, e as variáveis quantitativas foram expressas como média $\pm$ desvio-padrão (DP). Para comparações, conforme os modelos recessivos ou dominantes, em que dois dos três genótipos possíveis são agrupados, foram usados *test-t* ou *Mann-Whitney Rank Sum Test*, de acordo com a presença de distribuição paramétrica ou não, respectivamente. Para comparações, conforme o modelo codominante, em que os três grupos genotípicos foram avaliados separadamente, foi utilizado *One Way Analysis of Variance*

(ANOVA) ou *Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks*, conforme apropriado. Os dados nominais foram avaliados pelo teste Qui-quadrado, ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. Foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com SigmaStat para Windows (versão 3.5, SPSS, Inc., San Rafael, CA).

Para avaliar apropriadamente a influência do *GHR-d3* na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento com rhGH em pacientes com a síndrome de Turner, realizou-se uma metanálise conforme as diretrizes do Prisma ⁽¹⁰⁸⁾ utilizando todos os trabalhos disponíveis na literatura, acrescidos de nossos resultados, que descrevessem o impacto do *GHR-d3* na resposta em curto prazo ao tratamento com rhGH em pacientes com a síndrome de Turner.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da casuística

Cento e doze pacientes foram avaliadas, metade das pacientes com a síndrome de Turner tinha cariótipo 45,X. Ao início do tratamento, as pacientes apresentaram idade cronológica (IC) de $11,2 \pm 3,8$ anos, idade óssea de $9,0 \pm 3,1$ anos e baixa estatura acentuada (Z de altura inicial = $-3,2 \pm 1,1$). Todas as pacientes estudadas, permaneceram pré-púberes no primeiro ano de tratamento com rhGH. O início puberal ocorreu aos $14,3 \pm 2,4$ anos, após $3,6 \pm 2,2$ anos de tratamento com rhGH, sendo espontânea em 20 (17,8%) e induzida em 92 (82,2%) pacientes. A indução puberal foi realizada por meio da administração oral de estrógenos conjugados na dose inicial de 0,07-0,15 mg/dia por 12 a 24 meses, aumentando-se progressivamente para 0,3 mg/dia por 6 a 12 meses até a dose de manutenção de 0,625 mg/dia. O acetato de medroxiprogesterona foi introduzido quando as mamas encontravam-se em estágio puberal IV, na dose de 5-10mg/dia dos primeiro ao décimo primeiro dias de cada mês. Sessenta e cinco pacientes atingiram altura adulta após $5,1 \pm 2,5$ anos de tratamento com rhGH, cuja dose diária média foi de 48 $\mu\text{g/kg/d}$ (0,14 UI/kg/d). A altura adulta média atingida, após uso de rhGH, foi de $151,0 \pm 5,1$ cm, equivalente a escore Z de altura de $-2,0 \pm 1,0$ e a escore Z de altura adulta corrigida pelo Z da altura alvo de $-1,1 \pm 1,2$. O ganho de escore- Z de altura médio ao final da terapia com rhGH foi de $1,0 \pm 1,5$.

Tabela 2 - Características clínicas das 112 pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.

Cariótipo 45,X (%)	50%
Z da altura alvo	$0,8 \pm 0,9$
Idade cronológica no início do rhGH (anos)	$11,2 \pm 3,8$
Idade óssea no início do rhGH (anos)	$9,0 \pm 3,1$
Z altura no início do rhGH	$-3,2 \pm 1,1$
Dose rhGH (UI/kg/dia)	$0,14 \pm 0,01$
Tempo de uso de rhGH antes do início da puberdade (anos)	$3,6 \pm 2,2$
Idade cronológica no início da puberdade	$14,3 \pm 2,4$
Proporção entre puberdade espontânea e induzida	20 : 92
Duração do tratamento com rhGH (anos)	$5,1 \pm 2,5$
Z de altura final	$-2,0 \pm 1,0$
Z de altura final corrigido pelo Z da altura-alvo	$-1,1 \pm 1,2$
Ganho de Z de altura	$1,0 \pm 1,5$

4.2 Distribuição genotípica

As frequências genotípicas dos polimorfismos estudados em nossa casuística encontram-se representados na Figura 9. Dez por cento das amostras foram selecionadas randomicamente e submetidas à confirmação genotípica. Todos os genótipos referentes ao GHR-éxon 3 e (CA)_n IGF1 foram confirmados. Mas, 4,5% das amostras genotipadas por enzima de restrição para o polimorfismo -202 A/C do *IGFBP3* apresentaram resultados discordantes (AC vs. AA), motivando que toda a casuística fosse novamente genotipada por PCR em tempo real, utilizando o ensaio TaqMan®. Por este ensaio, houve 100% de concordância nas amostras randomicamente selecionadas para confirmação por sequenciamento direto.

Todos os polimorfismos apresentaram distribuição genotípica compatível com o equilíbrio de *Hardy Weinberg*, fornecendo subsídios para posteriores análises estatísticas.

Figura 9 - Distribuição genotípica dos polimorfismos estudados.

4.3 Análises das variáveis clínicas que influenciam a resposta ao tratamento com rhGH

Dentre os parâmetros não genéticos envolvidos na resposta ao tratamento com rhGH em trabalhos prévios^(23, 27-30), os que demonstraram influência sobre a resposta ao tratamento com rhGH na presente casuística foram:

- Para a velocidade de crescimento no primeiro ano de tratamento com rhGH (VC primeiro ano);
 - Idade cronológica ao início do tratamento com rhGH ($p < 0,001$) e
 - Índice de massa corpórea (IMC) ao início do tratamento com rhGH ($p = 0,018$);
- Para o Z de altura adulta com e sem ajuste para o Z da altura alvo;
 - Z de altura ao início do tratamento com rhGH ($p < 0,001$) e
 - Idade cronológica ao início da puberdade ($p < 0,001$).

Sendo assim, todas as análises de regressão linear múltipla envolvendo os respectivos genótipos foram ajustadas aos parâmetros clínicos acima indicados.

4.4 Análises das variáveis genéticas que influenciam a resposta ao tratamento com rhGH

4.4.1 Microssatélite (CA)n do *IGF1*

O microssatélite (CA)n na região promotora do *IGF1* não demonstrou influência significativa sobre nenhum dos parâmetros analisados, tanto pela comparação direta entre os grupos genotípicos como por análises de regressão linear simples e múltipla nos modelos codominante, recessivo e dominante.

As médias das velocidades de crescimento ao final do primeiro ano de tratamento com rhGH conforme genótipo do microssatélite (CA)n na região promotora do *IGF1* foram: não19/não19 $7,1 \pm 1,8$ cm/ano; 19/não19 $7,0 \pm 2,1$ cm/ano e 19/19 $6,8 \pm 1,9$ cm/ano, $p > 0,05$ (Figura 10).

Figura 10 - Influência do genótipo do microssatélite (CA)n *IGF1* na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento de pacientes com a síndrome de Turner tratadas com rhGH.

Em relação ao Z de altura adulta, as médias encontradas quanto ao genótipo do microssatélite (CA)_n na região promotora do *IGF1* foram: não19/não19 $-1,6 \pm 1,0$; 19/não19 $-2,2 \pm 1,1$ e 19/19 $-2,0 \pm 0,8$, $p > 0,05$ (Figura 11).

Não foi observada influência significativa desse genótipo sobre as concentrações séricas de IGF-1, tanto antes como durante o tratamento com rhGH.

Figura 11 - Influência do genótipo do microssatélite (CA)_n *IGF1* na altura final de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.

4.4.2 Presença ou ausência do éxon 3 do *GHR*

Pacientes carreadoras de, pelo menos, um alelo *GHR-d3* apresentaram velocidade de crescimento, ao final do primeiro ano de tratamento, 1,4 cm/ano maior, em média, que as pacientes homozigotas para o alelo *GHR-fl* (IC95% 0,7 - 2,0 cm/ano, $p < 0,001$) (Figura 12 e Tabela 3).

Figura 12 - Influência do genótipo do *GHR* éxon 3 na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento de pacientes com a síndrome de Turner tratadas com rhGH.

Figura 13 - Metanálise: Impacto do polimorfismo do *GHR* éxon 3-deletado na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento com rhGH de pacientes com a síndrome de Turner. Resultados positivos indicam uma resposta ao tratamento favorável aos carreadores de uma ou duas cópias do alelo *GHR-d3*.

O resultado da metanálise sobre o impacto do alelo com deleção do éxon 3 do *GHR* na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento com rhGH confirmou um efeito positivo pequeno, mas significativo, do alelo *GHR-d3* na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento com rhGH. As pacientes com síndrome de Turner carreadoras de, pelo menos, um alelo *GHR-d3* apresentaram velocidade de crescimento 0,4 cm/ano maior que aquelas homozigotas para o alelo sem deleção do éxon 3 (*GHR-fl*) (Figura 13).

Em relação à altura adulta, pacientes com, pelo menos, um alelo *GHR-d3* apresentam Z de altura 1,1 acima (IC95% 0,8 - 1,4, $p < 0,001$) que as homozigotas para o alelo *GHR-fl*, após tratamento com rhGH (Figura 14 e Tabela 3).

Entre os controles (pacientes com síndrome de Turner não tratadas), não se observou influência do genótipo do polimorfismo do *GHR* éxon 3 em relação à altura basal, assim como na altura adulta (Tabela 4).

Figura 14 - Influência do genótipo do *GHR* éxon 3 na altura final (cm) de pacientes com a síndrome de Turner tratadas com rhGH.

Tabela 3 - Características clínicas e laboratoriais de 112 pacientes com a síndrome de Turner tratadas com rhGH conforme genótipo do *GHR*-éxon 3.

	Genótipo do <i>GHR</i> -éxon3				<i>P</i>	
	d3/d3	fl/d3	fl/fl	d3/*	d3/d3 vs. fl/d3 vs. fl/fl ^a	d3/* vs. fl/fl ^b
Nº de pacientes para resposta em curto prazo	10	42	60	52	-	-
Cariótipo 45,X	40%	54%	50%	50%	-	-
Z da altura alvo	-0,5 ± 0,8	-0,6 ± 0,8	-0,9 ± 0,8	-0,6 ± 0,8	ns	ns
IC ao início do tratamento com rhGH	12 ± 3,2	11 ± 3,6	12 ± 3,9	11 ± 3,5	ns	ns
IO ao início do tratamento com rhGH	10 ± 2,7	9 ± 3,1	9 ± 3,1	9 ± 3,1	ns	ns
Z de altura ao início do tratamento com rhGH	-3,0 ± 0,7	-3,0 ± 1,0	-3,5 ± 0,8	-3,0 ± 0,9	p=0,012 ^c	p=0,002
Z do IMC ao início do tratamento com rhGH	0,8 ± 0,6	0,5 ± 1,2	0,6 ± 1,1	0,5 ± 1,1	ns	ns
Dose media de rhGH (µg/kg.d)	48	48	48	48	ns	ns
VC do primeiro ano de tratamento com rhGH (cm/a)	7,8 ± 1,0	7,7 ± 1,7	6,3 ± 2,0	7,7 ± 1,6	p<0,001 ^d	p<0,001
Z do IGF-1 antes da terapia com rhGH	-0,5 ± 1,4	-0,1 ± 1,6	-0,6 ± 1,2	-0,1 ± 1,6	ns	ns
Z do IGF-1 após a terapia com rhGH	1,5 ± 1,5	1,9 ± 1,4	1,4 ± 1,7	1,8 ± 2,0	ns	ns
Z da IGFBP-3 antes da terapia com rhGH	-0,4 ± 1,0	0,2 ± 1,5	-0,2 ± 1,1	0,2 ± 1,4	ns	ns
Z da IGFBP-3 após a terapia com rhGH	0,7 ± 1,0	1,0 ± 1,5	0,6 ± 1,0	1,0 ± 1,4	ns	ns
Nº de pacientes para resposta em longo prazo	9	22	34	31	-	ns
Proporção entre puberdades espontânea e induzida	1 : 8	5 : 17	4 : 30	6 : 25	ns	ns
IC ao início da puberdade (anos)	14 ± 2,4	14 ± 1,7	15 ± 2,7	14 ± 1,9	ns	ns
Tempo de tratamento com rhGH antes da puberdade (anos)	3,0 ± 2,0	4,0 ± 2,4	4,0 ± 2,8	4,0 ± 2,6	ns	ns
Duração do tratamento com rhGH (anos)	4,0 ± 0,9	5,1 ± 2,6	5,0 ± 2,4	4,8 ± 2,4	ns	ns
Z da altura adulta	-1,2 ± 0,9	-1,4 ± 0,6	-2,5 ± 1,0	-1,4 ± 0,7	p<0,001 ^e	p<0,001
Z de altura adulta – Z da altura-alvo	-0,7 ± 1,3	-0,8 ± 0,7	-1,4 ± 1,2	-0,7 ± 0,9	ns	p=0,01
Z de ganho de altura	1,6 ± 1,2	1,1 ± 1,2	0,7 ± 1,5	1,2 ± 1,2	ns	ns

d3/* - genótipos combinados fl/d3 e d3/d3-*GHR*; ns – não significante; ^a One Way Anova; ^b *t*-test.

^c Tukey test: d3/d3 vs. fl/fl = ns; d3/d3 vs. fl/d3 = ns; fl/d3 vs. fl/fl = ns.

^d Tukey test: d3/d3 vs. fl/fl = p<0,05; d3/d3 vs. fl/d3 = ns; fl/d3 vs. fl/fl = p<0,05.

^e Tukey test: d3/d3 vs. fl/fl = p<0,05; d3/d3 vs. fl/d3 = ns; fl/d3 vs. fl/fl = p<0,05.

Tabela 4 - Características clínicas dos 74 controles (pacientes com a síndrome de Turner não tratadas com rhGH) conforme genótipo do *GHR*-éxon3.

	Genótipo do <i>GHR</i> -éxon3				<i>P</i>	
	d3/d3	fl/d3	fl/fl	d3/*	d3/d3 vs. fl/d3 vs. fl/fl ^a	d3/* vs. fl/fl ^b
Nº de pacientes	7	28	39	35	-	-
Cariótipo 45,X	42%	45%	46%	45%	-	-
Z da altura alvo	-0,6 ± 1,0	-0,6 ± 0,8	-0,8 ± 0,8	-0,6 ± 0,9	ns	ns
IC ao início do tratamento	12,5 ± 3,6	12,6 ± 3,2	12,8 ± 3,1	12,2 ± 3,5	ns	ns
IO ao início do tratamento	11 ± 2,7	11 ± 3,1	11 ± 3,1	11 ± 3,0	ns	ns
Z de altura ao início do tratamento	-3,1 ± 0,7	-3,2 ± 1,0	-3,4 ± 1,0	-3,1 ± 0,9	ns	ns
Z do IMC ao início do tratamento	0,8 ± 0,6	0,5 ± 1,2	0,6 ± 1,1	0,5 ± 1,1	ns	ns
Proporção entre puberdades espontânea e induzida	0 : 7	1 : 27	3 : 36	6 : 25	ns	ns
IC ao início da puberdade (anos)	14,5 ± 2,1	14,7 ± 1,8	15,2 ± 2,5	14, ± 1,9	ns	ns
Z da altura adulta	-2,7 ± 1,0	-2,8 ± 0,9	-3,0 ± 1,0	-2,7 ± 0,9	ns	ns

4.4.3 Polimorfismo -202 A/C do *IGFBP3*

Pacientes com, pelo menos, um alelo -202 A-*IGFBP3* apresentaram maiores concentrações de IGFBP3 ao início e durante o tratamento com rhGH (Figura 15 e Tabela 5). Os controles carreadores do alelo -202 A-*IGFBP3* também apresentaram maiores concentrações basais de IGFBP3 (Tabela 6).

Embora as pacientes com a síndrome de Turner que usaram rhGH apresentassem discreta diferença de altura ao início do tratamento, sendo mais altas as carreadoras de, pelo menos, um alelo -202 A-*IGFBP3* (Tabela 5), nos controles não tratados, não se observou tal diferença (Tabela 6).

Figura 15 - Influência do genótipo -202 A/C *IGFBP3* nas concentrações de IGFBP3 pré e pós-tratamento de pacientes com a síndrome de Turner tratadas com rhGH.

Pacientes carreadoras de, pelo menos, um alelo -202 A-*IGFBP3* apresentaram velocidade de crescimento, ao final do primeiro ano de tratamento, 0,8 cm/ano maior, em média, que as pacientes homozigotas para o alelo -202 C-*IGFBP3* (IC95% 0,05 - 1,6 cm/ano, $p = 0,037$) (Figura 16 e Tabela 5).

Figura 16 - Influência do genótipo do *GHR* éxon 3 na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento de pacientes com a síndrome de Turner tratadas com rhGH.

Em relação à altura adulta, pacientes com, pelo menos, um alelo -202 A-*IGFBP3* são 1,0 DP mais altas (IC95% 0,6 - 1,4 DP, $p < 0,001$), em média, que as homozigotas para o alelo -202 C-*IGFBP3*, após tratamento com rhGH (Figura 17 e Tabela 5).

Tabela 5 - Características clínicas e laboratoriais de 112 pacientes com a síndrome de Turner tratadas com rhGH conforme genótipo -202 A/C *IGFBP3*.

	Genótipo -202 A/C <i>IGFBP3</i>				<i>P</i>	
	A/A	A/C	C/C	A/*	A/A vs. A/C vs. C/C ^a	A/* vs. C/C ^b
Nº de pacientes para resposta em curto prazo	19	54	39	73	-	-
Cariótipo 45,X	57%	48%	56%	51%	-	-
Z da altura alvo	-0,5 ± 0,6	-0,9 ± 0,8	-0,8 ± 0,9	-0,8 ± 0,8	ns	ns
IC ao início do tratamento com rhGH	11 ± 3,5	11 ± 3,8	11 ± 3,9	11 ± 3,7	ns	ns
IO ao início do tratamento com rhGH	10 ± 2,3	9 ± 3,2	9 ± 3,2	9 ± 3,0	ns	ns
Z de altura ao início do tratamento com rhGH	-3,0 ± 0,9	-3,0 ± 1,1	-3,5 ± 1,3	-3,0 ± 1,1	ns	p=0.034
Z do IMC ao início do tratamento com rhGH	0,4 ± 0,8	0,6 ± 1,1	0,8 ± 1,1	0,6 ± 1,1	ns	ns
Dose média de rhGH (µg/kg.d)	48	48	48	48	ns	ns
VC do primeiro ano de tratamento com rhGH (cm/a)	7,4 ± 1,6	7,1 ± 1,9	6,4 ± 2,1	7,2 ± 1,8	ns	p=0.037
Z do IGF-1 antes da terapia com rhGH	-0,3 ± 1,1	-0,3 ± 1,5	-0,5 ± 1,5	-0,3 ± 1,4	ns	ns
Z do IGF-1 após a terapia com rhGH	1,3 ± 1,0	1,9 ± 2	1,2 ± 2	1,8 ± 1,8	ns	ns
Z da IGFBP-3 antes da terapia com rhGH	0,2 ± 1,1	0,2 ± 1,5	-0,8 ± 1,0	0,2 ± 1,3	p<0.001 ^c	p<0.001
Z da IGFBP-3 após a terapia com rhGH	1,2 ± 0,5	0,9 ± 1,4	0,4 ± 1,0	0,9 ± 1,3	p<0.030 ^d	p=0.039
Nº de pacientes para resposta em longo prazo	10	35	20	45	-	-
Proporção entre puberdades espontânea e induzida	2 : 8	7 : 28	1 : 19	9 : 36	ns	ns
IC ao início da puberdade (anos)	15,0 ± 1,6	14,0 ± 2,3	15,0 ± 2,7	14,2 ± 2,2	ns	ns
Tempo de tratamento com rhGH antes da puberdade (anos)	3,1 ± 2,0	4,0 ± 2,7	3,3 ± 2,0	4,0 ± 2,7	ns	ns
Duração do tratamento com rhGH (anos)	5,0 ± 2,3	5,0 ± 2,7	5,0 ± 2,4	5,0 ± 2,6	ns	ns
Z da altura adulta	-1,0 ± 0,7	-1,9 ± 1,0	-2,7 ± 0,8	-1,7 ± 1,0	p<0.001 ^e	p<0.001
Z de altura adulta – Z da altura-alvo	-0,5 ± 0,7	-1,0 ± 1,0	-1,6 ± 1,4	-0,9 ± 1,0	p=0.031 ^f	p=0.025
Z de ganho de altura	1,7 ± 0,8	1,0 ± 1,2	0,5 ± 1,6	1,2 ± 1,1	ns	p=0.045

A/* - genótipos combinados A/A e A/C-202-*IGFBP3*; ns – não significante; ^aOne Way Anova; ^bt-test.

^cTukey test: A/A vs. C/C = p<0.05; A/A vs. A/C = ns; A/C vs. C/C = p<0.05.

^dTukey test: A/A vs. C/C = p<0.05; A/A vs. A/C = ns; A/C vs. C/C = ns

^eTukey test: A/A vs. C/C = p<0.05; A/A vs. A/C = p<0.05; A/C vs. C/C = p<0.05.

^fTukey test: A/A vs. C/C = p<0.05; A/A vs. A/C = ns; A/C vs. C/C = ns.

Tabela 6 - Características clínicas dos 74 controles (pacientes com a síndrome de Turner não tratadas com rhGH) conforme genótipo do -202 A/C *IGFBP3*.

	Genótipo -202 A/C <i>IGFBP3</i>				<i>P</i>	
	A/A	A/C	C/C	A/*	A/A vs. A/C vs. C/C ^a	A/* vs. C/C ^b
Nº de pacientes	12	26	36	38	-	-
Cariótipo 45,X	45%	45%	46%	45%	-	-
Z da altura-alvo	-0,6 ± 1,0	-0,7 ± 0,9	-0,8 ± 0,8	-0,6 ± 0,9	ns	ns
IC ao início do tratamento	12,5 ± 3,6	12,6 ± 3,2	12,8 ± 3,1	12,2 ± 3,5	ns	ns
IO ao início do tratamento	11 ± 2,5	11 ± 2,9	11 ± 2,7	11 ± 2,8	ns	ns
Z de altura ao início do tratamento	-2,9 ± 0,8	-3,2 ± 0,9	-3,3 ± 1,0	-3,1 ± 0,9	ns	ns
Z do IMC ao início do tratamento	0,5 ± 0,6	0,8 ± 1,0	0,6 ± 1,2	0,5 ± 1,1	ns	ns
Z da IGFBP-3 ao início do tratamento	0,1 ± 1,4	-0,2 ± 1,1	-0,8 ± 1,2	-0,2 ± 1,2	p=0,041 ^c	p=0,035 ^d
Proporção entre puberdades espontânea e induzida	1 : 11	0 : 26	3 : 33	6 : 25	ns	ns
IC ao início da puberdade (anos)	14,4 ± 2,0	14,5 ± 2,2	15,1 ± 1,8	14,5 ± 2,0	ns	ns
Z da altura adulta	-2,5 ± 1,0	-2,8 ± 0,8	-3,1 ± 0,9	-2,8 ± 0,9	ns	ns

A/* - genótipos combinados A/A e A/C-202-*IGFBP3*; ns – não significante; ^aOne Way Anova; ^bt-test.

^cTukey test: A/A vs. C/C = ns; A/A vs. A/C = ns; A/C vs. C/C = ns

^d Diferença média 0,6 DP (IC 95% 0,04-1,2)

Figura 17 - Influência do genótipo do *GHR* éxon 3 na altura final (cm) de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.

4.4.4 Efeito interativo entre os polimorfismos estudados

Para avaliar a presença de efeitos interativos que só pudessem ser evidenciados com base na análise conjunta, foram realizadas análises de regressão linear múltipla, envolvendo os polimorfismos agrupados dois a dois. Embora as análises tenham sido limitadas pelo pequeno número de indivíduos classificados em cada grupo, os resultados sugerem que a importância relativa de cada polimorfismo seja diferente, conforme o parâmetro de resposta analisado.

Para a velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento com rhGH, tal qual demonstrado pelas análises independentes, as variáveis genéticas influentes foram o genótipo *GHR*-éxon 3 e o genótipo -202 A/C *IGFBP3*, que demonstraram apresentar uma influência independente e não aditiva.

As pacientes com combinação dos genótipos mais favoráveis, ou seja, presença de, pelo menos, um alelo *GHR-d3* e de um alelo -202 A-*IGFBP3* (*GHR*-éxon3 d3/* + -202 A/* *IGFBP3*) apresentaram velocidade de crescimento, ao final do primeiro ano de tratamento, 1.8 cm/ano maior, em média, que aquelas com genótipo menos favorável, ou seja, as homozigotas para os alelos *GHR-fl* e -202 C-*IGFBP3* (*GHR*-éxon3 fl/fl + -202 C/C *IGFBP3*, IC95% 1,0-2,6 cm/ano, $p < 0,001$). Os genótipos intermediários (*GHR*-éxon3 fl/fl+ -202 A/* *IGFBP3* e *GHR*-éxon3 d3/*+ -202 C/C *IGFBP3*) tiveram valores intermediários de velocidade de crescimento (Tabela 5).

O genótipo *GHR*-éxon 3 é uma variável independente de resposta ao tratamento com rhGH em curto prazo e, em conjunto com idade cronológica e IMC ao início do tratamento com rhGH, é capaz de predizer em 40% a velocidade de crescimento do primeiro ano. Não houve incremento significativo na capacidade de predição da resposta em curto prazo após a adição do genótipo -202 A/C *IGFBP3* ($R^2 = 0,40$ para $R^2 = 0,41$).

A influência positiva dos alelos *GHR-d3* e -202 A-*IGFBP3* observada na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento também foi vista, em relação ao Z de altura adulta com e sem correção para altura alvo, nas pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.

As pacientes com combinação dos genótipos mais favoráveis (*GHR*-éxon 3 d3/* + -202 A/* *IGFBP3*) são 1,4 DP mais altas (IC95%1,1 – 1,7, $p < 0.001$), em média, que aquelas com genótipo menos favorável (*GHR*-éxon3 fl/fl + -202 C/C *IGFBP3*), após tratamento com rhGH (Figura 18 e Tabela 7).

Figura 18 - Influência dos genótipos combinados do *GHR* éxon 3 e do -202 A/C *IGFBP3* na altura final (cm) de pacientes com a síndrome de Turner tratadas com rhGH.

Tabela 7 - Características clínicas e laboratoriais de 112 pacientes com a síndrome de Turner conforme genótipos combinados *GHR*-éxon 3 e -202 A/C *IGFBP3*.

	Genótipos <i>GHR</i> -éxon 3 e -202 A/C <i>IGFBP3</i>			<i>P</i>
	d3/*+ A/* (1)	fl/fl+A/* or d3*+C/C (2)	fl/fl+C/C (3)	(1) vs. (2) vs. (3) ^a
Nº de pacientes para resposta em curto prazo	44	37	31	-
Cariótipo 45,X	50%	56%	49%	-
Z da altura alvo	-0,6 ± 0,8	-0,8 ± 0,8	-1 ± 0,9	ns
IC ao início do tratamento com rhGH	11 ± 3,6	11 ± 3,7	12 ± 4	ns
IO ao início do tratamento com rhGH	9 ± 3,1	9 ± 3,1	10 ± 3,1	ns
Z de altura ao início do tratamento com rhGH	-3,0 ± 0,9	-3,1 ± 1,2	-3,7 ± 1,3	p=0,023 ^b
Z do IMC ao início do tratamento com rhGH	0,7 ± 1,1	0,4 ± 1,0	0,8 ± 1,2	ns
Dose média de rhGH (µg/kg.d)	48	48	48	ns
VC do primeiro ano de tratamento com rhGH (cm/a)	7,8 ± 1,6	6,8 ± 1,9	6,0 ± 2,0	p<0,001 ^c
Z do IGF-1 antes da terapia com rhGH	-0,1 ± 1,6	-0,3 ± 1,3	-0,8 ± 1,3	ns
Z do IGF-1 após a terapia com rhGH	1,9 ± 2,0	1,7 ± 1,6	1,1 ± 1,9	ns
Z da IGFBP-3 antes da terapia com rhGH	0,2 ± 1,6	0,2 ± 1,0	-1,1 ± 0,8	p<0,001 ^d
Z da IGFBP-3 após a terapia com rhGH	1,1 ± 0,9	0,6 ± 0,8	0,4 ± 1,1	p=0,004 ^e
Nº de pacientes para resposta a longo prazo	27	21	17	-
Proporção entre puberdades espontânea e induzida	6 : 21	3 : 18	1 : 16	ns
IC ao início da puberdade (anos)	14,0 ± 1,9	14,5 ± 2,3	15,0 ± 2,8	ns
Tempo de tratamento com rhGH antes da puberdade (anos)	4,0 ± 2,6	3,0 ± 2,0	3,0 ± 2,0	ns
Duração do tratamento com rhGH (anos)	5,0 ± 2,5	4,5 ± 2,4	5,0 ± 2,4	ns
Z da altura adulta	-1,3 ± 0,7	-2,2 ± 1,8	-2,7 ± 0,8	p<0,001 ^f
Z de altura adulta – Z da altura alvo	-0,7 ± 0,9	-1,4 ± 0,9	-1,6 ± 1,4	p=0,014 ^g
Z de ganho de altura	1,3 ± 1,1	0,8 ± 1,3	0,6 ± 1,6	ns

ns – não significante; ^a One-Way Anova.^b Tukey test: (1) vs. (3) = p<0,05; (1) vs. (2) = ns; (2) vs. (3) = ns.^c Tukey test: (1) vs. (3) = p<0,05; (1) vs. (2) = p<0,05; (2) vs. (3) = ns.^d Tukey test: (1) vs. (3) = p<0,05; (1) vs. (2) = ns; (2) vs. (3) = p<0,05.^e Tukey test: (1) vs. (3) = p<0,05; (1) vs. (2) = p<0,05; (2) vs. (3) = ns.^f Tukey test: (1) vs. (3) = p<0,05; (1) vs. (2) = p<0,05; (2) vs. (3) = ns.^g Tukey test: (1) vs. (3) = p<0,05; (1) vs. (2) = ns; (2) vs. (3) = ns.

Os genótipos *GHR*-éxon 3 e -202 A/C *IGFBP3* influenciam de forma independente e interativa a altura adulta de pacientes com a síndrome de Turner que trataram com rhGH. 27% da variação da altura adulta, após tratamento com rhGH, ($p < 0,001$) é explicada pelo genótipo *GHR*-éxon 3, e o genótipo -202 A/C *IGFBP3* responde por 24% dessa variabilidade ($p < 0,001$). Combinados, esses dois polimorfismos são responsáveis por 37% da variabilidade da resposta ao rhGH em longo prazo ($p < 0,001$) e, em conjunto com altura ao início do tratamento ($p < 0,001$) e idade cronológica ao início da puberdade ($p < 0,001$), são capazes de predizer 61% da variabilidade da altura adulta após uso de rhGH.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, os estudos de farmacogenética vêm demonstrando que polimorfismos comuns podem modular a resposta ao tratamento com rhGH. A inclusão dessas variáveis genéticas nos modelos de predição de resposta ao tratamento com rhGH, em diferentes causas de baixa estatura, poderia aumentar a capacidade preditiva de modo a permitir uma terapia mais individualizada. No entanto, uma das limitações desses estudos é a grande heterogeneidade quanto à fisiopatologia da baixa estatura em condições como nascidos pequenos para idade gestacional (PIG) e nos que apresentam baixa estatura idiopática. Nestas condições, é esperado que alguns pacientes apresentem resistência ao GH e/ou IGF-1 como mecanismo fundamental dos seus distúrbios de crescimento. Em contraste, a síndrome de Turner constitui-se em um bom modelo para o estudo da influência de variáveis genéticas sobre a resposta ao tratamento com rhGH, porque é uma causa mais homogênea de baixa estatura, uma vez que a haploinsuficiência do *SHOX* responde pela maior parte do déficit de crescimento observado nessa síndrome. Por estes motivos, este estudo objetivou a análise de polimorfismos candidatos capazes de modular a resposta ao tratamento com rhGH, em uma grande coorte de pacientes com síndrome de Turner.

O presente estudo confirmou a influência positiva do alelo *GHR-d3* na velocidade de crescimento do primeiro ano e na altura adulta de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH ⁽¹⁰⁹⁾. A ausência de correlação entre o genótipo *GHR*-éxon 3 e a resposta em curto prazo ao tratamento com rhGH nas pacientes com síndrome de Turner descrita em dois estudos prévios pode ser

parcialmente explicada pelo número pequeno de pacientes incluídas em um dos estudos⁽⁵⁶⁾ e pela baixa frequência de pacientes carreadoras do alelo *GHR-d3* no outro⁽⁵⁷⁾, o que diminui o poder estatístico. Esta metanálise que combinou os resultados de todos os estudos em síndrome de Turner, mostrou que o alelo *GHR-d3* está associado a uma melhor resposta em curto prazo ao tratamento com rhGH nessa doença, corroborando os resultados de outra metanálise publicada anteriormente que avaliou a influência do alelo *GHR-d3* na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento em crianças com diversas etiologias de baixa estatura⁽⁵⁵⁾.

O resultado desta metanálise confirma os resultados de um trabalho da literatura que associa o efeito positivo do alelo *GHR-d3* na resposta ao tratamento em curto prazo com rhGH em pacientes com síndrome de Turner⁽⁵³⁾. No entanto, a existência de três estudos publicados recentemente, que não replicaram essa associação, ainda desperta a incredulidade quanto aos resultados desse primeiro trabalho em farmacogenética do rhGH na síndrome de Turner^(56, 57). Nesse sentido, é importante considerar que a replicabilidade variável é uma característica comum e extensamente discutida dos estudos de associação genética e que, hoje, sabe-se que pode estar relacionada a inúmeros fatores - incluindo não só a presença de resultados falsamente positivos (erro tipo 1), como também de resultados falsamente negativos (erro tipo 2). Dessa forma, conclusões definitivas só podem ser adotadas baseadas em uma cuidadosa análise do desenho metodológico de cada estudo⁽¹¹⁰⁾ e do uso de instrumentos de compilação de evidências tais como revisões sistemáticas e metanálises⁽¹¹¹⁾. Dentre os estudos que avaliaram a influência do polimorfismo do *GHR* éxon 3-deletado na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento com rhGH de pacientes com síndrome de Turner^(53, 56, 57, 109, 112) analisados seguindo

as orientações do Prisma⁽¹⁰⁸⁾, três preencheram os critérios e foram selecionados para serem analisados com os resultados deste estudo. Os resultados confirmaram uma influência pequena, porém positiva, da deleção do éxon 3 do *GHR* na velocidade de crescimento do primeiro ano em pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH.

Embora o genótipo do *GHR*-éxon 3, individualmente, seja responsável por uma pequena diferença na resposta ao tratamento com rhGH entre os diferentes grupos genotípicos, sua associação com outros polimorfismos que também modulam a resposta ao tratamento com rhGH, poderia aumentar a capacidade preditiva dos modelos vigentes de resposta ao tratamento com rhGH, permitindo um tratamento mais individualizado. Pela primeira vez, o presente estudo mostrou a influência combinada de dois polimorfismos localizados em diferentes *loci* na magnitude de resposta ao tratamento com rhGH em pacientes com síndrome de Turner.

A IGFBP-3 modula as ações das IGFs e ainda apresenta um efeito biológico independente e distinto do eixo IGF-1/ receptor do IGF-1^(82-84, 113, 114). O polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) -202 A/C da região promotora da *IGFBP3* tem sido correlacionado com as concentrações de IGFBP-3 em adultos saudáveis⁽⁸⁶⁾, crianças com DGH⁽⁵⁹⁾ e crianças nascidas pequenas para a idade gestacional (PIG)⁽⁶⁰⁾. Em concordância com esses achados, no presente estudo, pacientes com síndrome de Turner que carregavam, pelo menos, um alelo -202 A-*IGFBP3* apresentaram valores de IGFBP-3 maiores, ao início e durante o tratamento com rhGH, que as homozigotas para o alelo -202 C-*IGFBP3*. Além disso, a presença do alelo -202 A-*IGFBP3* também foi associada com melhor resposta ao tratamento com rhGH, tanto em curto como em longo prazo nas pacientes com síndrome de Turner

de forma semelhante ao que foi observado para a velocidade de crescimento em pacientes com DGH⁽⁵⁹⁾ e em crianças nascidas PIG⁽⁶⁰⁾.

Durante o início da execução do estudo, um erro de genotipagem do polimorfismo -202 A/C da região promotora da *IGFBP3* foi identificado, sendo observado que 4,5% das amostras genotipadas por enzima de restrição apresentaram resultados discordantes (AC vs. AA), o que nos levou a regeotipar toda a casuística por PCR em tempo real, utilizando o ensaio TaqMan®. Por esta metodologia, houve 100% de concordância nas amostras randomicamente selecionadas para confirmação por sequenciamento direto. O rigor que foi adotado justifica-se, já que o erro de genotipagem é um dos fatores envolvidos na replicabilidade variável de estudos de associação genética^(110, 111).

Por ser uma condição clínica não tão frequente, uma das principais limitações dos estudos de associação com variáveis genéticas em síndrome de Turner é a dificuldade de obtenção de casuísticas suficientemente grandes para alcançar poder estatístico satisfatório, o que pode levar a resultados falsamente negativos (erro tipo 2)^(110, 111). Embora, neste estudo, tenha-se conseguido juntar uma casuística com número significativo de pacientes com síndrome de Turner (n=112), talvez esse montante não fora grande o suficiente para observar-se a influência do microsatélite (CA)n IGF1 na resposta ao tratamento com rhGH nessas pacientes.

É importante ressaltar que a análise conjunta dos genótipos *GHR*-éxon 3 e -202 A/C *IGFBP3* mostrou uma clara influência epistática, não aditiva, desses dois polimorfismos comuns na altura adulta de pacientes com síndrome de Turner tratadas com rhGH (efeito isolado do *GHR*-éxon 3, $R^2 = 0,27$; efeito isolado do -202 A/C *IGFBP3*, $R^2 = 0,24$; influência combinada desses polimorfismos, $R^2 = 0,37$; Figura

18). Em conjunto com as variáveis clínicas, altura ao início do tratamento ($p < 0,001$) e idade cronológica ao início da puberdade ($p < 0,001$), esses dois polimorfismos são capazes de prever 61% da variabilidade da altura adulta após uso de rhGH.

Os achados deste estudo estimulam a continuidade desta linha de pesquisa. Um dos genes candidatos a serem estudados em uma próxima etapa é o *SOCS2* (*Suppressor of cytokine signaling*). Este gene modula negativamente a transdução do sinal do GH, pois transcreve uma proteína de mesmo nome que é responsável pela finalização da sinalização via GHR⁽⁶⁴⁾. Por meio de estudos de GWAS, SNPs do *SOCS2* foram associados com pico de velocidade de crescimento na puberdade e com a altura adulta espontânea ($p = 1.8 \times 10^{-7}$ e 5.6×10^{-10})⁽⁴⁵⁾. Pretende-se em breve analisar Tag-SNPs nesse gene para avaliar seu papel na farmacogenética do GH.

Embora estudos de validação sejam necessários, acredita-se que as informações geradas por este e outros estudos de farmacogenética possam servir no futuro como importante ferramenta de individualização do tratamento com rhGH ao permitir o ajuste da dose conforme os perfis genotípicos de melhor ou pior resposta.

À medida que se identifica, a cada dia, um número maior de polimorfismos funcionais sobre a resposta ao tratamento com rhGH, surge a necessidade de realizar estudos multicêntricos prospectivos, nos quais o conhecimento prévio desses perfis genotípicos de melhor ou pior resposta seja a variável utilizada para determinar a dose inicial de rhGH e as necessidades de ajustes da dose durante o tratamento em diversas condições clínicas. Os resultados dessas futuras intervenções fornecerão subsídios necessários para o uso habitual da farmacogenética na prática clínica da Endocrinologia.

6 CONCLUSÕES

A homozigose para os alelos *GHR-fl* e *-202 C-IGFBP3* está associada a uma pior resposta ao tratamento com rhGH tanto em curto como em longo prazo em pacientes com a síndrome de Turner.

O microssatélite (CA)_n *IGF1* não influencia de forma significativa a resposta ao tratamento com rhGH em pacientes com a síndrome de Turner.

Os polimorfismos *GHR*-éxon 3 e *-202 A/C-IGFBP3* exercem efeito interativo, não aditivo, sobre a resposta ao tratamento com rhGH em pacientes com a síndrome de Turner.

7 REFERÊNCIAS

1. Saenger P, Wikland KA, Conway GS, Davenport M, Gravholt CH, Hintz R, Hovatta O, Hultcrantz M, Landin-Wilhelmsen K, Lin A, Lippe B, Pasquino AM, Ranke MB, Rosenfeld R, Silberbach M. Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:3061-9.
2. Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet.* 1991;87:81-3.
3. Gravholt CH, Juul S, Naeraa RW, Hansen J. Prenatal and postnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study. *BMJ.* 1996;312:16-21.
4. Davenport ML. Approach to the patient with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1487-95.
5. Nishi MY, Domenice S, Medeiros MA, Mendonca BB, Billerbeck AE. Detection of Y-specific sequences in 122 patients with Turner syndrome: nested PCR is not a reliable method. *Am J Med Genet.* 2002;107:299-305.
6. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature.* 2005;434:400-4.
7. Rappold GA. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet.* 1993;92:315-24.
8. Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9:695-702.

-
9. Ranke MB, Saenger P. Turner's syndrome. *Lancet*. 2001;358:309-14.
 10. Bondy CA. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:10-25.
 11. Jorge AA, Nishi MY, Funari MF, Souza SC, Arnhold IJ, Mendonca BB. [Short stature caused by SHOX gene haploinsufficiency: from diagnosis to treatment]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52:765-73.
 12. Ogata T. SHOX haploinsufficiency and its modifying factors. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2002;15 Suppl 5:1289-94.
 13. Kosho T, Muroya K, Nagai T, Fujimoto M, Yokoya S, Sakamoto H, Hirano T, Terasaki H, Ohashi H, Nishimura G, Sato S, Matsuo N, Ogata T. Skeletal features and growth patterns in 14 patients with haploinsufficiency of SHOX: implications for the development of Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:4613-21.
 14. Stephure DK. Impact of growth hormone supplementation on adult height in turner syndrome: results of the Canadian randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3360-6.
 15. Rosenfeld RG, Frane J, Attie KM, Brasel JA, Burstein S, Cara JF, Chernausek S, Gotlin RW, Kuntze J, Lippe BM, et al. Six-year results of a randomized, prospective trial of human growth hormone and oxandrolone in Turner syndrome. *J Pediatr*. 1992;121:49-55.
 16. Quigley CA, Crowe BJ, Anglin DG, Chipman JJ. Growth hormone and low dose estrogen in Turner syndrome: results of a United States multi-center trial to near-final height. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2033-41.

17. Ross JL, Quigley CA, Cao D, Feuillan P, Kowal K, Chipman JJ, Cutler GB, Jr. Growth hormone plus childhood low-dose estrogen in Turner's syndrome. *N Engl J Med*. 2011;364:1230-42.
18. Davenport ML, Crowe BJ, Travers SH, Rubin K, Ross JL, Fechner PY, Gunther DF, Liu C, Geffner ME, Thrailkill K, Huseman C, Zagar AJ, Quigley CA. Growth hormone treatment of early growth failure in toddlers with Turner syndrome: a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:3406-16.
19. Reiter EO, Blethen SL, Baptista J, Price L. Early initiation of growth hormone treatment allows age-appropriate estrogen use in Turner's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1936-41.
20. Hughes IP, Choong CS, Harris M, Ambler GR, Cutfield WS, Hofman PL, Cowell CT, Werther G, Cotterill A, Davies PS. Growth hormone treatment for Turner syndrome in Australia reveals that younger age and increased dose interact to improve response. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;74:473-80.
21. Linglart A, Cabrol S, Berlier P, Stuckens C, Wagner K, de Kerdanet M, Limoni C, Carel JC, Chaussain JL. Growth hormone treatment before the age of 4 years prevents short stature in young girls with Turner syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2011;164:891-7.
22. Ranke MB, Grauer ML. Adult height in Turner syndrome: results of a multinational survey 1993. *Horm Res*. 1994;42:90-4.
23. Ranke MB, Lindberg A, Ferrandez Longas A, Darendeliler F, Albertsson-Wikland K, Dunger D, Cutfield WS, Tauber M, Wilton P, Wollmann HA, Reiter EO. Major determinants of height development in Turner syndrome (TS) patients treated with GH: analysis of 987 patients from KIGS. *Pediatr Res*. 2007;61:105-10.

-
24. Costalonga EF, Jorge AA, Mendonca BB, Arnhold IJ. [Mathematical models for predicting growth responses to growth hormone replacement therapy]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52:839-49.
 25. Kristrom B, Wikland KA. Growth prediction models, concept and use. *Horm Res*. 2002;57 Suppl 2:66-70.
 26. de Ridder MA, Stijnen T, Hokken-Koelega AC. Prediction model for adult height of small for gestational age children at the start of growth hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:477-83.
 27. Ranke MB, Lindberg A, Chatelain P, Wilton P, Cutfield W, Albertsson-Wikland K, Price DA. Prediction of long-term response to recombinant human growth hormone in Turner syndrome: development and validation of mathematical models. KIGS International Board. Kabi International Growth Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4212-8.
 28. Geffner ME, Dunger DB. Future directions: growth prediction models. *Horm Res*. 2007;68 Suppl 5:51-6.
 29. Chernausek SD, Attie KM, Cara JF, Rosenfeld RG, Frane J. Growth hormone therapy of Turner syndrome: the impact of age of estrogen replacement on final height. Genentech, Inc., Collaborative Study Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2439-45.
 30. Soriano-Guillen L, Coste J, Ecosse E, Leger J, Tauber M, Cabrol S, Nicolino M, Brauner R, Chaussain JL, Carel JC. Adult height and pubertal growth in Turner syndrome after treatment with recombinant growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:5197-204.

-
31. GH Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3990-3.
 32. Fonteles AV, Dondoni RS, Boguszewski MC, Nesi-Franca S, Marques-Pereira R, Sandrini Neto R, Lacerda Filho L. [Final height (FH) in Turner syndrome (TS): experience of 76 cases followed at the Pediatric Endocrinology Unit, Hospital de Clinicas, Federal University of Parana]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011;55:318-25.
 33. Mroziewicz M, Tyndale RF. Pharmacogenetics: a tool for identifying genetic factors in drug dependence and response to treatment. *Addict Sci Clin Pract.* 2010;5:17-29.
 34. Pirmohamed M. Pharmacogenetics: past, present and future. *Drug Discov Today.* 2011;16:852-61.
 35. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med.* 2003;348:529-37.
 36. Weinshilboum RM, Wang L. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:223-45.
 37. Nebert DW, Zhang G, Vesell ES. From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug Metab Rev.* 2008;40:187-224.
 38. Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science.* 1956;124:484-5.

-
39. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc.* 1957;165:835-7.
 40. Vesell ES. Therapeutic lessons from pharmacogenetics. *Ann Intern Med.* 1997;126:653-5.
 41. Goldstein DB, Ahmadi KR, Weale ME, Wood NW. Genome scans and candidate gene approaches in the study of common diseases and variable drug responses. *Trends Genet.* 2003;19:615-22.
 42. Hirschhorn JN. Genetic approaches to studying common diseases and complex traits. *Pediatr Res.* 2005;57:74R-7R.
 43. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet.* 2002;3:391-7.
 44. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.* 2008;9:356-69.
 45. Weedon MN, Lango H, Lindgren CM, Wallace C, Evans DM, Mangino M, Freathy RM, Perry JR, Stevens S, Hall AS, Samani NJ, Shields B, Prokopenko I, Farrall M, Dominiczak A, Johnson T, Bergmann S, Beckmann JS, Vollenweider P, Waterworth DM, Mooser V, Palmer CN, Morris AD, Ouwehand WH, Zhao JH, Li S, Loos RJ, Barroso I, Deloukas P, Sandhu MS, Wheeler E, Soranzo N, Inouye M, Wareham NJ, Caulfield M, Munroe PB, Hattersley AT, McCarthy MI, Frayling TM. Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet.* 2008;40:575-83.
 46. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest.* 2008;118:1590-605.

-
47. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426:789-96.
 48. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437:1299-320.
 49. Need AC, Motulsky AG, Goldstein DB. Priorities and standards in pharmacogenetic research. *Nat Genet*. 2005;37:671-81.
 50. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 2004;74:106-20.
 51. Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougneres P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nat Genet*. 2004;36:720-4.
 52. Jorge AA, Marchisotti FG, Montenegro LR, Carvalho LR, Mendonca BB, Arnhold IJ. Growth hormone (GH) pharmacogenetics: influence of GH receptor exon3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1076-80.
 53. Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:659-64.
 54. Binder G, Trebar B, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. Homozygosity of the d3-growth hormone receptor polymorphism is associated with a high total effect of GH on growth and a low BMI in girls with Turner syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68:567-72.

-
55. Wassenaar MJ, Dekkers OM, Pereira AM, Wit JM, Smit JW, Biermasz NR, Romijn JA. Impact of the exon3-deleted GH receptor polymorphism on baseline height and the growth response to recombinant human growth hormone therapy in growth hormone deficient (GHD) and non-GHD children with short stature: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:3721-30.
 56. Alvarez-Nava F, Marcano H, Pardo T, Paoli M, Gunczler P, Soto M, Villalobos J, Lanes R. GHR and VDR genes do not contribute to the growth hormone (GH) response in GH deficient and Turner syndrome patients. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2010;23:773-82.
 57. Ko JM, Kim JM, Cheon CK, Kim DH, Lee DY, Cheong WY, Kim EY, Park MJ, Yoo HW. The common exon3 polymorphism of the growth hormone receptor gene and the effect of growth hormone therapy on growth in Korean patients with Turner syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;72:196-202.
 58. Renehan AG, Solomon M, Zwahlen M, Morjaria R, Whatmore A, Audi L, Binder G, Blum W, Bougneres P, Santos CD, Carrascosa A, Hokken-Koelega A, Jorge A, Mullis PE, Tauber M, Patel L, Clayton PE. Growth hormone receptor polymorphism and growth hormone therapy response in children: a Bayesian meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2012;175:867-77.
 59. Costalonga EF, Antonini SR, Guerra-Junior G, Mendonca BB, Arnhold IJ, Jorge AA. The -202 A allele of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3) promoter polymorphism is associated with higher IGFBP-3 serum levels and better growth response to growth hormone treatment in patients with severe growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:588-95.

-
60. van der Kaay DC, Hendriks AE, Ester WA, Leunissen RW, Willemsen RH, de Kort SW, Paquette JR, Hokken-Koelega AC, Deal CL. Genetic and epigenetic variability in the gene for IGFBP-3 (IGFBP3): correlation with serum IGFBP-3 levels and growth in short children born small for gestational age. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19:198-205.
 61. Costalonga EF, Antonini SR, Guerra-Junior G, Coletta RR, Franca MM, Braz AF, Mendonca BB, Arnhold IJ, Jorge AA. Growth hormone pharmacogenetics: the interactive effect of a microsatellite in the IGF1 promoter region with the GHR-éxon3 and -202 A/C IGFBP3 variants on treatment outcomes of children with severe GH deficiency. *Pharmacogenomics J.* 2012;12:439-45.
 62. Meyer S, Schaefer S, Stolk L, Arp P, Uitterlinden AG, Plockinger U, Stalla GK, Tuschy U, Weber MM, Weise A, Pfutzner A, Kann PH. Association of the éxon3 deleted/full-length GHR polymorphism with recombinant growth hormone dose in growth hormone-deficient adults. *Pharmacogenomics.* 2009;10:1599-608.
 63. Hartleb S, Plockinger U, Stalla GK, Tuschy U, Weber MM, Pfutzner A, Kann PH. Additive effect of GHRd3 and COLIA1 polymorphisms on the GH-substitution dose in GH-deficient adults. *Pharmacogenomics.* 2011;12:1653-61.
 64. Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab.* 2000;71:293-314.
 65. Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, Rotwein PS, Parks JS, Laron Z, Wood WI. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:8083-7.

-
66. Raz B, Janner M, Petkovic V, Lochmatter D, Eble A, Dattani MT, Hindmarsh PC, Fluck CE, Mullis PE. Influence of growth hormone (GH) receptor deletion of éxon3 and full-length isoforms on GH response and final height in patients with severe GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:974-80.
 67. Audi L, Esteban C, Carrascosa A, Espadero R, Perez-Arroyo A, Arjona R, Clemente M, Wollmann H, Fryklund L, Parodi LA. Éxon3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism genotype frequencies in Spanish short small-for-gestational-age (SGA) children and adolescents (n = 247) and in an adult control population (n = 289) show increased fl/fl in short SGA. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:5038-43.
 68. Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem.* 2000;275:18664-9.
 69. Tauber M, Ester W, Auriol F, Molinas C, Fauvel J, Caliebe J, Nugent T, Fryklund L, Ranke MB, Savage MO, Clark AJ, Johnston LB, Hokken-Koelega AC. GH responsiveness in a large multinational cohort of SGA children with short stature (NESTEGG) is related to the éxon3 GHR polymorphism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67:457-61.
 70. Stallings-Mann ML, Ludwiczak RL, Klinger KW, Rottman F. Alternative splicing of éxon3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:12394-9.
 71. Jorge AA, Arnhold JJ. Growth hormone receptor éxon3 isoforms and their implication in growth disorders and treatment. *Horm Res.* 2009;71 Suppl 2:55-63.

-
72. Urbanek M, Russell JE, Cooke NE, Liebhaber SA. Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *J Biol Chem*. 1993;268:19025-32.
 73. Blum WF, Machinis K, Shavrikova EP, Keller A, Stobbe H, Pfaeffle RW, Amselem S. The growth response to growth hormone (GH) treatment in children with isolated GH deficiency is independent of the presence of the exon3-minus isoform of the GH receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4171-4.
 74. Marchisotti FG, Jorge AA, Montenegro LR, Berger K, de Carvalho LR, Mendonca BB, Arnhold IJ. Comparison between weight-based and IGF-I-based growth hormone (GH) dosing in the treatment of children with GH deficiency and influence of exon3 deleted GH receptor variant. *Growth Horm IGF Res*. 2009;19:179-86.
 75. Pilotta A, Mella P, Filisetti M, Felappi B, Prandi E, Parrinello G, Notarangelo LD, Buzi F. Common polymorphisms of the growth hormone (GH) receptor do not correlate with the growth response to exogenous recombinant human GH in GH-deficient children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1178-80.
 76. Carrascosa A, Esteban C, Espadero R, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, Clemente M, Audi L, Wollmann H, Fryklund L, Parodi L. The d3/fl-growth hormone (GH) receptor polymorphism does not influence the effect of GH treatment (66 microg/kg per day) or the spontaneous growth in short non-GH-deficient small-for-gestational-age children: results from a two-year controlled prospective study in 170 Spanish patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3281-6.

-
77. Dorr HG, Bettendorf M, Hauffa BP, Mehls O, Rohrer T, Stahnke N, Pfaffle R, Ranke MB. Different relationships between the first two years on growth hormone treatment and the d3-growth hormone receptor polymorphism in short Small-for-Gestational-Age (SGA) Children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75:656-60.
 78. Carrascosa A, Audi L, Fernandez-Cancio M, Esteban C, Andaluz P, Vilaro E, Clemente M, Yeste D, Albisu MA, Gussinye M. The exon3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism did not influence growth response to growth hormone therapy over two years in prepubertal short children born at term with adequate weight and length for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:764-70.
 79. Toyoshima MT, Castroneves LA, Costalonga EF, Mendonca BB, Arnhold IJ, Jorge AA. Éxon3-deleted genotype of growth hormone receptor (GHRd3) positively influences IGF-1 increase at generation test in children with idiopathic short stature. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67:500-4.
 80. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest*. 2002;110:771-81.
 81. Rosenzweig SA. What's new in the IGF-binding proteins? *Growth Horm IGF Res*. 2004;14:329-36.
 82. Mohan S, Baylink DJ. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J Endocrinol*. 2002;175:19-31.
 83. Jogie-Brahim S, Feldman D, Oh Y. Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. *Endocr Rev*. 2009;30:417-37.

-
84. Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278:E967-76.
 85. Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P, Koistinen R, Seppala M. Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J Clin Invest.* 1996;98:2612-5.
 86. Deal C, Ma J, Wilkin F, Paquette J, Rozen F, Ge B, Hudson T, Stampfer M, Pollak M. Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor-binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1274-80.
 87. Al-Zahrani A, Sandhu MS, Luben RN, Thompson D, Baynes C, Pooley KA, Luccarini C, Munday H, Perkins B, Smith P, Pharoah PD, Wareham NJ, Easton DF, Ponder BA, Dunning AM. IGF1 and IGFBP3 tagging polymorphisms are associated with circulating levels of IGF1, IGFBP3 and risk of breast cancer. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1-10.
 88. Cheng I, DeLellis Henderson K, Haiman CA, Kolonel LN, Henderson BE, Freedman ML, Le Marchand L. Genetic determinants of circulating insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein (BP)-1, and IGFBP-3 levels in a multiethnic population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3660-6.
 89. Jernstrom H, Deal C, Wilkin F, Chu W, Tao Y, Majeed N, Hudson T, Narod SA, Pollak M. Genetic and nongenetic factors associated with variation of plasma levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in healthy premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:377-84.

-
90. Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson JO, Svensson J. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev.* 2009;30:494-535.
 91. Kao PC, Matheny AP, Jr., Lang CA. Insulin-like growth factor-I comparisons in healthy twin children. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:310-2.
 92. Sussenbach JS, Steenbergh PH, Holthuisen P. Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regul.* 1992;2:1-9.
 93. Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, Witte S, Rogers J, Bilezikian JP. Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2286-90.
 94. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 1989;44:388-96.
 95. Rietveld I, Janssen JA, van Rossum EF, Houwing-Duistermaat JJ, Rivadeneira F, Hofman A, Pols HA, van Duijn CM, Lamberts SW. A polymorphic CA repeat in the IGF-I gene is associated with gender-specific differences in body height, but has no effect on the secular trend in body height. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61:195-203.
 96. Rietveld I, Janssen JA, Hofman A, Pols HA, van Duijn CM, Lamberts SW. A polymorphism in the IGF-I gene influences the age-related decline in circulating total IGF-I levels. *Eur J Endocrinol.* 2003;148:171-5.
 97. Vaessen N, Janssen JA, Heutink P, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, van Duijn CM. Association between genetic variation in the gene for insulin-like growth factor-I and low birthweight. *Lancet.* 2002;359:1036-7.

-
98. Ester WA, Hokken-Koelega AC. Polymorphisms in the IGF1 and IGF1R genes and children born small for gestational age: results of large population studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22:415-31.
 99. Arends N, Johnston L, Hokken-Koelega A, van Duijn C, de Ridder M, Savage M, Clark A. Polymorphism in the IGF-I gene: clinical relevance for short children born small for gestational age (SGA). *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2720.
 100. Rivadeneira F, Houwing-Duistermaat JJ, Vaessen N, Vergeer-Drop JM, Hofman A, Pols HA, Van Duijn CM, Uitterlinden AG. Association between an insulin-like growth factor I gene promoter polymorphism and bone mineral density in the elderly: the Rotterdam Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3878-84.
 101. Sweeney C, Murtaugh MA, Baumgartner KB, Byers T, Giuliano AR, Herrick JS, Wolff R, Caan BJ, Slattery ML. Insulin-like growth factor pathway polymorphisms associated with body size in Hispanic and non-Hispanic white women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1802-9.
 102. Schildkraut JM, Demark-Wahnefried W, Wenham RM, Grubber J, Jeffreys AS, Grambow SC, Marks JR, Moorman PG, Hoyo C, Ali S, Walther PJ. IGF1 (CA)19 repeat and IGFBP3 -202 A/C genotypes and the risk of prostate cancer in Black and White men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:403-8.
 103. Cleveland RJ, Gammon MD, Edmiston SN, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Eng SM, Neugut AI, Santella RM, Conway K. IGF1 CA repeat polymorphisms, lifestyle factors and breast cancer risk in the Long Island Breast Cancer Study Project. *Carcinogenesis.* 2006;27:758-65.

104. Vaessen N, Heutink P, Janssen JA, Witteman JC, Testers L, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, van Duijn CM. A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes*. 2001;50:637-42.
105. Hovind P, Lamberts S, Hop W, Deinum J, Tarnow L, Parving HH, Janssen JA. An IGF-I gene polymorphism modifies the risk of developing persistent microalbuminuria in type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2007;156:83-90.
106. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child*. 1966;41:454-71.
107. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. Second Edition ed. Stanford, 1959.
108. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *J Clin Epidemiol*. 2009;62:e1-34.
109. Braz AF, Costalonga EF, Montenegro LR, Trarbach EB, Antonini SR, Malaquias AC, Ramos ES, Mendonca BB, Arnhold IJ, Jorge AA. The interactive effect of GHR-éxon3 and -202 A/C IGFBP3 polymorphisms on rhGH responsiveness and treatment outcomes in patients with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:E671-7.
110. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*. 2001;29:306-9.

-
111. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet.* 2003;33:177-82.
 112. Bas F, Darendeliler F, Aycan Z, Cetinkaya E, Berberoglu M, Siklar Z, Ocal G, Timirci O, Cetinkaya S, Darcan S, Goksen Simsek D, Bideci A, Cinaz P, Bober E, Demir K, Bereket A, Turan S, Atabek ME, Tutunculer F, Isbir T, Bozkurt N, Kabatas Eryilmaz S, Uzunhan O, Kucukemre Aydin B, Bundak R. The exon3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism and response to growth hormone therapy in growth hormone deficiency and Turner syndrome: a multicenter study. *Horm Res Paediatr.* 2012;77:85-93.
 113. Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol.* 2000;183:1-9.
 114. Bannink EM, van Doorn J, Stijnen T, Drop SL, de Muinck Keizer-Schrama SM. Free dissociable insulin-like growth factor I (IGF-I), total IGF-I and their binding proteins in girls with Turner syndrome during long-term growth hormone treatment. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;65:310-9.