LIZE VARGAS FERREIRA

**Estudo do gene PTPN11 em pacientes com a síndrome de
Noonan e crianças com baixa estatura idiopática**

**Tese apresentada ao Departamento de
Clínica Médica da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Endocrinologia

**Orientador: Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge
Co-Orientadora: Prof. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça**

SÃO PAULO

2005

Este trabalho foi realizado no laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro parcial da FAPESP (processo: 00/14092-4)

“E ao final de nossas longas explorações,
chegaremos finalmente ao lugar de onde
partimos e o conheceremos então pela primeira
vez...”

(T. S. Eliot)

Ao Juliano, que estive ao meu lado quando plantei minha árvore, quando escrevi este livro, quando nasceu nosso filho, e em cada um dos pequenos detalhes que fizeram de mim uma pessoa completa e realizada.

Pedro, você nasceu no meio desse trabalho. Algumas vezes, ele tomou um pouco do seu tempo. Dedico essa tese a você, meu filho, que me trouxe a serenidade necessária para terminá-la.

A melhor herança que se pode deixar aos
filhos são asas e razes. Agradeço a meus pais
por ambos.

Senhor, que possamos aprender com o exemplo de entrega e inocência das crianças, e que esse trabalho traga bons frutos para o cuidado de nossos pacientes.

Às crianças que foram a motivação dessa
tese, e a todos os pacientes e voluntários que
“deram o sangue” para que ela fosse realizada.

AGRADECIMENTOS

Nenhum trabalho se faz sozinho. Toda obra é fruto da atuação conjunta, direta ou indireta, de várias pessoas. Gostaria aqui de agradecer aos vários colaboradores que tive, sem a ajuda dos quais essa tese não se completaria.

Um dos primeiros profissionais com quem tive contato no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular foi também o mais importante em toda essa fase. Ter sido a primeira orientanda do Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge foi uma grande honra, e ele cumpriu seu papel com primor. Desvendou-me os mistérios da biologia molecular, técnicas laboratoriais, avanços em informática, essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico. Dele também se poderia dizer: “Corre na frente com o facho, a espantar todos os morcegos e corujas, e a semear horizontes.” (Monteiro Lobato). Só isso seria suficiente para torná-lo um orientador digno de todos os elogios. Porém, mais que isso, tive a felicidade de conviver com ele nos ambulatórios de baixa estatura, onde tive verdadeiras aulas de postura médica para com o paciente e de percepção de pequenos detalhes. Também admirável é sua dedicação intensa a tudo: aos amigos (entre os quais estou incluída), ao estudo, à produção. Entusiasmo – seu nome é Alex!...

Agradeço de uma forma especial a Karina, Viviane, Rogério e Márcio, meus companheiros enquanto eu ainda não estava “em casa” no laboratório. Aos pós-graduandos que já estavam lá e que tanto me ajudaram nos meus primeiros “tropeços”: Regina, Rafaela, Luciani, Edna, Milena, Sílvia, Vinícius. À Emília, Ana Elisa, Ângela, Ana Cláudia, Suemi, Dra. Mirta, Elaine, Sorahia, Tânia, Miriam,

Cidinha, Cris, que deram contribuições importantíssimas para mim. E a todo o pessoal do laboratório, obrigado pela companhia e pelo bom ambiente, essencial para a realização de qualquer trabalho. E obrigado à Nilda, à Chris e à Ana que conseguem organizar o trabalho de toda esse grupo.

Devo enorme gratidão à atual professora titular da disciplina de endocrinologia, Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pelo incentivo, pelo apoio, pela confiança e pela oportunidade de fazer parte dessa equipe. Por fim, agradeço pela co-orientação, essencial para o bom desenvolvimento dessa tese.

Também agradeço ao Dr. Ivo Jorge P Arnhold, cujas correções, opiniões e sugestões enriqueceram sobremaneira meu trabalho.

E, finalmente, aos meus amigos e familiares, pela torcida.

RESUMO

Introdução: A síndrome de Noonan (SN) é uma doença clinicamente heterogênea caracterizada por baixa estatura, dismorfismo facial, deformidades torácicas e cardiopatia congênita. Essa síndrome, de herança autossômica dominante, tem prevalência de 1:1000–2500 nascidos vivos. Recentemente, mutações no gene *PTPN11* (Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 11), responsável pela codificação da tirosinofosfatase SHP-2 (Src Homology region 2-domain Phosphatase 2) foram identificadas em 33-60% dos casos de SN. A SHP-2 atua fundamentalmente nos processos celulares ligados à transdução de sinal via fosforilação de tirosinas. Além da SN, mutações nesse gene foram identificadas na síndrome LEOPARD e síndrome Noonan-like/células gigantes. A heterogeneidade dessas doenças sugere relação entre diferentes mutações no *PTPN11* e características clínicas distintas. A baixa estatura é uma das características mais constantes da SN, e algumas crianças baixas apresentam sinais relacionados à SN sem preencher os critérios de diagnóstico de SN. Nós levantamos a hipótese de que essas crianças possam ser portadoras de mutações de menor impacto e que representem um espectro mais leve da doença. Objetivos: avaliar a presença de mutações no gene *PTPN11*: 1) em pacientes com diagnóstico clínico de SN, correlacionando os achados moleculares com os dados fenotípicos e com a resposta ao tratamento com hGH. 2) nos pais de pacientes com SN portadores de mutação no *PTPN11* para determinar se a mutação foi herdada 3) em crianças com baixa estatura que apresentam estigmas sugestivos da SN, mas que não preenchem todos os

critérios para este diagnóstico. Pacientes: pacientes com diagnóstico clínico de SN baseado nos critérios de van der Burgt (n= 26); pais de portadores de SN com mutação no *PTPN11* (n= 12) e crianças com baixa estatura idiopática que apresentavam estigmas associados à SN sem preencher o critério diagnóstico (n= 42). Métodos: extração de DNA de leucócitos de sangue periférico dos três grupos. Os exons 1 a 15 do gene *PTPN11* foram amplificados por reação de PCR utilizando *primers* intrônicos, seguida por seqüenciamento automático. Resultados: Nos pacientes com SN encontramos sete mutações *missense* em heterozigose no *PTPN11* em onze pacientes: N58D, G60A, D61N, Y63C, A72G, N308D e M504V, e cinco polimorfismos, um exônico silencioso e quatro intrônicos. O estudo dos pais não revelou as alterações genéticas identificadas nos filhos. No grupo de baixa estatura idiopática, também não foram encontradas alterações na região codificadora do gene *PTPN11*. Entre os pacientes com SN com e sem mutação, não observamos diferenças em relação a características fenotípicas e de resposta ao tratamento em curto prazo com hGH. Nos pacientes que foram tratados por período prolongado, houve melhor resposta ao hGH no grupo sem mutação. Conclusão: Identificamos mutações *missense* em heterozigose do *PTPN11* em 42,3% dos portadores de SN estudados. Pais de pacientes com SN com mutação que apresentam fenótipo normal não apresentaram mutação. Mutações no *PTPN11* não foram encontradas em pacientes com baixa estatura que possuíam estigmas em número insuficiente para o diagnóstico de SN. Não encontramos correlação entre presença de mutação e quaisquer características, além de pior resposta ao hGH em longo prazo no grupo com mutação no *PTPN11*.

ABSTRACT

Introduction: Noonan syndrome (NS) is a clinically heterogeneous disorder characterized by proportionate postnatal short stature, dysmorphic facial features, chest deformities and congenital heart disease (most commonly pulmonary valve stenosis and hypertrophic cardiomyopathy). This is a common autosomal dominant syndrome, with an estimated incidence of 1:1000–2500 live births. Recently, *PTPN11* (Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 11), which encodes for SHP-2 (Src Homology region 2-domain Phosphatase 2), was identified as one of the genes associated to NS. *PTPN11* gene mutations have also been detected in multiple lentigines/LEOPARD syndrome and Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome. The clinical and genetic heterogeneity of these disorders suggest a possible relation between different *PTPN11* gene mutations and distinct clinical features. Short stature is one of the most constant features of NS, and there are some short children that present some signs related to NS without fulfilling the whole diagnostic criteria. We hypothesized that these children could bear less intense mutations and could be at one milder end of the spectrum of NS. Objective: 1) to evaluate the presence of mutations in the *PTPN11* gene in patients with well-characterized NS, and perform clinical-molecular correlation; 2) to investigate mutations in the parents of mutation-positive Noonan syndrome patients; 3) to search mutations in this gene in short children that presented signs related to NS. Patients and methods: DNA from peripheral blood leukocytes was extracted from three groups: patients diagnosed as NS based on van der Burgt criteria (26), parents of NS patients that bore mutations (12) and children with short stature and at least two signs associated to

NS (42). We studied the *PTPN11* gene of the patients, amplifying exons 1-15 using specific intronic primers, followed by direct sequencing. Results: In the NS group, we found seven missense mutations in eleven patients: N58D, G60A, D61N, Y63C, A72G, N308D e M504V. We did not identify mutations on the parents of NS patients that had the genetic changes. No allelic variants were found in the coding region of the *PTPN11* gene in any of the children with ISS. The only statistically significant difference between groups with and without mutations was response to long term use of hGH, better on the mutation-negative group. Conclusion: We conclude that missense mutations were identified in 42.3% of the NS patients. Parents of NS mutation-positive patients did not present mutations, as well as children with short stature and insufficient number of signs for the diagnosis of NS. There were no correlations between the presence of mutations and any clinical characteristics, besides long-term response to hGH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática do <i>PTPN11</i> e dos domínios da proteína SHP-2, codificada por esse gene	23
Figura 2.	Representação cristalográfica da proteína SHP-2	30
Figura 3	Transcrição de sinal do GH	32
Figura 4	Sinalização via IGF-I	34
Figura 5	Representação da visualização em gel de agarose da amplificação do exon 8 do gene <i>PTPN11</i>	49

Figura 6	Representação das mutações e polimorfismos exônicos encontrados nos pacientes com SN, sua localização no gene <i>PTPN11</i> e o correspondente domínio na proteína SHP2	58
Figura 7	Velocidade de crescimento dos pacientes com SN antes de iniciar o tratamento e no primeiro, segundo e terceiro anos de tratamento.....	59
Figura 8	Z da altura dos pacientes com SN após o primeiro, segundo e terceiro anos de tratamento com hGH	60
Figura 9	Ganho de Z de altura no primeiro, segundo e terceiro anos de tratamento com hGH nos portadores de SN com (colunas claras) e sem mutação (colunas escuras) no <i>PTPN11</i>	65
Figura 10	Elevação dos níveis de IGF-I após o primeiro ano de tratamento com hGH em portadores de SN com e sem mutação no <i>PTPN11</i>	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Sinais associados à síndrome de Noonan	20
Quadro 2.	Critérios de van der Burgt <i>et al</i> para diagnóstico da síndrome de Noonan	21
Quadro 3.	Mutações já descritas no gene <i>PTPN11</i> e as enfermidades com as quais se associam	25
Quadro 4.	Resumo dos principais estudos do <i>PTPN11</i> em diversos quadros síndrômicos	26
Quadro 5.	Exames a que foram submetidos os pacientes com baixa estatura idiopática.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Estudos avaliando a resposta de pacientes com SN ao hGH ..	22
Tabela 2 -	Pares de <i>primers</i> para amplificação do <i>PTPN11</i>	46
Tabela 3 -	Características auxológicas dos pacientes com SN	54
Tabela 4 -	Estigmas presentes nos pacientes com SN	55
Tabela 5 -	Níveis de GH, IGF-I e IGFBP-3 dos pacientes com SN	56
Tabela 6 -	Mutações no gene <i>PTPN11</i> nos pacientes com SN	57
Tabela 7	Variantes alélicas no gene <i>PTPN11</i> nos pacientes com SN.....	57
Tabela 8 -	Características dos pacientes com SN com mutação no gene <i>PTPN11</i>	62
Tabela 9 -	Comparação do fenótipo de portadores de SN com e sem mutação no <i>PTPN11</i>	63
Tabela 10 -	Aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes com SN tratados com hGH com e sem mutações no gene <i>PTPN11</i>	64
Tabela 11 -	Características auxológicas dos pacientes com BEI	68
Tabela 12 -	Fenótipo dos pacientes com BEI	69
Tabela 13 -	Prevalência de combinações de estigmas da SN em pacientes com BEI	70
Tabela 14 -	Níveis de GH basal e após estímulo, IGF-I e IGFBP-3 nos pacientes com BEI	71

LISTA DE ABREVIATURAS

A	altura
AA	altura-alvo
BE	baixa estatura
BEI	baixa estatura idiopática
CIA	comunicação inter-atrial
CFC	síndrome cardio-face-cutânea
C-SH2	domínio SH2 carboxi-terminal
DGH	deficiência de hormônio de crescimento
EP	estenose pulmonar
DP	desvio-padrão
GH	<i>growth hormone</i> (hormônio de crescimento)
GHR	<i>GH receptor</i> (receptor de GH)
GnRHa	análogo de hormônio liberador de gonadotrofinas
IGF-I	<i>insulin-like growth factor type 1</i> (fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1)
IGF-IR	receptor de IGF-I
IMC	índice de massa corpórea
JAK2	Janus kinase 2
LMA	leucemia mielóide aguda
LMMJ	leucemia mielomonocítica juvenil
MCH	miocardiopatia hipertrófica

N-SH2	domínio SH2 amino-terminal
P	peso
Pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIG	pequeno para idade gestacional
PTP	domínio tirosinofosfatase
PTPN11	<i>protein tyrosinephosphatase non-receptor 11</i>
PVM	prolapso de valva mitral
SH2	domínio <i>Src-homology 2</i>
SHOX	<i>short stature homeobox-containing gene</i>
<i>SHP-2</i>	<i>SH2-containing tyrosine phosphatase 2</i>
SL	síndrome LEOPARD
SMD	síndrome mielodisplásica
SN	síndrome de Noonan
VC	velocidade de crescimento
Z	score de desvio-padrão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Síndrome de Noonan.....;	19
1.2 PTPN11.....	23
1.3 Proteínas Tirosinofosfatases.....	28
1.3.1 SHP-2.....	28
1.4 Sinalização via GHR e controle pela SHP-.....	33
1.5 Sinalização do IGF-I-R e sua regulação pela SHP-2.....	32
1.6 PTPN11 e Baixa Estatura Idiopática.....	35
2 OBJETIVOS.....	38
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	40
3.1 Pacientes.....	41
3.1.1 Grupo 1: Portadores de SN.....	41
3.1.2 Grupo 2: Pais de portadores de SN com mutações no <i>PTPN11</i>	42
3.1.3 Grupo 3: Crianças com BEI.....	42
3.1.3 Grupo 4: Grupo controle com estatura normal.....	43
3.2 Métodos.....	44
3.2.1 Dosagem hormonal	44
3.2.2 Estratégia para o Estudo Molecular.....	44
3.2.2.1 Extração do DNA Genômico de Linfócitos Periféricos.....	45
3.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	46

3.2.2.3 Seqüenciamento Automático.....	47
3.2.2.4 Rastreamento da variante alélica IVS7 -21 C>T	48
3.2.2.5 Análise computacional.....	49
3.2.3 Tratamento com hGH	50
3.3 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Grupo 1: Portadores de SN.....	53
4.1.1 Características clínicas.....	53
4.1.2 Características hormonais.....	56
4.1.3 Características genéticas.....	57
4.1.4 Resposta ao tratamento com hGH.....	58
4.1.5 Comparação do fenótipo dos pacientes com e sem mutação no <i>PTPN11</i>	60
4.2 Grupo 2: Pais de portadores de SN com mutações no <i>PTPN11</i>	66
4.2.1 Características clínicas.....	66
4.2.2 Características genéticas.....	66
4.3 Grupo 3: Crianças com BEI.....	67
4.3.1 Características clínicas.....	67
4.3.2 Características laboratoriais.....	70
4.3.3 Características genéticas.....	72
4.4 Estudo do polimorfismo IVS7 -21 C>T.....	72
5 DISCUSSÃO.....	73
6 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	85

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome de Noonan

A Síndrome de Noonan (SN), entidade reconhecida desde 1963¹, é caracterizada por alterações dismórficas, com grande variedade de expressão fenotípica e ocorre numa frequência estimada de 1:1250 - 1:1000 nascidos vivos, sem distinção de sexo². Classicamente, os pacientes apresentam baixa estatura proporcionada, fácies característica (face triangular, hipertelorismo, fenda palpebral voltada para baixo, epicanto, ponte nasal baixa e larga, orelhas de implantação baixa e hélice espessada, pescoço alado), deformidade torácica (*pectus excavatum* e/ou *carinatum*, hipertelorismo mamilar), cardiopatia congênita (estenose valvar pulmonar, cardiomiopatia hipertrófica), além de outras alterações menos frequentes (déficit visual ou auditivo, discreto retardo mental, hepatoesplenomegalia, distúrbios de coagulação e criptorquidia)³ (Quadro 1). A puberdade ocorre espontaneamente, mas frequentemente é atrasada e de curta duração, com rápido avanço da idade óssea⁴. A baixa estatura é um aspecto marcante dessa síndrome. Esse sinal foi bem caracterizado em pacientes com SN provenientes de uma população alemã, na qual a altura adulta observada foi em média 162,5 cm (-2,5 DP) no sexo masculino e 153 cm (-2,1 DP) no feminino⁴.

	SINAIS
CRESCIMENTO	Baixa estatura de início pós-natal
DESENVOLVIMENTO MENTAL	Atrasado, dificuldade de aprendizado.
FACE	Face triangular, hipertelorismo, epicanto, ptose palpebral, ponte nasal baixa e larga, fendas palpebrais oblíquas direcionadas para baixo, miopia, exoftalmo, ceratocone, estrabismo, nistagmo, implantação baixa e/ou anormalidades dos pavilhões auriculares, má-oclusão dentária anterior, aumento da amplitude da boca, lábio superior proeminente e protruso, retrognatia moderada.
PESCOÇO	Pescoço curto ou alado, implantação baixa de cabelos.
TÓRAX	Tórax em escudo, <i>pectus excavatum</i> ou <i>carinatum</i> , hipertelorismo mamilar.
ANORMALIDADES ESQUELÉTICAS	Cúbito valgo, anormalidades da coluna.
CORAÇÃO	Estenose valvar pulmonar, hipertrofia ventricular, defeitos septais, persistência do canal arterial, estenose de ramos de artérias pulmonares, outros defeitos cardíacos, alterações do ECG.
GENITALIA	Criptorquidia, micropenis.
DIÁTESES HEMORRÁGICAS	Anormalidades da via intrínseca da coagulação (deficiência parcial de fatores XI, XII e VII, doença de Von Willebrand e trombocitopenia)

Quadro 1. Sinais associados à síndrome de Noonan³

Os critérios clínicos para o diagnóstico da SN foram propostos por van der Burgt *et al* em 1994⁵ (Quadro 2). O autor, analisando nove portadores de SN pertencentes a uma mesma família, simplificou e aperfeiçoou o sistema de pontuação existente até então para o diagnóstico da síndrome⁶. Devido à grande variabilidade fenotípica, e ao fato de que as características faciais podem se atenuar com o tempo, o diagnóstico torna-se difícil em casos mais leves⁷.

CARACTERÍSTICAS	A= MAIORES	B= MENORES
1. FACIAIS	Típica	Sugestiva
2. CARDÍACAS	Estenose valvar pulmonar Miocardiopatia hipertrófica	Outras
3. ALTURA	< 3º percentil	< 10º percentil
4. TORÁCICAS	<i>Pectus carinatum</i> e/ou <i>excavatum</i>	Alargado
5. HISTÓRIA FAMILIAR	Parente de 1º grau com diagnóstico definitivo	Parente de 1º grau com diagnóstico sugestivo
6. OUTROS: Retardo mental Criptorquidia Displasia linfática	Todos	Qualquer

Quadro 2. Critérios de van der Burgt *et al* para diagnóstico da Síndrome de Noonan⁵

Face típica: face triangular, fenda palpebral oblíqua, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, pavilhão auricular malformado e de implantação baixa, micrognatia, pescoço alado.

Diagnóstico Definitivo:

1A + um de 2A a 6A ou dois de 2B a 6B

1B + dois de 2A a 6A ou três de 2B a 6B

A causa da baixa estatura na SN ainda não está definida, mas sua severidade não está relacionada com a presença de defeitos cardíacos⁸. Os pacientes não apresentam deficiência de hormônio de crescimento (**Growth Hormone**: GH), embora haja relatos de comprometimento do eixo GH/IGF-I. Alguns pacientes têm nível médio de GH noturno diminuído, embora a resposta aos testes de estímulo seja habitualmente normal^{9,10}. Além disso, os níveis de IGF-I são baixos ou próximos do limite inferior da normalidade^{9,10}. A resposta ao tratamento com GH é intermediária entre a dos pacientes com deficiência de hormônio de crescimento (DGH) e com síndrome de Turner, sugerindo que a insensibilidade ao GH possa ter papel na baixa estatura característica dessa síndrome⁹⁻¹⁶.

Tabela 1 - Estudos avaliando a resposta de pacientes com SN ao hGH

Autor	n	Δ VC (1º ano-basal)	Δ Z altura (pós-pré) hGH	Tempo (anos)	Dose
Ahmed ⁹	6	2,6	ND	1	0,07 U/kg/d
Noordam, ¹⁰	37	ND	0,2	3	0,15 U/kg/d
Thomas, ¹¹	5	ND	0,9	3	ND
Romano, ¹²	150	3,7	1,2	4	0,10 U/kg/d
Cotterill, ¹³	30	4,0	0,7	1	0,07 U/kg/d
DeSchepper, ¹⁴	23	4,0	0,5	1	0,15 U/kg/d
Kirk, ¹⁵	66	2,3	0,6	6	0,09 U/kg/d
Mc Farlane, ¹⁶	23	4,0	0,8	3	0,10 U/kg/d
Ogawa, ¹⁷	14	5,2	0,6	2	0,07 U/kg/d
Noordam, ¹⁸	25	ND	0,8	2	0,15 U/kg/d

hGH= GH recombinante humano; VC= velocidade de crescimento (cm/ano).

Diversos estudos indicam que o tratamento a curto-prazo (1-4 anos) com hGH é capaz de aumentar a velocidade de crescimento e melhorar o Z da altura^{4,9,13,15}. (Tabela 1). Entretanto, não há dados suficientes a respeito dos resultados a longo-prazo e efeitos na altura final das crianças com SN tratados com hGH.

Alguns dos pacientes descritos por Noonan apresentavam outros membros da família afetados com características semelhantes, o que sugeria origem genética para essa síndrome¹⁹. A descrição de novos casos permitiu categorizar a herança da SN como autossômica dominante²⁰, embora já tenha havido suposição de herança autossômica recessiva, por identificação de filhos afetados com pais consangüíneos aparentemente normais²¹. Estudos de associação realizados em famílias afetadas relacionou o fenótipo de SN à região 12q2.2-q ter²². Estudos iniciais procurando mutações em alguns genes já conhecidos contidos nesse intervalo (MYL2, DCN, EPS8, RPL6) não demonstraram associação dos mesmos com a SN²³. Somente em 2001, conseguiu-se relacionar essa doença com mutações em um gene, o *PTPN11*, localizado nessa região²⁴.

1.2 *PTPN11*

O gene *PTPN11* (*protein tyrosinephosphatase non-receptor 11*) (MIM 163950) localiza-se no braço longo do cromossomo 12 (12q2.4)²⁵, tem 2768 pb de extensão, sendo 1779 pb responsáveis por sua região codificadora que se encontra dividida em 15 exons e codifica a proteína tirosinofosfatase SHP-2 (*Src Homology region 2-domain Phosphatase 2*). O exon 1 codifica a região 3' não-traduzida, os exons 2 e 3, o domínio SH-2 amino-terminal (N-SH2), os exons 4 e 5, o domínio SH-2 carboxi-terminal (C-SH2), os exons de 6 a 13, o domínio tirosinofosfatase (PTP) e os exons 14 e 15 codificam a região carboxi-terminal (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do gene *PTPN11* e dos domínios da proteína SHP-2, codificada por esse gene.

Em 2001, Tartaglia *et al* identificaram mutações no gene *PTPN11* em cerca de 50% dos pacientes portadores da SN²⁴. Essas mutações, todas *missense* em

heterozigose, agrupam-se em aminoácidos muito conservados e predizem a geração de uma SHP-2 constitucionalmente ativada²⁴. Em todos os casos familiares, as mutações co-segregaram completamente com a doença.

Em um segundo estudo, os mesmos autores avaliaram um total de 119 pacientes (70 esporádicos e 49 familiares), com encontro de mutações em 59% dos casos familiares e em 37% dos esporádicos²⁶. Ao avaliar os familiares dos casos esporádicos de SN quanto à presença de mutações no *PTPN11*, observou-se que um progenitor apresentava a mesma mutação encontrada no paciente sem, porém, apresentar o fenótipo da doença²⁶. Essa situação sugere a possibilidade de que haja indivíduos com mutação no gene *PTPN11* que não manifestem a doença. Foram caracterizados como regiões *hot spot* do *PTPN11* os exons 3 e 8, por representarem, respectivamente, maior diversidade e maior frequência de mutações. A partir desses trabalhos iniciais, outros grupos estudaram esse gene. A compilação desses dados encontra-se no Quadro 3.

Em conjunto, todos os estudos publicados até a presente data identificaram mutações do *PTPN11* em um terço dos pacientes com SN, variando de 26,5 a 37% nos casos esporádicos e de 50 a 100%, nos familiares (Quadro 4). Os exons 3, 7, 8 e 13 foram regiões *hot spot* por concentrarem 86,7% das mutações descritas^{24,26-43}. As mutações Asp61Gly, Tyr63Cys, Thr73Ile e Gln79Arg no exon 3, e a Asn308Asp no exon 8 foram as mais prevalentes^{24,26-33,37-39}. Todas elas tornam a proteína mais ativa, aumentando a sua atividade tirosina fosfatase, fato comprovado nos estudos funcionais *in vitro*³².

Exon	Troca de Nucleotídeo	Troca de Aminoácido	Domínio	Doença relacionada	Referências
1	C5T	Thr2Ile	NH2	SN	24
2	A124G	Thr42Ala	N-SH2	SN	24,28,29,30
3	A172G	Asn58Asp	N-SH2	SN	29
	C174G	Asn58Lys		SN	31
	G179C	Gly60Ala		SN	26
	G179T	Gly60Val		SMD	32
	179-181GTGdel	del60G		SN	30
	G181A	Asp61Asn		SN	26,31
	G181T	Asp61Tyr		LMMJ	32
	A182G	Asp61Gly		SN	24,26,29,30,31,33
	A182T	Asp61Val		LMMJ/SMD	32
	T184G	Tyr62Asp		SN/SN+LMMJ/SN	26,29,30,31,32,35
	A188G	Tyr63Cys		SN	24,26,29,30,31,33,35
	G205C	Glu69Gln		SN	29,31
	G205A	Glu69Lys		LMMJ/SMD	32
	T211C	Phe71Leu		SN	31
	TTT211-213AAA	Phe71Lys		LMA	32
	T213A	Phe71Leu		SMD	31
	G214T	Ala72Ser		SN	24,29,33
	G214A	Ala72Ser		SN/LMMJ	31,32
	C215G	Ala72Gly		SN	24,26,29,35
	C215T	Ala72Val		LMMJ	32
	C218T	Thr73Ile		SN/SN+LMMJ/BE+EP+LMM	26,29,30,31,32,33,,36
	G226A	Glu76Lys		LMMJ	32
	A227T	Glu76Val		LMMJ	32
	A227G	Glu76Gly		LMMJ	32
	A227C	Glu76Arg		LMMJ/SMD	32
	G228C	Glu76Asp		SN	24,26,29
	G228T	Glu76Asp		SN	31
	A236G	Gln79Arg		SN	24,26,29,30,31,37
	A236C	Gln79Pro		SN	38
	A317C	Asp106Ala		SN	24,38
	A329C	Glu111Ala		SN	29
4	G417C	Glu139Asp	C-SH2	SN	26
	G417T	Glu139Asp		SN	26
	G417A	Glu139Asp		SN	31
7	A767G	Gln256Arg	PTP	SN	31
	A836G	Tyr279Cys		SN/SL	26,28,35,30,39,40
	A836C	Tyr/279Ser		SL	40
	A844G	Ile282Val		SN	24,26,31
	T853G	Phe285Leu		SN	26,29
8	T854C	Phe285Ser	PTP	SN	26,27,29,30
	A922G	Asn308Asp		SN	24,26,29,30,31,32,35,36
	A923G	Asn308Ser		SN	26,29,35
	A925G	Ile309Val		SN	26
12	T1232G	Thr411Met	PTP	SN	41
	G1391C	Gly464Ala		SL	27
	C1403T	Thr468Met		SN/SL	29,31,35,40
13	G1502A	Arg501Lys	PTP	SN	32
	T1504A	Ser502Thr		SN	30
	G1507C	Gly503Arg		SN/BE+EP+LMMJ	29,32
	G1508C	Gly503Arg		LMMJ/SN	32,35
	A1510G	Met504Val		SN	24,26,29,31
	A1529C	Gln510Pro		SL/SL	40,42
14	C1678T	Leu560Phe	COOH	SN	35

Quadro 3. Mutações já descritas no *PTPN11* e as enfermidades com as quais se associam
 NH2= região amino-terminal; SN= Síndrome de Noonan; N-SH2= domínio SH2 amino-terminal;
 SMD= síndrome mielodisplásica; LMMJ= leucemia mielomonocítica juvenil; LMA= leucemia
 mielóide aguda; BE= baixa estatura; EP= estenose pulmonar; C-SH2= domínio SH2 carboxi-
 terminal; PTP= domínio tirosinofosfatase; SL= síndrome de LEOPARD; SNL=síndrome Noonan-
 like/lesão de múltiplas células gigantes; COOH= região carboxi-terminal

Autor	N (fam/esp)	Diagnostico	% mutação	Observações relevantes
Tartaglia, 2001 ²⁴	29 (18/11)	SN	50	Estudo original.
Tartaglia, 2002 ²⁶	119 (40/70)	SN	45	Associação de mutações com EP, maior prevalência em casos familiares.
Kosaki, 2002 ³³	21 (2/19)	SN	33	Primeira em japoneses.
Maheshwari, 2002 ³¹	16 (fam)	SN	50	Associação de mutações com EP.
Musante, 2002 ²⁸	96 (28/68)	SN	29	Associação de mutações com EP.
Legius, 2002 ³⁹	3 (2/1)	SL	100	Mutação em SL diferente das encontradas em SN.
Digiglio, 2002 ³⁷	9 (2/7)	SL	89	Mutações associadas à manifestação cutânea.
		SN + mancha café com leite	100	
Ion, 2002 ⁴⁶	28	CFC	0	Excluído o <i>PTPN11</i> como causa da CFC.
Sarkozy, 2003 ⁴⁴	20 (4/16)	EP congênita não-sindrômica	0	Excluído o <i>PTPN11</i> como causa de EP não-sindrômica.
Kavamura, 2003 ⁴⁵	10	CFC	0	Excluído o <i>PTPN11</i> como causa da CFC.
Trogger, 2003 ⁴⁷	18	SC	0	Excluído o <i>PTPN11</i> como causa da SC.
Tartaglia, 2003 ⁴⁸	27	SC	0	Excluído o <i>PTPN11</i> como causa da SC.
Schollen, 2003 ³⁵	10 (fam)	SN familiar	100	Grande família com aspectos SN e CFC.
Loh, 2003 ³⁴	49	LMMJ	33	Mutações somáticas no <i>PTPN11</i> .
	60	Outras malignidades hematológicas	0	
Tartaglia, 2003 ³²	145	Distúrbios mielóides diversos	23	Mutações somáticas no <i>PTPN11</i> .
Zenker, 2004 ²⁹	57 (9/48)	SN	60	Associação de mutações com EP, baixa estatura, deformidade torácica.
Sarkozy, 2004 ²⁷	71	SN	48	Mutações distintas causam SN e SL.
	13	SL	85	
Yoshida, 2004 ³⁰	45	SN	40	Associação de mutações com EP
Keren, 2004 ⁴⁰	15	SL	88	Mutações específicas para SL
Digiglio, 2004 ³⁸	2	SL/CMH	100/0	Sem associação com CMH
Conti, 2003 ⁴³	1	SL	100	Associação com SL

Quadro 4. Resumo dos principais estudos do *PTPN11* em diversos quadros síndrômicos

SN= síndrome de Noonan; CFC= síndrome cardio-facio-cutâneo; SL= síndrome LEOPARD; SC= síndrome de Costello; EP= estenose pulmonar; LMMJ= leucemia mielomonocítica juvenil; CMH= cardiomiopatia hipertrófica; fam= casos familiares; esp= casos esporádicos.

As relações genótipo-fenótipo que puderam ser feitas sugerem que mutações diferentes devem ter efeitos distintos (Quadro 4). A correlação mais encontrada foi com a cardiopatia congênita²⁶. A estenose valvar pulmonar foi estatisticamente mais freqüente no grupo que apresentava mutação no *PTPN11*, enquanto a miocardiopatia hipertrófica era significativamente menos freqüente nesse mesmo grupo²⁶. Sarkozy e cols referiram maior proporção de baixa estatura nos pacientes com mutações²⁷.

Alguns estudos analisaram o *PTPN11* em doenças que possuem estigmas clínicos que se sobrepõem aos da SN. Em portadores de síndrome cardio-face-cutânea (CFC) e de síndrome de Costello, nenhuma alteração foi encontrada, o que sugere etiologias diferentes para essas doenças⁴⁴⁻⁴⁸. Por outro lado, nos pacientes com síndrome de LEOPARD (**L**entigines múltiplas, **a**normalidades **E**letrocardiográficas de condução, **h**ipertelorismo **O**cular, **e**stenose **P**ulmonar, **A**normalidades de genitália, **R**etardo de crescimento, **s**urdez - *Deafness*) identificaram-se mutações que se agrupavam no domínio PTP e não se repetiram nos pacientes com SN, exceto naqueles que apresentavam lesões cutâneas^{34,39}.

Portanto, podemos verificar a grande variação fenotípica dos pacientes portadores de mutações no *PTPN11*. Essa constatação sugere que entidades anteriormente consideradas diferentes podem ser na realidade manifestações de alterações no mesmo gene.

1.3 Proteínas Tirosinofosfatases

A regulação da resposta aos sinais extracelulares tem papel fundamental em todos os eventos das células eucariotas. Uma importante via de regulação é o controle do conteúdo de tirosinas fosforiladas de proteínas intracelulares específicas, através do equilíbrio dinâmico exercido por dois grupos de enzimas com atividades antagônicas: as tirosinoquinases, responsáveis pela anexação de ésteres de fosfato nos resíduos de tirosina (fosforilação) e as tirosinofosfatases, responsáveis pela hidrólise desses ésteres (desfosforilação).

As tirosinofosfatases são um grupo pleomórfico de moléculas que podem ser divididas em 2 categorias: transmembranasas (ou *receptor-like*) e intracelulares (ou *non-receptor*)⁴⁹. Incluídas nesta última categoria, estão duas tirosinofosfatases que possuem domínios SH2 na sua porção amino-terminal, SHP-1 e SHP-2. Esses domínios SH2 (***Src-homology 2***, onde Src significa ***Santonin-related complex*** por sua relação estrutural com uma proteína de origem vegetal chamada *santonin*⁵⁰) permitem identificação e ligação com resíduos específicos de tirosina fosforilados.

1.3.1 SHP-2

A SHP-2⁵¹, anteriormente conhecida como Syp⁵², SHPTP-2⁵³, SHPTP-3, PTP2C ou PTP1D⁵⁴, é membro de uma família de tirosinofosfatases

caracterizadas por dois domínios SH2 (N- e C-SH2) agrupados na porção amino-terminal e um domínio catalítico (PTP) na porção carboxi-terminal. A SHP-2 tem expressão ubíqua em tecidos de vertebrados sendo encontrada no sistema imune (medula óssea, baço e timo), glândulas (pâncreas, fígado e próstata), pulmões, rins, medula espinhal e, especialmente, no coração, cérebro e músculo esquelético⁵¹.

A molécula da SHP-2 possui três domínios (Figura 1). O domínio catalítico é conhecido como domínio tirosinofosfatase (PTP) composto por 240 aminoácidos. Pode ser reconhecido pelo *signature motif* C(X)5R (C= Cisteína; X= qualquer aminoácido; R= Arginina), comum a todas as tirosinofosfatases. Os outros dois domínios, denominados N-SH2 e C-SH2, com 100 aminoácidos cada, apresentam 50% de homologia entre si. Eles são responsáveis pela ligação da SHP-2 às tirosinas fosforiladas que estejam dentro da sequência de reconhecimento ψ -X-Yp- ψ -X- ψ (ψ = aminoácido hidrofóbico; X= qualquer aminoácido; Yp= tirosina fosforilada)⁵⁵. Além desses, existe na cauda carboxi-terminal dois sítios de tirosinofosforilação, a saber, Y546 e Y584. Através desses sítios, a SHP-2 também pode funcionar como molécula adaptadora e amplificadora do sinal de alguns receptores⁵⁶.

A estrutura cristalográfica da proteína SHP-2 inativa revela um arranjo fechado, no qual os dois domínios SH2 contornam o domínio PTP⁵⁷ (Figura 2). O domínio N-SH2 tem ligação intramolecular com o domínio PTP, exercendo bloqueio sobre esse sítio. O domínio C-SH2 não tem interconexão significativa com os domínios N-SH2 ou PTP. Os sítios de ligação às tirosinas fosforiladas de

ambos domínios SH2 estão totalmente expostos na superfície da molécula, do lado oposto ao da ligação com o domínio PTP.

Figura 2. Representação cristalográfica da proteína SHP-2⁵¹

O domínio PTP tem arquitetura mista, com nove α hélices e 14 fitas β . Dez das 14 fitas β formam uma fita β mista paralela-antiparalela que envolve a hélice α E. As hélices α A, B, F, G, H, I, J agrupam-se do lado oposto dessa fita β (Figura 2). Os resíduos da *signature motif* estão na β M e α G, e alça MG. O domínio PTP contém todos os resíduos necessários para tirosina desfosforilação, incluindo a

cisteína essencial (Cys 459) que realiza o “ataque” nucleofílico no fosfato do seu substrato^{58,59}.

A ligação dos domínios SH2 aos substratos (tirosinas fosforiladas) causa reorganização conformacional, desfazendo a ligação intramolecular e desbloqueando o domínio catalítico^{55,57}. Os domínios SH2 têm função principalmente regulatória, e sua remoção resulta em aumento da atividade tirosina fosfatase de 12 a 45 vezes²⁵.

A SHP-2 tem papel crítico na embriogênese, uma vez que embriões de ratos *knock-out* para o gene responsável por esta proteína apresentam letalidade embrionária precoce⁶⁰. Na célula, a SHP-2 está envolvida no mecanismo de sinalização por receptores tirosinoquinases e receptores de citocinas. Além da atividade tirosinofosfatase, ela pode agir como proteína adaptadora através da fosforilação das tirosinas Y546 e Y584, na sua porção amino terminal, o que permite a formação de sítio de acoplamento para outras moléculas que possuam domínios SH2. Ambas as funções, molécula adaptadora e tirosinofosfatase, são relevantes e podem ter efeito direto positivo ou negativo nas cascatas de sinalização⁶¹.

1.4 Sinalização via GHR e controle pela SHP-2

O GH realiza as suas ações através de um receptor de membrana pertencente à superfamília dos receptores de citocinas, o GHR. O GHR não

apresenta atividade enzimática intrínseca necessitando estar associado na sua porção intracitoplasmática a uma proteína com atividade de tirosinoquinase, conhecida como JAK2 (Janus quinase 2), para que ocorra a transdução do sinal intracelular. O primeiro e crucial passo da transdução do sinal do GH consiste na sua ligação a dois GHR que se encontram pré-dimerizados na superfície celular⁶². A ligação do GH causa alteração na conformação espacial da porção intracitoplasmática do GHR promovendo a interação entre as JAK2. Esta proximidade entre duas JAK2 faz com que elas fosforilem reciprocamente os resíduos de tirosina localizados nos seus domínios quinase. Uma vez fosforilada, a JAK2 passa a fosforilar múltiplos resíduos de tirosina presentes no GHR, gerando sítios de acoplamento para outras moléculas sinalizadoras que contenham domínios SH2. Assim, são ativadas diversas vias de sinalização comuns a vários receptores com atividade quinase. Por essas múltiplas vias de sinalização intracelular, o GH promove suas ações metabólicas e proliferativas (Figura 3).

Figura 3. Transcrição de sinal do GH.

A SHP-2 é uma das moléculas citoplasmáticas que contém domínios SH2. Ao se acoplarem às tirosinas fosforiladas do GHR ativado, esses domínios desfazem a ligação intramolecular da SHP-2 e desbloqueiam seu sítio ativo. Dessa forma, a SHP-2 encontra-se pronta para desfosforilar tirosinas no GHR e na JAK2. O GHR precisa estar fosforilado para manter-se ativo; então, a desfosforilação interrompe o sinal. Diversos estudos vêm demonstrando esse efeito negativo da SHP-2 sobre a transdução do sinal via GHR-JAK2^{63,64}. Assim, essa enzima participa no controle do funcionamento do GHR. Essa alternância é necessária para que a sinalização do GH seja transitória.

1.5 Sinalização do IGF-IR e sua regulação pela SHP-2

Muitas das ações promotoras de crescimento do GH são mediadas pela ação do IGF-I que é produzido principalmente no fígado sob a regulação do GH. Na cartilagem de crescimento, tanto o IGF-I produzido localmente quanto o circulante são importantes. Os IGFs exercem suas ações pela interação com dois tipos de receptores denominados IGFR tipo 1 e tipo 2. A grande maioria das ações conhecidas do IGF-I e do IGF-II é mediada via receptor tipo 1 (IGF-IR). O IGF-IR é membro da família de receptores de fator de crescimento tirosinoquinase e apresenta estrutura semelhante ao receptor da insulina. Trata-se de uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades α e duas subunidades β que possuem na porção intracitoplasmática uma região com atividade tirosinoquinase intrínseca responsável pela ativação de diversas vias de sinalização que regulam a proliferação celular.

A ligação de IGF-I com seu receptor ativa sua ação quinase e resulta em autofosforilação de diversos resíduos de tirosina intracelulares⁶⁵. A fosforilação gera sítios de ligação de alta afinidade para moléculas sinalizadoras necessárias para iniciar a transdução do sinal e manter as respostas biológicas que se seguem: migração e proliferação celulares, e síntese proteica⁶⁶. Uma dessas moléculas é a SHP-2, que é recrutada do citosol para a membrana celular, subsequentemente ligando-se ao IGF-IR, o que resulta na desfosforilação do receptor. Esse mecanismo regulatório atenua a sinalização do receptor. Então, a

SHP-2 também exerce efeito regulador negativo nessa via de sinalização⁶⁶⁻⁶⁹ (Figura 4).

1.6 *PTPN11* e BAIXA ESTATURA IDIOPÁTICA

A baixa estatura é um motivo comum de encaminhamento de pacientes a uma unidade de endocrinologia pediátrica. Embora várias doenças possam ser responsáveis pelo comprometimento do crescimento linear, a maioria das crianças em investigação por déficit estatural não apresenta alterações clínicas ou laboratoriais que permitam identificar a causa da baixa estatura. Refere-se nesses casos à condição descrita como baixa estatura idiopática (BEI). Embora seja uma classificação insatisfatória, esta é uma designação de uso corrente que descreve crianças com altura < -2 DP, velocidade de crescimento normal ou baixa, peso ao nascimento normal e ausência de doença crônica, endocrinológica, esquelética ou

psicológica que expliquem a deficiência de crescimento. A BEI constitui um grande e heterogêneo grupo, onde se incluem crianças que apresentam baixa estatura familiar e atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento, nas quais fatores genéticos ainda desconhecidos podem estar envolvidos. Muitas dessas crianças também apresentam estigmas presentes em síndromes dismórficas associadas à baixa estatura, porém em número insuficiente para permitir incluí-las em um determinado grupo etiológico.

Síndromes que possuem amplo espectro de apresentação só são reconhecidas no seu quadro mais completo. Quadros clínicos mais leves serão diagnosticados apenas após a identificação de marcadores diagnósticos, sejam eles bioquímicos, citológicos ou genéticos. A síndrome de Leri-Weil é um exemplo dessa condição. Ela caracteriza-se por baixa estatura desproporcionada relativamente leve no início da infância que se acentua na adolescência, mesomelia (encurtamento do segmento médio das extremidades) e deformidade de Madelung em membros superiores (luxação dorsal da porção distal da ulna, com encurvamento do rádio). Seu diagnóstico dependia exclusivamente da observação clínica do paciente, até que, recentemente, esta síndrome foi associada à presença de mutações ou deleções do gene *SHOX*. O gene *SHOX* (***Short stature Homeobox – containing gene***) localiza-se na região pseudoautossômica (PAR1) dos cromossomos sexuais (X ou Y). Este gene é um membro da família de genes que contêm *homeobox*, estrutura responsável pela ligação da proteína SHOX ao DNA e que confere propriedade de regular a transcrição de genes alvo⁷⁰. Mutações de ponto e, mais frequentemente, deleções do gene *SHOX* foram relatadas em 80% dos pacientes com discondrosteose^{71,72} e

em 2 a 7% dos pacientes com BEI^{73,74}, com grande variabilidade fenotípica. Em pacientes com BEI, alterações genéticas foram identificadas inclusive em crianças que não apresentavam deformidades ósseas ou com alterações pouco evidentes^{74,75}. Dessa forma, vem se consolidando a importância do estudo do *SHOX* na investigação da baixa estatura.

A síndrome de Noonan, como descrito, é outra doença que possui estigmas característicos compondo seus critérios diagnósticos, apresenta grande variabilidade de expressão clínica e é associada a alterações no gene *PTPN11*. A proteína codificada por esse gene, a tirosinofosfatase SHP-2 controla negativamente algumas vias de sinalização de fatores de crescimento. Esse fato nos chamou a atenção para a possibilidade de que essa ação enzimática pudesse estar envolvida em casos de BEI. Dentro da variação fenotípica do gene *PTPN11*, poderia haver indivíduos sem estigmas suficientes para o diagnóstico da síndrome? Uma mutação com efeito mais leve poderia levar a uma forma mais discreta dessa síndrome? Para responder a essas dúvidas, decidimos estudar pacientes com SN, seus pais e crianças com baixa estatura idiopática que possuem alguns estigmas, mas não o suficiente para o diagnóstico de SN com base nos critérios de van der Burgt.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Estudar o gene *PTPN11* em pacientes com diagnóstico clínico de síndrome de Noonan.
2. Determinar se as mutações no *PTPN11* encontradas nos pacientes com síndrome de Noonan foram herdadas dos pais.
3. Estudar o gene *PTPN11* em crianças com baixa estatura e estigmas da síndrome de Noonan, em número insuficiente para atingir o escore para esse diagnóstico.
4. Comparar a frequência das variantes alélicas no gene *PTPN11* em crianças com baixa estatura idiopática *versus* um grupo controle de estatura normal.
5. Correlacionar os achados moleculares com as características fenotípicas e com a resposta ao tratamento com hormônio do crescimento recombinante humano na síndrome de Noonan.

PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Estudamos quatro grupos de indivíduos: crianças com SN, pais de pacientes com SN portadores de mutação no *PTPN11*, crianças com BEI com número de estigmas insuficiente para diagnóstico de SN e controles de estatura normal. Os pacientes ou seus responsáveis legais concederam seus consentimentos informados por escrito para realização do trabalho. O estudo foi aprovado pela comissão de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

3.1.1 Grupo 1: Pacientes com SN

Vinte e seis crianças com o diagnóstico de SN definido segundo os critérios clínicos de van der Burgt (Quadro 2) acompanhados na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP foram selecionados para o estudo. Todos foram submetidos à avaliação laboratorial de rotina para avaliação de indivíduos com baixa estatura.

3.1.2 Grupo 2: Pais de pacientes com SN portadores de mutações no *PTPN11*

Para determinar se as mutações no *PTPN11* foram herdadas, estudamos doze progenitores de sete pacientes com SN que possuíam mutações no *PTPN11* para exame clínico e análise molecular. Dez desses indivíduos compunham cinco casais, e dois eram mães de cujos cônjuges não dispúnhamos de amostras de DNA para o estudo.

3.1.3 Grupo 3: Crianças com BEI e estigmas de SN

Foram selecionadas 42 crianças entre as 241 atendidas por BEI no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP, segundo os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão:
 1. Estatura dois desvios-padrão abaixo da média da curva de crescimento normal⁷⁶.
 2. Presença de pelo menos dois sinais associados à SN (Quadro 1), sem preencher os critérios diagnósticos.

- Critérios de exclusão

Presença de distúrbios genéticos ou cromossômicos, deficiência de GH⁷⁷, desnutrição, doenças crônicas, hepáticas, ósseas, endocrinológicas ou outras enfermidades que sabidamente comprometam o crescimento linear. Para isso, todos os pacientes foram avaliados clínica e laboratorialmente, sendo submetidos aos exames que constam na nossa rotina de investigação de crianças com baixa estatura (Quadro 5).

Exames	
Gerais	Hemograma completo, glicemia de jejum, uréia, creatinina, eletrólitos séricos (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺⁺ , P ⁻), proteínas totais e frações, AST, ALT, fosfatase alcalina, gasometria venosa, anticorpo anti-endomísio, IgA, pesquisa de elementos anormais e sedimentos na urina, exame protoparasitológico das fezes, cariótipo.
Hormonais	T4 livre, TSH; LH, FSH, estradiol ou testosterona; IGF-I, IGFBP-3; teste de estímulo farmacológico com clonidina para dosagem de GH.

Quadro 5. Exames a que foram submetidos os pacientes com baixa estatura idiopática.

3.1.3 Grupo 4: Grupo controle com estatura normal

Foi utilizado um grupo de 84 indivíduos com estatura normal, para determinar a frequência de variantes alélicas identificadas no *PTPN11*. De acordo com o desvio-padrão de altura, esse grupo foi subdividido em:

Normais altos: 0,7 a 2 DP (64 alelos)

Normais de estatura média: -0,7 a 0,7 DP (80 alelos)

Normais baixos: -0,7 a -2 DP (24 alelos)

3.2 Métodos

3.2.1 Dosagem hormonal

A dosagem do GH foi determinada através de método imunofluorométrico com anticorpos monoclonais (AutoDELFIA, Wallac, Turku, Finland). Os ensaios foram padronizados com o padrão internacional 80/505 da Organização Mundial de Saúde, e níveis de 0,1 a 38 ng/ml apresentaram coeficiente de variação interensaio menor do que 10%. Níveis de GH acima de 3,3 ng/ml excluía deficiência de GH, baseado em estudo de crianças normais realizado em nosso laboratório⁷⁷. Os níveis de IGF-I determinados por radioimunoensaio após extração com etanol (DSL, Webster, TX, USA) e comparados com os valores de referência do *Kit*. Os níveis de IGFBP-3 foram determinados por método imunorradiométrico (DSL, Webster, TX, USA). O coeficiente de variação interensaio foi <10% para níveis de IGF-I de 18 a 500 mg/l e para níveis de IGFBP-3 de 0,14 a 12 mg/dl.

3.2.2 Estratégia para o Estudo Molecular

O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico. Foi realizado o estudo de toda a região codificadora do gene *PTPN11*, através das técnicas de PCR e seqüenciamento direto, para identificação de possíveis mutações.

3.2.2.1 Extração do DNA Genômico de Linfócitos Periféricos

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos indivíduos arrolados na pesquisa ⁷⁸. 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 (NH₄Cl a 114 mM, NH₄HCO₃ 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 3000 rpm (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 este período, 3,6 ml de solução saturada de NaCl 6 M foi adicionada, seguido de agitação do conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm. 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 ressuspensão em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

3.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Em cada reação de PCR foram amplificados 100 a 300 ng do DNA genômico utilizando 200 µM de cada trifosfato de nucleotídeo (dNTP), 20 pmol/µl de cada *primer* específico, além do tampão (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50mM KCl), e *Taq* DNA polimerase 2,5 U (Pharmacia, Upsala, Sweden) para um volume final de 25µl. Para amplificação do exon 1, acrescentou-se 2,5µl de DMSO a 10%.

As seqüências dos pares de *primers* utilizados para a amplificação do exon 1 ao 15 estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Pares de *primers* para amplificação do *PTPN11*

Exon	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>	<i>Annealing</i>
1	AGGGGACGAGGAGGGAAC	GGGCAGCTGCACAGTCTC	67°C
2	ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG	CAGCAAGCTATCCAAGCATGGT	60°C
3	CGACGTGGAAGATGAGATCTGA	CACGTACCAAGTATATGCAGGAATG	60°C
4	GATTGATCAATCCCTTGGAGGAATG	GTCACCAGACCCAACGTGGTG	60°C
5	CTGCAGTGAACATGAGAGTGCTTG	GTTGAAGCTGCAATGGGTACATG	60°C
6	TGCATTAACACCGTTTTCTGT	GTCAGTTTCAAGTCTCTCAGGTC	54°C
7	GAACATTTCTCAGGATGAATTCC	GGTACAGAGGTGCTAGGAATCA	56°C
8	GACATCAGGCAGTGTTACGTTAC	CCTTAAAGTTACTTTCAGGACATG	57°C
9	GTAAGCTTTGCTTTTCACAGTG	CTAAACATGGCCAATCTGACATGTC	56°C
10	GCAAGACTTGAACATTTGTTTGTTGC	GACCCTGAATTCTACACACCATC	60°C
11	CAAAAGGAGACGAGTTCTGGGAAC	GCAGTTGCTCTATGCCTCAAACAG	60°C
12	GTCCCAAAGAGTAGACATTGTTTC	GACTGTTTTCTGAGCACTTTC	56°C
13	CAACACTGTAGCCATTGCAACA	CGTATCCAAGAGGCCTAGCAAG	60°C
14	ACCATTGTCCCTCACATGTGC	CAGTGAAAGGCATGTGCTACAAAC	60°C
15	CAGGTCCTAGGCACAGGAAGT	ACATTCCTCAAATTGCTTGCCT	60°C

Para os exons de 2 a 15, as amostras de DNA foram amplificadas por desnaturação inicial a 94°C por 8 minutos seguido por 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, temperatura de hibridização específica para cada par de *primer* (Tabela 2) por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos e no último ciclo 10 minutos a 72 °C para extensão final. Utilizou-se um termociclador automático GeneAmp PCR Instrument System 9700 (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT). Para o exon 1, foi realizada reação com 38 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos seguido por hibridização de 67°C por 3 minutos. Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo. As amostras amplificadas foram identificadas em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/ml de gel, observadas em transiluminador ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid® (667 - 3 ¼ X 4 ¼).

3.2.2.3 Seqüenciamento Automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi estimada através da comparação com fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida (Φ X) em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2 U/ μ l) e exonuclease I (10 U/ μ l) (PCR product pre-sequencing kit, Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA) com incubação a 37°C por 15 minutos seguido de 80°C por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o kit ABI Prism™ BigDye Terminator (Perkin Elmer) e quantidades variáveis de produto de PCR (10 a 100 ng) foram utilizadas de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA).

3.2.2.4 Rastreamento da variante alélica IVS7 -21C>T

Após amplificação por PCR do exon 8 e sua região intrônica flanqueadora, 3 μ l desse fragmento foram incubados por duas horas a 37° com 1 μ l de tampão, 1 μ l de BSA, 2,5U da enzima Btgl. Após incubação, as amostras foram

submetidas a eletroforese em gel de agarose a 3%, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/ml de gel, observadas em transiluminador ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid® (667 - 3 ¼ X 4 ¼).

A variante alélica IVS7 -21C>T no *PTPN11* perde o sítio de restrição reconhecido pela enzima BtgI. Habitualmente, observam-se dois fragmentos, de 270 pb e 130 pb, respectivamente, resultantes da clivagem do fragmento do exon 8 pela enzima. Na troca de nucleotídeo em heterozigoze, observam-se três fragmentos, um deles representa o fragmento inteiro não digerido com 400 pb e os outros dois, os fragmentos resultantes da ação da BtgI (Figura 5).

Figura 5. Representação da visualização em gel de agarose da amplificação do exon 8 do gene *PTPN11* não digerido pela enzima BtgI (à esquerda) e do fragmento após digestão: sem a variante alélica (centro) e com troca de nucleotídeo (à direita)

3.2.1.5 Análise computacional

Para avaliar o efeito das variantes alélicas encontradas sobre o *splicing*, foi utilizado um programa preditor de sítios de *splice* (Splice Site Prediction by Neural Network - http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) que realiza uma comparação da sequência informada com um banco de seqüências de sítios de *splicing* bem caracterizados, calculando um escore de 0 a 1, conforme a probabilidade da região ser um verdadeiro sítio doador ou receptor de *splicing*.

3.2.3 Tratamento com hGH

Todas as crianças eram avaliadas antes do tratamento e a cada três meses durante o tratamento com hGH. As avaliações eram realizadas na mesma hora do dia e incluía medidas de altura (média de três medidas em estadiômetro de Harpenden), peso (medido em balança digital) e estágio puberal avaliado pelo método de Marshal e Tanner⁷⁶. O índice de massa corpóreo (IMC) foi calculado ($\text{peso}/\text{altura}^2$) e expresso em desvios-padrão para a idade e sexo. A velocidade de crescimento foi determinada após período de observação de, pelo menos, seis

meses. A altura-alvo foi calculada (altura do pai + altura da mãe e + 13 cm para meninos ou – 13 cm para meninas)/2 e expressa em escore de DP. Radiografias de mãos e punhos para estimativa da idade óssea foram obtidas anualmente e avaliadas por dois observadores, baseados no método de Greulich e Pyle⁷⁹.

O tratamento com hGH foi iniciado após período de pelo menos seis meses de observação da velocidade de crescimento basal (exceto por um paciente cuja altura extremamente baixa indicou início mais precoce do tratamento). O hGH foi administrado por via subcutânea, na dose de 0,1 a 0,15 U/kg/dia (33 a 50 µg/kg/dia), e a dose era ajustada de acordo com alterações do peso a cada consulta. Foi considerada boa resposta um incremento de, pelo menos, 2 cm/ano na velocidade de crescimento⁸⁰. Quatorze pacientes foram tratados por pelo menos um ano, 12 por dois anos e oito por três anos.

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa Statistxl. A análise descritiva (média, desvio-padrão, mediana e variação) foi realizada para todas as variáveis. Para comparar as características clínicas e laboratoriais não-numéricas entre os grupos com e sem mutações utilizamos o teste exato de Fisher. Para comparação de características numéricas, utilizamos os testes t de Student e Kruskal-Wallis para grupos com distribuição normal e grupos com

distribuição não-normal, respectivamente. Para correlação de variáveis paramétricas, utilizamos o teste de correlação de Pearson, e para variáveis com distribuição não-paramétricas, o teste de correlação de Spearman. Para toda análise estatística, consideramos como estatisticamente significante valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Grupo 1: Portadores de SN

4.1.1 Características clínicas

Foram estudados 26 pacientes (20 do sexo masculino; 6 feminino) com SN, 24 casos eram isolados e 2, familiares (7,7%). A idade média foi de 11,4 anos, variando de 5 a 22 anos. Três pacientes nasceram pequenos para a idade gestacional (PIG), SN15, SN18 e SN21. Na avaliação inicial, os indivíduos apresentavam baixa estatura (Z da altura $-2,6 \pm 1,2$), peso adequado para a estatura (Z IMC $-1 \pm 1,3$), e Z da velocidade de crescimento $-0,5 \pm 2,5$ (Tabela 3).

Em média, foram encontrados dez estigmas por paciente, variando de quatro a 17. Além da baixa estatura, observada em 20 pacientes (76,9%), a presença de pescoço alado (76,9%) e alterações do pavilhão auricular (84,6%) foram os sinais clínicos mais freqüentes. Observamos a presença de $1,8 \pm 0,8$ critério diagnóstico maior e $1,5 \pm 0,7$ menor nos nossos pacientes. Face típica foi encontrada em 50%; no restante, a face era sugestiva da SN. Também foi constatada criptorquidia em 55% dos pacientes do sexo masculino. Seis dos nossos pacientes (23,1%) eram portadores de cardiopatia grave (cinco com estenose pulmonar, um com miocardiopatia hipertrófica). Dos 20 pacientes sem

diagnóstico prévio de cardiopatia, 18 realizaram ecocardiografia como parte do protocolo de investigação, com demonstração de lesões cardíacas mínimas sem repercussão clínica em seis crianças (30%): valva mitral espessada (três pacientes), prolapso de valva mitral, valva tricúspide espessada e ectasia de aorta torácica (Tabela 4).

Tabela 3 - Características auxológicas dos pacientes com SN

Paciente	IC (anos)	Z da Altura	Z do IMC	Z da VC	IO	Z da AA
SN1	6,8	-2,6	-3,7	-0,2	2,7	0,4
SN2	13,0	-4,5	-2,0	-1,3	10,0	-0,4
SN3	16,4	-4,9	-1,6	ND	12,5	-1,0
SN4	14,2	-1,3	-1,1	-1,6	11,0	-1,3
SN5	11,0	-2,1	0,01	0,1	11,0	-0,4
SN6	13,4	-3,2	-0,5	-5,7	9,0	0,7
SN7	15,8	-3,6	-0,5	4,9	12,3	-0,2
SN8	17,2	-4,5	-2,6	4,7	13,0	-1,3
SN9	8,7	-1,3	1,1	-1,8	8,0	-0,8
SN10	7,5	-2,0	-0,8	ND	5,0	-0,1
SN11	7,7	-2,4	-3,4	1,1	7,0	ND
SN12	9,3	-3,4	0,2	-1,0	6,0	-1,4
SN13	14,3	-2,3	-2,1	3,2	11,0	-0,8
SN14	5,8	-2,2	-1,1	-1,9	4,5	-2,2
SN15	7,5	-3,3	-1,0	-0,8	2,7	ND
SN16	11,8	-2,1	1,5	-0,2	7,0	-1,0
SN17	12,5	-4,0	-1,6	ND	10,5	-0,9
SN18	22	-2,3	-2,5	ND	18,0	-1,9
SN19	8,2	-1,1	0,8	4,8	6,5	0,2
SN20	14,9	-0,8	ND	ND	ND	ND
SN21	5,0	-2,2	-0,7	-0,5	5,5	-1,4
SN22	6,6	-1,7	0,6	-1,4	4,5	ND
SN23	11,5	-3,2	-0,4	ND	9,0	-1,2
SN24	15,9	-2,0	-0,9	-1,2	14,0	-2,0
SN25	6,3	-4,3	-2,1	-3,6	6,0	-1,4
SN26	14,2	-1,1	-0,3	-0,9	11,0	-0,5
Média ± DP	11,4 ± 4,3	-2,6 ± 1,2	-1 ± 1,3	-0,5 ± 2,5	8,7±3,8	-0,9 ± 0,8

IC= idade cronológica ao diagnóstico; VC= velocidade de crescimento; AA=altura-alvo; ND= não disponível.

Tabela 4 - Estigmas presentes nos pacientes com SN

Características	n (%)
Cabeça e pescoço	
Face típica	13/26 (50)
Face sugestiva	13/26 (50)
Pescoço alado	20/26 (76,9)
Implantação baixa das orelhas	20/26 (76,9)
Pavilhão auricular anormal	17/26 (65,4)
Face triangular	17/26 (65,4)
Fissura palpebral oblíqua	15/26 (57,7)
Palato ogival	13/26 (50,0)
Implantação baixa dos cabelos	12/27 (46,2)
Ptose	10/26 (38,5)
Hipertelorismo	10/26 (38,5)
Epicanto	9/26 (34,6)
Ponte nasal baixa e larga	4/26 (15,4)
Fronte ampla	4/26 (15,4)
Retrognatia	4/26 (15,4)
Estrabismo	3/26 (11,5)
Exoftalmo	1/26 (3,8)
Desenvolvimento neuropsicomotor	
Dificuldade de aprendizagem	9/26 (34,6)
Retardo mental	2/26 (7,7)
Tórax	
<i>Pectus excavatus</i>	14/26 (53,8)
Hipertelorismo mamário	9/26 (34,6)
<i>Pectus carinatum</i>	6/26 (23,1)
Coração	
Critérios maiores	
Estenose Pulmonar	5/24 (20,8)
CIV / Hipertrofia miocárdica	1/24 (4,2)
Critérios menores	
Valva mitral espessada	3/24 (12,5)
Prolapso de valva mitral	1/24 (4,2)
Insuficiência tricúspide discreta	1/24 (4,2)
Ectasia de aorta	1/24 (4,2)
Sistema Genito-urinário	
Criptorquidia	11/20 (55,0)
Esqueleto	
Cúbito valgo	13/26 (50,0)
Clinodactilia	7/26 (26,9)
Alteração de coluna	7/26 (26,9)
4º metacarpo curto	2/26 (7,7)

4.1.2 Características hormonais

Avaliamos a secreção de GH em 24 pacientes (88,9%) diretamente através de teste de estímulo (18 pacientes) ou indiretamente por dosagem de IGF-I e/ou IGFBP-3 (23 pacientes). Todos os pacientes com SN submetidos a teste de estímulo com clonidina tiveram respostas que permitiram afastar a deficiência desse hormônio (pico de GH nos testes $13,5 \pm 6,7$ ng/ml). Os níveis médios de IGF-I foram de $-1,5 \pm 1,5$ SD (36,4% abaixo de -2 DP), e os de IGFBP-3, $-1,0 \pm 1,2$ (28,6% abaixo de -2 DP).(Tabela 5).

Tabela 5 - Níveis de GH, IGF-I e IGFBP-3 dos pacientes com SN

Paciente	Pico de GH* (ng/ml)	Z IGF-I	Z IGFBP-3
SN1	9,8	-1,5	-2,0
SN2	9,7	-3,5	ND
SN3	16,0	-3,5	-0,8
SN4	ND	-2,5	-1,0
SN5	ND	1,0	-2,0
SN6	8,6	-5,0	-2,5
SN7	25,0	-2,0	-1,5
SN8	12,0	-1,5	-0,5
SN9	5,0	0,0	-2
SN10	6,2	-3,5	-1,5
SN11	ND	-1,5	-2,0
SN12	6,1	-0,3	0,3
SN13	18,0	-1,5	-2,0
SN14	ND	ND	2,0
SN15	16,0	-1,3	ND
SN16	26,7	-1,5	ND
SN17	16,1	-1,0	-1,8
SN18	8,5	ND	ND
SN19	ND	1,0	0,0
SN20	ND	ND	ND
SN21	ND	0,5	0,3
SN22	ND	0,0	0,0
SN23	6,1	-2,0	-1,5
SN24	14,0	-1,0	ND
SN25	8,5	1,0	0,0
SN26	22,4	-3,0	-1,3
Média $\pm$ DP	$13,5 \pm 6,7$	$-1,5 \pm 1,5$	$-1,0 \pm 1,2$

* Teste de estímulo com clonidina; ND= não disponível

4.1.3 Características Genéticas

O seqüenciamento do *PTPN11* não revelou alterações na seqüência dos exons 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14 e 15 em relação à seqüência controle. Em relação aos outros exons, foram encontradas sete mutações *missense* diferentes em onze dos 26 pacientes com SN (42,3%), todas já identificadas nos estudos prévios (Tabela 6, Figura 6). Dois pacientes (7,4%) apresentaram uma variante alélica no exon 3, a H85H, causada pela troca C>T, no códon 85. Além disso, foram identificados os polimorfismos intrônicos: IVS7 -21 C>T/C em cinco pacientes (19,2%), IVS9 -9 C>C/A em dois pacientes (7,4%) e IVS12 -4 G>C/G em um paciente (3,7%) (Tabela 7). Todos os polimorfismos já foram encontrados em pacientes com SN e controles, e não alteram a predição do uso de sítio de *splice*.

Tabela 6 - Mutações no gene *PTPN11* nos pacientes com SN

Exon	Paciente	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Códon	Domínio
3	SN8	A172G	Asn (N) > Asp (D)	58	N-SH2
3	SN5	G179C	Gly (G) > Ala (A)	60	N-SH2
3	SN7	G181A	Asp (D) > Asn (N)	61	N-SH2
3	SN4	A188G	Tyr (Y) > Cys (C)	63	N-SH2
3	SN1,SN25	C215G	Ala (A) > Gly (G)	72	N-SH2
8	SN9, SN22,SN23,SN26	A922G	Asn (N) > Asp (D)	308	PTP
13	SN2	A1510G	Met (M) > Val (V)	504	PTP

Asn= asparagina; Asp= ácido aspártico; Gly= glicina; Ala= alanina; Tyr= tirosina; Cys= cisteína; Met= metionina; Val= valina.

Tabela 7 – Variantes alélicas no gene *PTPN11* nos pacientes com SN

Paciente	Localização	Troca de nucleotídeo
SN3, SN15	Exon 3; códon 85	CAC > CAT
SN11, SN12, SN13, SN16, SN24	Intron 7; -21 pb	C>C/T
SN8, SN10	Intron 9; -9 pb	C>C/A
SN11	Intron 12; -4 pb	G>G/C

Figura 6. Representação das mutações e polimorfismos exônicos encontrados nos pacientes com SN, sua localização no gene *PTPN11* e o correspondente domínio na proteína SHP-2.

4.1.4 Resposta ao tratamento com hGH

Quatorze pacientes (53,8%) foram tratados com hGH para baixa estatura, com dose média de 0,15 U/kg/dia (46 µg/kg/dia). Essas crianças, dez do sexo masculino e 4 do sexo feminino, apresentavam idade cronológica média de 12,3 anos ao início do tratamento (variação de 7,4 a 18,6 anos). A maioria encontrava-se pré-púbere (dez crianças em estadio puberal Tanner I, duas em Tanner II e duas em estadio Tanner III) e houve evolução normal da puberdade no final do primeiro e segundo anos de tratamento. Uma das pacientes (SN17) iniciou puberdade no início da terapia, foi medicada concomitantemente com análogos de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) por 3,4 anos e suas características sexuais secundárias regrediram ao estágio pré-puberal. O tratamento foi iniciado após, pelo menos, sete meses de observação para

avaliação da velocidade de crescimento pré-tratamento, exceto por um paciente cuja predição de altura final muito baixa indicou tratamento mais precoce. Sete apresentavam alterações cardíacas, nenhuma das quais contra-indicava o tratamento.

Durante o período de tratamento, a velocidade de crescimento aumentou de $4,1 \pm 1,2$ para $7,3 \pm 1,8$ cm/ano ($p=0,0005$), $6,3 \pm 2,1$ ($p=0,03$) e para $6,8 \pm 2,7$ no primeiro, segundo e terceiro anos de tratamento, respectivamente (Figura 7). Sete pacientes (58,3%) obtiveram resposta considerada boa⁸⁰. Como consequência do aumento da velocidade de crescimento, a estatura aumentou significativamente, com incremento no Z de altura de $0,4 \pm 0,4$ após o primeiro, $0,8 \pm 0,5$ após o segundo e $1,2 \pm 0,9$ após o terceiro ano de terapia (Figura 8). Oito pacientes foram tratados por período maior que dois anos, em média 3,4 anos (2,5 a 5,6 anos). O ganho total de altura desses pacientes foi $1,4 \pm 0,7$ DP.

Figura 7 – Velocidade de crescimento dos pacientes com SN antes de iniciar o tratamento e no primeiro, segundo e terceiro anos de tratamento. (★- $p < 0,05$ em relação ao valor basal)

Figura 8 – Z da altura dos pacientes com SN após o primeiro, segundo e terceiro anos de tratamento com hGH (★- $p < 0,05$ em relação ao valor basal).

Percebemos avanço médio da idade óssea de 1,1 ano no primeiro ano, 1,7 no segundo e 1,5 no terceiro ano de tratamento.

Observou-se que os pacientes tratados apresentavam níveis baixos de IGF-I ($-2 \pm 2,2$) e IGFBP-3 ($-1,6 \pm 1,1$). Durante a terapia, os níveis séricos de IGF-I apresentaram aumento de $130 \pm 68 \mu\text{g/l}$ ($-2,0 \pm 1,4$ DP) antes do tratamento para $271 \pm 109 \mu\text{g/l}$ ($-0,7 \pm 1,1$ DP; $p=0,001$), no primeiro ano de tratamento. Houve correlação positiva entre o incremento na VC após o primeiro ano de hGH e o incremento nos níveis de IGF-I ($r=0,67$; $p=0,02$).

Tabela 7 - Características dos pacientes com SN com mutação no gene *PTPN11*

Paciente	SN8	SN5	SN7	SN6	SN1	SN25	SN9	SN22	SN23	SN26	SN2
Mutação	N58D	G60A	D61N	Y63C	A72G	A72G	N308D	N308D	N308D	N308D	M504V
Localização	N-SH2	N-SH2	N-SH2	N-SH2	N-SH2	N-SH2	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP
Z Altura	-4,5	-2,1	-3,6	-1,3	-2,6	-4,3	-1,3	-1,9	-3,2	-1,1	-4,5
Cardiopatia	PVM	ND	EP/CIA	VME	EP	EP	Não	Não	Não	EP	Não
Face típica	X	X	X	X	X		X	X			
Face sugestiva						X			X	X	X
Pescoço alado	X		X	X	X		X	X			X
Pectus excavatum	X		X	X	X	X	X		X		X
Pectus carenatum			X					X			X
Hipertelorismo mamário	X		X	X	X	X					
Cubito valgo	X		X	X	X		X				X
Clinodactilia	X	X									
Criptorquidia			X	X	X	X					
Dificuldade de aprendizado						X	X				

PTP= domínio tirosinofosfatase; N-SH2= domínio N-SH2; PVM= prolapso de valva mitral; CIA= comunicação interatrial; VME= valva mitral espessada; EP= estenose pulmonar; ND= não disponível.

4.1.5 Comparação do fenótipo dos pacientes com e sem mutação no *PTPN11*

As características dos pacientes com SN portadores de mutação identificada no gene *PTPN11* são descritas individualmente na Tabela 8. Comparando os grupos com e sem mutação no *PTPN11*, não identificamos diferenças estatisticamente significativas na frequência dos estigmas (Tabelas 9 e 10). Entretanto, essa comparação sugere maior frequência de sinais faciais típicos da SN, principalmente alterações do pavilhão auricular, nos pacientes com mutação (Tabela 9). Também verificamos maior presença de baixa estatura naqueles sem mutação, embora a média e a mediana da altura dos dois grupos seja semelhante (Tabela 10). Não houve também diferenças entre os níveis hormonais e a presença de critérios diagnósticos da SN.

No início da terapia com hGH, não havia diferenças entre os grupos em relação às variantes idade, sexo, altura-alvo, presença de estigmas ou malformação cardíaca, estadio puberal, estatura, peso e velocidade de crescimento (Tabela 10). Quanto à resposta ao tratamento, a velocidade de crescimento aumentou significativamente em ambos os grupos em comparação à basal com tendência do grupo sem mutação a apresentar melhores velocidades de crescimento, o que se traduziu em maior incremento do Z de altura (Figura 9). Esse grupo apresentou ganho total de $1,7 \pm 0,1$ DP de altura no terceiro ano, comparado a $0,8 \pm 0,4$ no grupo com mutação ($p < 0,01$) (Tabela 10). Houve

correlação positiva entre o aumento da VC após o primeiro ano de tratamento e o incremento dos níveis de IGF-I ($r=0,67$; $p=0,02$) (Figura 10).

Os níveis séricos basais de IGF-I eram similares em ambos os grupos, mas aumentaram mais após o primeiro ano de tratamento com hGH nos pacientes sem mutação no gene *PTPN11* (de 133 ± 75 $\mu\text{g/l}$ para 324 ± 136 $\mu\text{g/l}$) em relação aos pacientes com mutação no *PTPN11* (de 130 ± 71 $\mu\text{g/l}$ para 216 ± 46), ($p=0,03$). (Figura 10). No segundo ano de tratamento, os níveis de IGF-I permaneceram estáveis em relação aos valores do primeiro ano (média de 334 $\mu\text{g/l}$ em pacientes sem mutação e 290 $\mu\text{g/l}$ em pacientes com mutação).

Tabela 9 - Comparação do fenótipo de portadores de SN com e sem mutação no *PTPN11*

Aspecto	Nº /total (%) com mutação	Nº /total (%) sem mutação
Craniofaciais		
Face Típica	7/11 (63,6)	6/15 (40)
Face sugestiva	4/11 (36,4)	9/15 (60)
Alterações do pavilhão auricular	11/11 (100)	11/15 (73,3)
Fissura palpebral para baixo	8/11 (72,7)	7/15 (46,7)
Ptose	3/11 (27,3)	6/15 (40)
Epicanto	5/11 (45,5)	4/15 (26,7)
Hipertelorismo	7/11 (63,6)	3/15 (20)
Estrabismo	0/11	3/15 (20)
Exoftalmo	1/11 (9,1)	0/15
Cabelo de implantação baixa	4/11 (36,4)	8/15 (53,6)
Pescoço alado	8/11 (72,7)	12/15 (80)
Face triangular	8/11 (72,7)	9/15 (60)
Fronte ampla	1/11 (9,1)	3/15 (20)
Ponte nasal baixa e larga	1/11 (9,1)	3/15 (20)
Retrognatia	0/11	3/15 (20)
Palato ogival	5/11 (45,5)	7/15 (46,7)
Defeito cardíaco		
EP	4/9 (44,4)	1/13 (7,7)
MCH	0/9	1/13 (7,7)
Defeito septal	1/9 (11,1)	1/13 (7,7)
Baixa estatura	7/11 (63,6)	13/15 (86,7)
Z altura	-2,7 ± 1,3	-2,6 ± 1
Alterações esqueléticas		
Alterações torácicas	9/11 (81,8)	10/15 (66,7)
Cúbito valgo	6/11 (54,5)	7/15 (46,7)
Clinodactilia	2/11 (18,2)	5/15 (33,3)
Alteração de coluna	2/11 (18,2)	5/15 (33,3)
Criptorquidia	4/9 (44,4)	7/11 (63,6)
Dificuldade de aprendizado	3/11 (27,3)	6/15 (40)
Z IGF-I	-1,2 (-3 a 1)	-2,0 (-7 a 1)
Z IGFBP-3	-1,0 (-2 a 0,8)	-0,7 (-3,5 a 2,4)
Número de estigmas		
Critérios maiores	1,8 ± 0,7	1,8 ± 0,7
Critérios menores	1,5 ± 0,7	1,6 ± 0,5

EP= estenose pulmonar; MCH= miocardiopatia hipertrófica.

Tabela 10 - Aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes com SN tratados com hGH com e sem mutações no gene *PTPN11*

Grupo	Com mutação	Sem mutação	p
Masculino:Feminino	4:2	5:2	NS
Z da Altura-alvo	-0,6 ± 0,6	-0,8 ± 0,8	NS
Pico de GH no teste de estímulo (µg/l)	11,3 ± 7	14,9 ± 7	NS
Malformação cardíaca	50%	43%	NS
IC (anos) pré-tratamento	12,8 ± 4	11,7 ± 3	NS
IO (anos) pré-tratamento	9,5 ± 2,9	8,8 ± 2,5	NS
Acompanhamento (anos) pré-tratamento	0,9 ± 0,3	0,7 ± 0,4	NS
Pré-púberes: púberes	4:2	5:2	NS
Z IMC	-1,1 ± 1,2	-0,6 ± 1,2	NS
Dose de hGH (µg/kg/dia)	48 ± 5	46 ± 7	NS
VC (cm/ano)			
pré-tratamento	4,2 ± 1,1	3,9 ± 1,4	NS
primeiro ano	6,9 ± 1,6	7,6 ± 1,9	NS
segundo ano	5,4 ± 1,5	7,1 ± 2,3	NS
terceiro ano	5,7 ± 1,5	7,0 ± 3,8	NS
Ganho estatural (Z altura)			
primeiro ano	0,3 ± 0,4	0,4 ± 0,4	NS
segundo ano	0,7 ± 0,5	0,8 ± 0,7	NS
terceiro ano	0,8 ± 0,4	1,7 ± 0,1	<0,01
Avanço IO/IC			
primeiro ano	1,1 ± 1,2	1,1 ± 0,8	NS
segundo ano	1,5 ± 1,1	1,9 ± 0,7	NS
terceiro ano	1,3 ± 0,8	1,7 ± 0,9	NS

IC= idade cronológica; IO= idade óssea; IMC= índice de massa corpórea; VC= velocidade de crescimento; NS= não-significante.

Figura 9. Ganho de Z de altura no primeiro, segundo e terceiro anos de tratamento com hGH nos portadores de SN com (colunas claras) e sem mutação (colunas escuras) no *PTPN11*. (★- $p < 0,05$ em relação a pacientes com e sem mutação).

Figura 10 – Elevação dos níveis de IGF-I após o primeiro ano de tratamento com hGH em portadores de SN com e sem mutação no *PTPN11*.

4.2 Grupo 2: Pais de pacientes com SN portadores de mutações no *PTPN11*

4.2.1 Características clínicas

Os doze progenitores estudados tinham altura média de $-0,9 \pm 1,0$ DP. Nenhum apresentava características clínicas de SN, exceto o pai do paciente SN6. Esse indivíduo tinha face sugestiva, baixa estatura (Z de altura = $-2,3$), *pectus excavatum*, e recebeu o diagnóstico clínico de SN.

4.2.2 Características genéticas

Não foram encontradas mutações no *PTPN11* em nenhum dos onze pais não afetados de pacientes com SN. No pai afetado, encontramos a mesma mutação encontrada no filho, Y63C.

4.3 Grupo 3: Crianças com BEI

4.3.1 Características clínicas

Foram selecionadas 42 crianças (11 meninas e 31 meninos), com idade média de $8,9 \pm 4,5$ anos, variando de 4 meses a 16,8 anos (Tabela 11).

Cinco crianças nasceram PIG e não recuperaram o crescimento nos primeiros anos de vida (pacientes: BE1, BE2, BE4, BE11 e BE26). As demais apresentaram déficit estatural precoce ($4,2 \pm 3,3$ anos), com exceção de três crianças que diminuíram a velocidade de crescimento próximo ao início da puberdade (BE14, BE37, BE42).

Na avaliação inicial, as crianças apresentavam baixa estatura (Z da altura $-2,9 \pm 0,9$), peso adequado para a estatura (Z do IMC $-0,1 \pm 0,7$) e velocidade de crescimento variável (Z da velocidade de crescimento $-1 \pm 2,3$, variando de $-4,2$ a $4,7$).

A altura alvo foi de $-1,2 \pm 1$. Dessas crianças, 16 (38,1%) tinham apenas um dos progenitores com baixa estatura (16,2% o pai e 21% a mãe); e quatro (9,5%) tinham ambos dois progenitores com baixa estatura (Z da altura < -2).

Tabela 11 - Características auxológicas dos pacientes com BEI

N	IC (anos)	Z altura	Z IMC	Z VC	Z altura-alvo
BE1	6,7	-4,4	-1,1	-2,7	-2,2
BE2	4,5	-3,3	ND	-1,3	-2,2
BE3	0,3	-6	-3,4	-3,5	-0,4
BE4	14	-3,4	-3	-3,7	-2,2
BE5	6,7	-2,1	-0,8	-2,4	-1,5
BE6	15,3	-2,1	-2,7	ND	-2
BE7	3,5	-2,3	1,5	-1,6	-1,5
BE8	8,5	-2,9	-0,7	-1,3	-2,1
BE9	4	-2,1	-1,3	-3,1	-0,5
BE10	3,5	-3,3	-2,4	-1,6	-0,5
BE11	11,5	-3,6	ND	-1,7	-2,6
BE12	6,8	-2,2	-0,3	-1,4	0
BE13	15	-5,6	-2,6	-1	-2
BE14	15	-4,1	-2,9	-2,2	-1,6
BE15	4,3	-2	1,2	-1,4	-1,7
BE16	7,5	-2,5	ND	-0,8	-0,7
BE17	8,8	-2,7	-0,5	0,8	-0,7
BE18	8,3	-2,5	ND	0,5	-1,2
BE19	7,5	-2,3	-1,7	-2	-0,4
BE20	10	-2,5	-0,4	-0,7	-2,5
BE21	4,2	-2,8	0,01	-1	0,8
BE22	9	-2,2	ND	-0,9	-1,4
BE23	8,6	-2,8	ND	0,1	-1,5
BE24	11,5	-3,9	-4,3	-1,9	-2,5
BE25	16,3	-4,1	ND	0	ND
BE26	3	-3,1	0,9	-1,5	-1,2
BE27	2	-2,3	-0,6	-2	-0,7
BE28	12,3	-3,3	-2,5	-1,6	-2
BE29	13	-2,2	0,02	-1,8	0,5
BE30	10,6	-2,1	-0,5	-1,8	-0,8
BE31	11,5	-2,7	-0,2	-0,8	0,95
BE32	16,8	-4,2	-0,4	ND	-1,1
BE33	12	-3,5	-1,3	-1,2	-2,3
BE34	13,8	-2,6	-0,9	0,5	-2,5
BE35	7,3	-2,5	ND	-4,2	-2,3
BE36	13,5	-3,6	ND	0,7	-0,95
BE37	5	-2	0,4	-1,9	-2,4
BE38	16,7	-2,4	-2,7	4,7	-1,8
BE39	12,7	-2,7	-3,4	-3,2	-1,9
BE40	6,5	-2,8	-2,9	-0,9	-0,8
BE41	11,9	-3	-1,6	-1,3	-1,2
BE42	6	-2,1	-0,5	-2,2	-0,6
Mediana	8,6	-2,7	-0,9	-1,4	-1,2

IC= idade cronológica ao diagnóstico; VC= velocidade de crescimento; ND= não disponível.

Avaliamos os sinais clínicos associados à SN nessas crianças. (Quadro 1). Foram encontrados em média $3,6 \pm 1,7$ estigmas, variando entre dois a oito por indivíduo. Oito de 23 pacientes (34,8%) que realizaram ecocardiograma apresentavam alterações cardíacas (Tabela 12). Epicanto e palato ogival foram os estigmas mais prevalentes em combinação (Tabela 13).

Tabela 12 - Fenótipo dos pacientes com BEI

Característica	n (%)
Cabeça e pescoço	
Palato ogival	15 (35,7)
Epicanto	7 (16,7)
Ponte nasal baixa e larga	6 (14,3)
Face triangular	4 (9,5)
Implantação baixa das orelhas	4 (9,5)
Fronte ampla	3 (7,1)
Estrabismo	3 (7,1)
Retrognatia	3 (7,1)
Nariz em sela	2 (4,8)
Exoftalmo	2 (4,8)
Má-oclusão dentária	2 (4,8)
Tórax	
Hipertelorismo mamário	5 (11,9)
<i>Pectus excavatum</i>	3 (7,1)
Tórax em escudo	3 (7,1)
Coração	
Estenose aórtica	2/23 (8,7)
Valva aórtica bicúspide	2/23 (8,7)
Prolapso valva mitral	2/23 (8,7)
Valva mitral mal formada	1/23 (4,3)
Refluxo tricúspide	1/23 (4,3)
Desenvolvimento neuropsicomotor	
Dificuldade de aprendizado	3 (7,1)
Sistema Genito-urinário	
Criptorquidia	3/31 (9,7)
Pele	
Nevus	3 (7,1)
Lentigines	1 (2,4)
Esqueleto	
Clinodactilia	7 (16,7)
Cúbito valgo	4 (9,5)
Alterações da coluna	2 (4,8)
4º metacarpo curto	1 (2,4)
Outros	
Hepatoesplenomegalia	1 (2,4)

Tabela 13 - Prevalência de combinações de estigmas da SN em pacientes com BEI

Combinação	n (%)
Epicanto e palato ogival	6 (14,3)
Epicanto e hipertelorismo mamário	4 (9,5)
Implantação baixa da orelha e palato ogival	4 (9,5)
Retrognatia e palato ogival	3 (7,1)
Palato ogival e ponte nasal baixa e larga	3 (7,1)
Pavilhão auricular anormal, retrognatia e palato ogival	2 (4,8)
Palato ogival, retrognatia e hipertelorismo mamário	2 (4,8)
Estrabismo e clinodactilia	2 (4,8)
Epicanto e tórax em escudo	2 (4,8)
Epicanto e ponte do nariz baixa e larga	2 (4,8)
Hipertelorismo mamário e dificuldade de aprendizagem	2 (4,8)
Hipertelorismo mamário e clinodactilia	2 (4,8)

4.3.2 Características laboratoriais

Todos os 42 pacientes apresentavam exames laboratoriais dentro dos limites da normalidade, incluindo o cariótipo. Além disso, apresentavam níveis basais ou pico de GH após estímulo acima do valor de corte para diagnóstico de deficiência de GH⁶¹. Doze crianças (28,6%) apresentavam níveis de IGF-I abaixo de -2 DP para idade e sexo, o mesmo acontecendo com uma criança (2,4%) em relação a IGFBP-3 (Tabela 14).

Tabela 14 - Níveis de GH basal e após estímulo, IGF-I e IGFBP-3 nos pacientes com BE

Paciente	GH basal (ng/ml)	GH pico (ng/ml)	Z IGF-I	Z IGFBP-3
BE1	5,3	5,2	-2,5	-1
BE2	1,9	28,1	-0,5	-1
BE3	6,7	ND	-2,5	-2
BE4	5	3,4	-2	0,5
BE5	0,1	3,2	-2	-2
BE6	0,8	3	-2,5	-0,3
BE7	1,1	ND	-1	0
BE8	1,1	1,4	-1,5	-0,5
BE9	0,8	8,4	-2,5	-1,5
BE10	2,5	22,1	-1	-1
BE11	0,2	17,7	-2	-0,5
BE12	0,1	ND	-0,5	1,5
BE13	1,2	12	-2	-0,5
BE14	7,2	13,3	-3,5	0
BE15	0,5	32	-1	0
BE16	3	14,8	-1	-2
BE17	0,04	9,7	-2	ND
BE18	0,9	18,7	-1	ND
BE19	9,3	4,9	-3	-1
BE20	5,4	6,1	-1,5	-1
BE21	0,3	8,8	-3	-2
BE22	0,1	ND	-1,5	-2
BE23	1,2	20	-2,3	-1
BE24	0,3	11	-2	-0,5
BE25	3	ND	ND	ND
BE26	8,9	10,2	-1	0
BE27	6,2	7,6	-2	0
BE28	2,3	9,6	-3	-1
BE29	3,4	50	ND	ND
BE30	6,2	23	-3	-2
BE31	0,8	23,2	-1	-1,5
BE32	0,6	14,7	-0,5	0
BE33	0,2	ND	-1	-0,5
BE34	3,8	5,2	-2	-1,5
BE35	2,1	ND	-1	-2
BE36	1,1	7,5	-1,3	-0,3
BE37	6,9	14	0	0
BE38	2,5	13,8	-1	-1
BE39	0,3	ND	1	1,5
BE40	3	7,5	-3	-2,5
BE41	1,3	5	-0,5	-1,5
BE42	0,1	20,3	-1	0
Mediana	1,3	10,0	-1,6	-1

4.3.3 Características genéticas

Não encontramos mutações no *PTPN11* nas 42 crianças com BEI. Identificamos dois polimorfismos no intron 7, o IVS7 -21 C>T em oito crianças (19%) e o IVS7 -30 T>C em uma criança (2,3%). Todos esses polimorfismos já haviam sido encontrados em pacientes com SN e em controles, e não alteram a predição do uso de sítio de *splice*.

4.4 Estudo do polimorfismo IVS7 -21 C>T

Estudamos a frequência do polimorfismo IVS7 -21 C>T, o mais freqüentemente encontrado em nossos pacientes, em uma população de altura normal (168 alelos) através do uso de enzima de restrição BtgI. Identificamos o polimorfismo em 21 alelos (12,5%), todos em heterozigose. Quando essa população foi dividida pela altura em tercís, a presença do polimorfismo distribuiu-se igualmente nos três grupos: 20% nos de altura média, 17,6% nos normais altos e 9% nos normais baixos.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O eixo GH/IGF-I é um dos principais determinantes do crescimento pós-natal e é modulado pela expressão variável de diversos genes, que influenciam a produção, a secreção e a ação desses hormônios. Variações genéticas nesse *pool* de genes e interações gene-gene contribuem para a estatura individual. Além disso, algumas síndromes com fenótipos complexos incluem como estigma a baixa estatura, sugerindo que genes envolvidos em diversas vias de sinalização atuam como fatores pleiotrópicos, cujas mutações causam múltiplas características. A SN representa bem essa situação, com percentual significativo dos casos originados por mutações em heterozigose no gene *PTPN11*, que codifica uma tirosinofosfatase chamada SHP-2.

As tirosinofosfatases têm o papel de desfosforilar fatores de crescimento, estimulando ou bloqueando a transdução do sinal intracelular⁸¹. Vários autores vêm estudando seus efeitos, com demonstração de sua importância na modulação do sinal de diversas cascatas, tais como nas dos receptores do GH⁸²⁻⁸⁴, da insulina⁸⁵, da leptina^{86,87}, da prolactina⁸⁸⁻⁹⁰, das interleucinas^{91,92}, do fator de crescimento derivado das plaquetas⁹³, do substrato do receptor de insulina 1⁹⁴, entre outros. Pode-se inferir que, dada a diversidade de genes modulados pela SHP-2, alterações genéticas no *PTPN11* provoquem fenótipos variados. Alterações fenotípicas características da SN tão diferentes entre si quanto estenose pulmonar e lesões cutâneas, por exemplo, estão mais associadas a mutações específicas no *PTPN11*^{26,28,31,32}

Como a SHP-2 está envolvida negativamente com a sinalização do GH, é possível que a característica baixa estatura da SN também esteja relacionada ao gene codificador dessa proteína. Talvez até mesmo a resposta terapêutica ao hGh possa ser influenciada por essas alterações. Apesar disso, nenhum estudo molecular de pacientes com SN conseguiu demonstrar tal associação até o momento.

Com isso, nosso objetivo foi avaliar a presença de mutações no gene *PTPN11* em população de crianças com SN selecionadas principalmente por baixa estatura e relacionar os achados moleculares com as informações clínicas e laboratoriais. Além disso, supomos que mutações no *PTPN11* poderiam causar quadros mais discretos da doença, que não permitiriam seu diagnóstico clínico pela ausência dos critérios necessários. Diante dessa hipótese, decidimos avaliar o gene *PTPN11* em crianças atualmente classificadas como BEI, mas que apresentam estigmas de SN insuficientes para o seu diagnóstico. Investigamos também pais de pacientes com SN portadores de mutação, mesmo sem o quadro clínico clássico que poderiam representar SN clinicamente incompleta ou amenizada pelo tempo.

Em relação à SN, estudamos 26 pacientes diagnosticados de acordo com os critérios de van der Burgt (Quadro 2). Esse grupo era composto principalmente por casos isolados (91,7%). Houve maior prevalência do sexo masculino (75%), provavelmente porque a maioria foi diagnosticada durante investigação de baixa estatura, motivo que leva maior número de meninos a procurarem por centros especializados em crescimento. Dentro dos aspectos clínicos, alguns sinais foram mais frequentes. A baixa estatura estava presente em 79,5%, sempre inferior à

altura-alvo. Isso indica que o comprometimento do crescimento desses pacientes deva ser creditado à sua doença, e não à herança genética. Cinquenta por cento dos nossos pacientes apresentavam face típica da síndrome, característica de extrema importância para o diagnóstico. Os sinais craniofaciais mais comuns foram pescoço alado (87,5%), e malformações do pavilhão auricular (83,3%). Criptorquidia foi encontrada em 55,5% dos homens, semelhante ao descrito na literatura^{1,2,26,31}. Foi identificada também grande prevalência de alterações ecocardiográficas (46,2%), resultado compatível com o esperado para SN e bem maior do que na população geral (6 - 8:1000)⁹⁵. Entretanto, ao se excluir os pacientes com SN que apresentavam lesões cardíacas típicas (estenose pulmonar e miocardiopatia hipertrófica), a frequência de outros achados ecocardiográficos foram semelhantes no grupo com SN e de crianças com BEI, sugerindo que essas lesões não tenham relação com a doença.

No estudo molecular dos pacientes com SN, encontramos mutações em nove indivíduos, oito casos esporádicos e um familiar. A frequência global de mutação foi de 42,3%, similar à descrita na maioria dos estudos prévios. Em alguns trabalhos^{26,290}, essa frequência foi maior, chegando à metade, talvez devido a viés de seleção, já que grande parte nesses estudos era de ocorrência familiar (36% da casuística), ao contrário do nosso, onde os casos familiares representam 7,7% do total. Também se deve considerar a grande frequência (57 a 74%) de pacientes portadores de estenose pulmonar nesses trabalhos, sinal que está mais associado à presença geral de mutações. Em nossa casuística, cinco pacientes (19,2%) tiveram o diagnóstico de estenose pulmonar e desses, quatro apresentavam mutação (80%). Além disso, nossos pacientes são referidos

principalmente por baixa estatura, estigma com menor associação com a presença de mutações segundo a maioria dos relatos^{26,31}, excetuando-se os resultados de Sarkozy *et al*²⁷. Esse último autor demonstrou maior frequência de pacientes baixos no grupo com mutação, ao contrário do descrito até então.

Sete das mutações encontradas (71,4%) localizavam-se no exon 3, que codifica o domínio N-SH2. As outras duas situavam-se nos exons 8 (13,4%) e 13 (13,4%), responsáveis pelo domínio PTP. Elas encontram-se em aminoácidos envolvidos diretamente na ligação intramolecular entre os domínios N-SH2 e PTP (N58D, G60A, D61N, Y63C, A72G) ou localizados em torno da superfície de interação destes domínios (N308D, M504V). Nenhuma mutação foi encontrada no domínio C-SH2. Todas as mutações já haviam sido descritas (Quadro 3). A mais comumente encontrada foi a N308D, no exon 8, presente em 3 indivíduos. Nos estudos publicados, essa mutação também foi das mais recorrentes.

Quando analisamos a relação genótipo-fenótipo, observamos que o grupo com mutações no *PTPN11* apresentou tendência a características faciais mais típicas da SN, com alterações em pavilhão auricular, hipertelorismo ocular, face triangular, fissura palpebral orientada para baixo, além de maior frequência de alterações torácicas, e defeitos cardíacos. Alguns autores sugerem que os pacientes com mutação tenham faces mais típicas de SN²⁹, o que é compatível com nossos resultados. Apesar disso nenhuma alteração atingiu significância estatística, possivelmente pela reduzida amostra de indivíduos com SN.

Não encontramos diferenças nítidas entre os pacientes com diferentes mutações. Os três pacientes com a mesma mutação não tinham em comum características que os diferenciavam dos outros, além de apresentarem

características distintas entre si (Tabela 7). Essa mutação, N308D, é uma das mais freqüentemente encontradas e esteve associada com os mais diferentes graus de gravidade da doença, desde faces somente sugestivas até quadros muito típicos e associados a retardo mental^{24,29}. A única característica marcadamente relacionada a essa mutação é a presença de estenose pulmonar^{24,29}, associação que não ocorreu na nossa casuística. Ao contrário, dois dos três pacientes com estenose pulmonar possuem outras mutações, a D61N e a A72G, e um não apresentou mutação.

Zenker²⁹ propõe alternativa diagnóstica para a SN, levando em consideração critérios mais rígidos. Nessa classificação, os critérios maiores são defeito cardíaco típico, face típica e pescoço alado. Os menores são estatura < -2 DP, retardo psicomotor ou de fala, diátese hemorrágica, história familiar e dois dos seguintes aspectos: deformidade torácica, cúbito valgo, implantação baixa de pavilhão auricular ou de cabelos, linfedema ou criptorquidia. Para diagnóstico, seriam necessários dois critérios, pelo menos um deles maior. Essa classificação talvez pudesse selecionar mais corretamente os pacientes, e o autor encontrou mutações em 60% dos pacientes classificados dessa forma. Por esses critérios, três dos nossos pacientes não teriam o diagnóstico de SN, por não apresentarem face ou cardiopatia típicas da doença. É interessante notar que nenhum desses três pacientes tinha mutação no *PTPN11*. Sem esses indivíduos, a freqüência de mutação na nossa população seria de 43%. Sugere-se, então, que com esses critérios mais rigorosos, teríamos uma população com maior probabilidade de apresentar mutação no gene em questão²⁹ e excluiríamos indivíduos sindrômicos, mas portadores de, possivelmente, outra doença ou defeitos em outros genes.

Vinte e quatro pacientes com SN foram avaliados quanto ao eixo GH-IGF-I, confirmando seu adequado funcionamento. Um terço deles tinha níveis de IGF-I ou IGFBP-3 abaixo do limite da normalidade, mas a DGH foi descartada nesses casos através de teste de estímulo. Esse comportamento é comumente descrito na SN e sugere defeito na ação do GH^{9,10}. Imaginávamos possível associação entre defeito na SHP-2 e sinalização via GH, que poderia se refletir por níveis mais baixos de IGF-I e IGFBP-3. No entanto, não houve diferença entre a dosagem basal desses hormônios nos grupos com e sem mutação.

Utilizamos hGH para o tratamento de baixa estatura (<-2DP) em pacientes com SN. Obtivemos boa resposta⁸⁰ em 66% dos pacientes tratados, porém, não encontramos preditores clínicos de resposta favorável. Observamos normalização dos níveis de IGF-I que correlacionou-se positivamente com a melhora do crescimento, em concordância com os dados de Noordam *et al*, que também demonstrou correlação positiva entre ganho de altura e incremento de IGF-I no primeiro ano de tratamento¹⁰.

Pela primeira vez, correlacionou-se a presença de mutações no *PTPN11* e resposta ao hGH. Antes do início da terapia, os grupos com e sem mutação eram semelhantes em todos os aspectos, e foram tratados com a mesma dosagem de hGH. Apesar dos parâmetros iniciais similares, pacientes sem mutação apresentaram, em todos os períodos, tendência a melhor velocidade de crescimento que se traduziu em ganho de altura no terceiro ano de tratamento estatisticamente significativo, fato que poderia indicar influência negativa das mutações no tratamento em longo prazo. Os pacientes com mutação eram mais jovens e foram tratados por período mais prolongado do que aqueles sem

mutação, entretanto ainda evoluíram de forma menos favorável. Esse fato reforça a sugestão de efeito negativo das mutações sobre a resposta ao tratamento com hGH, cuja resposta usualmente é negativamente relacionada à idade ao início da terapia. Adicionalmente, observamos menor aumento nos níveis de IGF-I nos pacientes com mutação. Acreditamos, então, que as mutações no *PTPN11* possam apresentar efeito negativo parcial nas ações do GH, que só pôde ser observado após longo tempo de terapia.

O estudo do grupo composto por pais de pacientes com SN teve como motivação uma única descrição de progenitor de paciente com SN que possuía mutação sem, contudo, apresentar o fenótipo da doença²⁴, o que sugere a possibilidade de quadros mais leves ou de penetrância incompleta. Em nosso estudo, com exceção de um pai portador de SN, não identificamos mutações no grupo composto por pais não afetados dos pacientes que apresentaram mutações, indicando o surgimento de mutações *de novo* como a principal causa desta síndrome. O fato de um gene tão conservado ser sede de tantas mutações *de novo* parece intrigante. Entretanto, mutações de novo ocorrem com grande frequência em diversas doenças autossômicas dominantes (síndrome de Rett⁹⁶, neurofibromatose⁹⁷, NEM 2A e 2B^{98,99}, retinoblastoma¹⁰⁰, síndrome de Von Hippel-Lindau¹⁰¹, hemofilia B¹⁰²)¹⁰³. A maior porcentagem dessas doenças tem origem paterna, embora haja variação dependendo do gene e do tipo de evento mutacional. No caso do *PTPN11*, estudo de segregação de 49 famílias britânicas estabeleceu a transmissão como de origem paterna em todos os casos, relacionada com idade paterna avançada¹⁰³. Os pais de pacientes com SN sem mutação no *PTPN11* eram quatro anos mais velhos que os pais da população

controle, enquanto que os pais de pacientes com mutação eram 6,1 anos mais velhos (idade média de 35,6 anos)¹⁰³.

Além de pacientes com SN, estudamos um grupo de crianças com BEI. Esse grupo apresentava como estigma de SN apenas a baixa estatura. Os demais sinais de SN presentes eram variados e distribuídos de forma heterogênea nessa população. A altura em média era menor que a do grupo de SN. Além disso, apesar de normal, a altura alvo era mais baixa do que a dos pacientes com SN e somente quatro crianças tinham previsão de altura genética acima da média da normalidade. A contribuição genética na causa da baixa estatura nesse grupo fica evidente pela freqüência de outros membros da família com déficit de crescimento. As crianças não tinham outros critérios maiores de SN além da baixa estatura. Tinham alterações ecocardiográficas em 34,8%, incluindo defeitos valvares leves, sem repercussão clínica, mas em freqüência maior que na população geral. Nenhum desses defeitos leves, contudo, estava na valva pulmonar, a mais acometida na SN. Os outros sinais eram compostos principalmente por características crânio-faciais (palato ogival, epicanto, ponte nasal baixa e larga entre outros menos freqüentes), hipertelorismo mamário e clinodactilia.

Nessas crianças com baixa estatura idiopática, não se identificaram mutações no *PTPN11*. Este gene mostrou-se muito pouco polimórfico e extremamente conservado na sua região codificadora, sugerindo que sua estrutura é realmente importante para os mecanismos celulares. O achado isolado de polimorfismos poderia ter importância, pois, nos casos de doenças poligênicas, como é a baixa estatura, os polimorfismos podem indicar

predisposição genética. Porém os poucos polimorfismos encontrados em nossa amostra eram localizados em regiões intrônicas e ocorreram na mesma frequência nos pacientes com BEI e na população normal. Esse gene parece, então, não ter papel na BEI. Afinal, se em 42 pacientes com BE e estigmas de SN não encontramos mutações, é menos provável que elas existam em pacientes com BE sem estigmas.

No entanto, parece-nos nítido que esse grande e heterogêneo grupo de crianças com BEI é composto por várias enfermidades. A busca dessas etiologias é importante para a melhor distinção desses casos e para um melhor planejamento terapêutico. Como esses indivíduos apresentam sinais clínicos diversos e que não definem síndromes específicas, a busca da etiologia através do estudo de genes candidatos definidos pelo seu papel fisiológico ou pela sua participação em doenças que tenham baixa estatura como quadro clínico é uma boa tática. No caso do *PTPN11*, afastamos que mutações na região codificadora estejam envolvidas na etiologia da BEI, mas estudos com esse desenho podem identificar novas origens genéticas como causa de baixa estatura. À medida que se conhecerem melhor as cascatas de sinalização, surgirão outros genes candidatos a essa pesquisa. É provável, então, que se determine a etiologia de casos ainda indeterminados de SN, de algumas das mais de 850 síndromes dismórficas que cursam com baixa estatura e das condições atualmente designadas “baixa estatura idiopática”.

O crescente desenvolvimento tecnológico propiciará grandes avanços, tanto em relação ao diagnóstico e tratamento quanto ao aconselhamento genético. Poderemos confirmar a SN diagnosticada clinicamente em, pelo menos,

40-50% dos pacientes. Além disso, poderemos fazer testes farmacogenômicos de algumas doenças, ou seja, identificar qual subgrupo de pacientes responderá melhor ao tratamento. Assim, pacientes com SN sem mutação no *PTPN11* poderiam receber terapia com hGH com doses suprafisiológicas por tempo prolongado para correção de déficit estatural, enquanto que aqueles com mutação não se beneficiariam desse tratamento.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- 1 Identificamos sete diferentes mutações *missense* em heterozigoze do *PTPN11* já descritas em onze pacientes com síndrome de Noonan (42,3%) diagnosticados pelo score de van der Burgt
- 2 Dos pais estudados, um com fenótipo de SN apresentava a mesma mutação Y63C presente no filho, enquanto que nenhum dos pais com fenótipo normal apresentou mutação no *PTPN11*, indicando que a origem das mutações nesses propósitos foi *de novo*.
- 3 Não encontramos mutações no *PTPN11* em pacientes com baixa estatura idiopática que possuíam estigmas em número insuficiente para o diagnóstico de SN, o que indica que o escore de van der Burgt é adequado para o diagnóstico clínico da síndrome de Noonan e para seleção dos pacientes para estudo molecular.
- 4 Encontramos cinco polimorfismos intrônicos, e um polimorfismo silencioso exônico no gene *PTPN11* que não alteram a predição do sítio de *splicing* nos três grupos estudados. O polimorfismo mais encontrado, IVS7 -21 C>T, apresentou frequência semelhante nos grupos de estatura normal, baixa estatura idiopática e síndrome de Noonan, indicando não ter papel na baixa estatura.

- 5 Não encontramos correlação entre a presença de mutação no *PTPN11* e quaisquer características fenotípicas dos pacientes com SN.
- 6 Em relação à resposta ao tratamento com hGH, o grupo com mutação no *PTPN11* apresentou menor incremento de IGF-I e ganho de altura durante três anos de terapia, o que sugere efeito negativo das mutações sobre a resposta ao GH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Noonan, J. A.; Ehmke, D. Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease. **J Pediatr**, v.63, p.468,1963.
 2. Nora, J. J.; Nora, A. H.; Sinhá, A. K.; Spangler, R. D.; Lubs, H. A. The Ullrich-Noonan Syndrome (Turner Phenotype). **Am J Dis Child**, v.127, p.48-55,1974.
 3. Jones, K. L. **Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation**. 5th edition, 1997.
 4. Ranke, M. B.; Heidemann, P.; Knupfer, C.; Enders, H.; Schmaltz, A. A.; Bierich, J. R. Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases. **Eur J Pediatr**, v.148(3), p.220-227, 1988.
 5. van der Burgt, I.; Berends, E.; Lommen, E.; van Beersum, S.; Hamel, B.; Mariman, E. Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. **Am J Med Genet**, v.53, p.187-91,1994
 6. Duncan, W.J.; Fowler, R. S.; Farkas, L. G.; Ross, R. B.; Wright, A.W.; Bloom, K. R.; Huot, D. J.; Sondheimer, H. M.; Rowe, R. D. A comprehensive scoring system for evaluating Noonan syndrome. **Am J Med Genet**, v.10, p.37-50,1981.
 7. Mendez, H. M.; Opitz, J. M. Noonan syndrome: a review. **Am J Med Genet**, v.21, p.493-506,1985.
 8. Noonan, J. A.; Raajmakers, R.; Hall, B. D. Adult Height in Noonan Syndrome **Am J Med Genet** , v.123A, p.68-71,2003
 9. Ahmed, M. L.; Foot, A. B.; Edge, J. A.; Lamkin, V. A.; Savage, M. O.; Dunger, D. B. Noonan's syndrome: abnormalities of the growth hormone/IGF-I axis and the response to treatment with human biosynthetic growth hormone. **Acta Paediatr Scandi**, v.80(4), p.446-450,1991.
 10. Noordam, C.; van der Burgt, I.; Sweep, C. G.; Delemarre-van de Waal, H. A.; Sengers, R. C.; tten, B. J. Growth hormone (GH) secretion in children with Noonan syndrome: frequently abnormal without consequences for growth or response to GH treatment **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.54(1), p.53-9,2001.
 11. Thomas, B.C.; Stanhope, R. Long-term treatment with growth hormone in Noonan's syndrome. *Acta Paediatr*. v.82(10): p.853-855, 1993.
 12. Romano, A. A.; Blethen, S. L.; Dana, K.; Noto, R. A. Growth hormone treatment in Noonan syndrome: the National Cooperative Growth Study experience. **J Pediatr** v.128(5 Pt 2), p.S18-21,1996.
- * De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002
13. Cotterill, A.M.; McKenna, W.J.; Brady, A.F.; Sharland, M.; Elsayi, M.; Yamada, M.; Camacho-Hubner, C.; Kelnar, C.J.; Dunger, D.B.; Patton, M.A.; Savage, M.O. The

short-term effects of growth hormone therapy on height velocity and cardiac ventricular wall thickness in children with Noonan's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* v.81(6):p. 2291-2297, 1996.

14. De Schepper J, Otten BJ, Francois I, Bourguignon JP, Craen M, Van der Burgt I, Massa GG. Growth hormone therapy in pre-pubertal children with Noonan syndrome: first year growth response and comparison with Turner syndrome. **Acta Paediatr** v.86(9): p.943-6,1997.
15. Kirk, J M W; Betts, P R; Butler, G E; Donaldson, M D C; Dunger, D B; Johnston, D I; Kelnar, C J; Price, H D A; Wilton, P. The UK KIGS Executive Group on behalf of the participating centres. Short stature in Noonan syndrome: response to growth hormone therapy. **Arch Dis Child.** V.84:p. 440-443,2001.
16. Macfarlane, C.E.; Brown, D.C.; Johnston, B, L.; Patton, M.A.; Dunger, D.B.; Savage, M.O.; McKenna, W.J.; Kelnar, C.J.H. Growth Hormone Therapy and Growth in Children with Noonan's Syndrome: Results of 3 Years' Follow-Up. **J Clin Endocrinol Metab.** v.86: p.1953-1956,2001.
17. Ogawa, M.; Moryia, N.; Ikeda, H.; Tanae, A.; Tanaka, T. Ohyama, K.; Moro, O.; Yazawa, T.; Fujita, K.; Seino, Y.; Kubo, T.; Tanaka, H.; Nishi, Y.; Yoshimoto, M. Clinical Evaluation of Recombinant Human Growth Hormone in Noonan Syndrome. **Endocrine J.** v.51:p. 61-68,2004.
18. Noordam, K.; van der Burgt, I.; Brunner, H.G.; Otten, B.T. The relationship between clinical severity of Noonan's syndrome and growth, growth hormone (GH) secretion and response to GH treatment. *J Pediatr Endocrinol Metab.* v.15(2):p. 175-180, 2002.
19. Noonan, J. A. Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease. **Am J Dis Child**, v.116, p.373-80,1968.
20. Baird, P. A.; De Jong, B. P. Noonan's syndrome (XX and XY Turner phenotype) in three generations of a family. **J Pediatr**, v.80, p.110-4,1972.
21. van der Burgt, I.; Brunner, H. Genetic heterogeneity in Noonan syndrome: evidence for an autosomal recessive form. **Am J Med Genet.** v.4;94(1),p.46-51,2000.
22. Jamieson, C. R.; van der Burgt, I.; Brady, A. F.; van Reen, M.; Elswawi, M. M.; Hol, F.; Jeffery, S.; Patton, M. A.; Mariman, E. Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. **Nat Genet**, v.8, p.357-60,1994.
23. Ion, A.; Crosby, A. H.; Kremer, H.; Kenmochi, N.; Van Reen, M.; Fenske, C.; van der Burgt, I.; Brunner, H. G.; Montgomery, K.; Kucherlapati, R. S.; Patton, M. A.; Page, C.; Mariman, E.; Jeffery, S. Detailed mapping, mutation analysis, and intragenic polymorphism identification in candidate Noonan syndrome genes MYL2, DCN, EPS8, and RPL6. **J Med Genet**, v.37, p.884-6,2000.
24. Tartaglia, M.; Mehler, E. L.; Goldberg, R.; Zampino, G.; Brunner, H. G.; Kremer, H.; van der Burgt, I.; Crosby, A. H.; Ion, A.; Jeffery, S.; Kalidas, K.; Patton, M. A.; Kucherlapati, R. S.; Gelb, B. D. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. **Nat Genet**, v.29, p.465-8,2001.

25. Dechert, U.; Duncan, A. M. V.; Bastien, L.; Duff, C.; Adam, M.; Jirik, F. R. Protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 (PTPN11) is localized to 12q24.1-24.3. **Hum Genet**, v.96, p.609-615,1995.
26. Tartaglia, M.; Kalidas, K.; Shaw, A.; Song, X.; Musat, D. L.; van der Burgt, I.; Brunner, H. G.; Bertola, D. R.; Crosby, A.; Ion, A.; Kucherlapati, R. S.; Jeffery, S.; Patton, M. A.; Gelb, B. D. PTPN11 Mutations in Noonan Syndrome: Molecular Spectrum, Genotype- Phenotype Correlation, and Phenotypic Heterogeneity. **Am J Hum Genet**, v.70, p.1555-63,2002.
27. Sarkozy, A.; Conti, E.; Seripa, D.; Digilio, M. C.; Grifone, N.; Tandoi, C.; Fazio, V. M.; Di Ciommo, V.; Marino, B.; Pizzuti, A.; Dallapiccola, B. Correlation between PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. **J Med Genet.**, v.40(9), p.704-8,2003
28. Musante, L.; Kehl, H. G.; Majewski, F.; Meinecke, P.; Schweiger, S. et al. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. **Eur J Hum Genet**, v.11, p.201-206, 2002
29. Zenker, M.; Buheitel, G.; Rauch, R.; Koenig, R.; Bosse, K.; Kress, W.; Tietze, H-U.; Doerr, H-G.; Hofbeck, M.; Singer, H.; Reis, A.; Rauch, A. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. **J Pediatr**, v.144, p.368-374,2004.
30. Yoshida, R.; Hasegawa, T.; Hasegawa, Y.; Nagai, T.; Kinoshita, E.; Tanaka, Y.; Kanagane, H.; Ohyama, K.; Onishi, T.; Hanew, K.; Okuyama, K.; Onishi, T.; Hanew,K.; Okuyama, T.; Horikawa, R.; Tanaka, T.; Ogata, T. Protein-Tyrosine Phosphatase, nonreceptor type 11 mutation analysis and clinical assessment in 45 patients with Noonan syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89(7), p.3359-3364, 2004.
31. Maheshwari, M.; Belmont, J.; Fernbach, S.; Ho, T.; Molinari, L.; Yakub, I.; Yu, F.; Combes, A.; Towbin, J.; Craigen, W. J.; Gibbs, R. PTPN11 mutations in Noonan syndrome type I: detection of recurrent mutations in exons 3 and 13 **Hum Mutat.**; v.20(4),p.298-304,2002.
32. Tartaglia, M.; Niemeyer, C. M.; Fragale, A.; Song, X.; Buechner, J. et al. Somatic mutations in PTPN11 in Juvenile Myelomonocytic Leukemia, myelodysplastic syndromes and Acute Myeloid Leukemia. **Nat Genet**, v.34(2), p.148-150,2003.
33. Kosaki, K.; Suzuki, T.; Muroya, K.; Hasegawa, T.; Sato, S. et al PTPN11 (Protein-Tyrosine Phosphatase, Nonreceptor-Type11) Mutations in Seven Japanese Patients with Noonan Syndrome **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, p.3529-3533,2002.
34. Loh, M. L.; Vattikuti, S.; Schubbert, S.; Reynolds, M. G.; Carlson, E.; Lieuw, K. H.; Cheng, J. W.; Lee, C. M.; Stokoe, D.; Bonifas, J. M.; Curtiss, N. P.; Gotlib, J.; Meshinchi, S.; Le Beau, M. M.; Emanuel, P. D.; Shannon, K. M. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis **Blood**, v.103(6), p.2325-31,2004.

35. Schollen, E.; Matthijs, G.; Gewillig, M.; Fryns, J. P.; Legius, E. PTPN11 mutation in a large family with Noonan syndrome and dizygous twinning **Eur J Hum Genet**, v.11(1), p.85-8,2003.
36. Jongmans, M.; Sistermans, E.; Rikken, A.; Nillesen, W.M.; Tamminga, R.; Patton, M.; Maier, E.M.; Tartaglia, M.; Noordam, K.; van der Burgt, I. Genotypic and phenotypic characterization of Noonan syndrome: new data and review of the literature. *Am J Med Genet*. v.134A: p.165-170, 2005
37. Digiglio, M. C.; Conti, E.; Sarkozy, A.; Mingarelli, R.; Dottorini, T. et al. Grouping of Multiple-Lentigines/LEOPARD and Noonan Syndromes on the PTPN11 Gene. **Am J Hum Genet**, v.71, p.389-394,2002.
38. Digiglio, M.C.; Pacileo, G.; Sarkozy, A. Limongelli, G.; Conti, E.; Cerrato, F.; Marino, B.; Pizzuti, A.; Calabro, R.; Dallapiccola, B. Familial aggregation of genetically heterogeneous hypertrophic cardiomyopathy: a boy with LEOPARD syndrome due to PTPN11 mutation and his nonsyndromic father lacking PTPN11 mutations. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. v. 70(2):p.95-98, 2004.
39. Legius, E.; Schrandt-Stumpel, C.; Schollen, E.; Pulles-Heintzberger, C.; Gewillig, M.; Fryns, J. P. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. **J Med Genet**, v.39, p.571-574, 2002.
40. Keren, B.; Hadchouel, A.; Saba, S.; Snajer, Y.; Bonneau, D.; Leheup, B.; Boute, O.; Gaillard, D.; Lacombe, D.; Layet, V.; Marlin, S.; Mortier, G.; Toutain, A.; Beylot, C.; Baumann, C.; Verloes, A.; Cavé, H.; for the French Collaborative Noonan Study Group. PTPN11 mutations in patients with LEOPARD syndrome: a French multicentric experience. *J Med Genet* v. 41: p.117-119, 2004.
41. Bertola, D.R.; Pereira, A.C.; de Oliveira, P.S.; Kim, C.A. Krieger, J.E. Clinical variability in a Noonan syndrome family with a new PTPN11 gene mutation. *Am J Med Genet A*. v.130(4):p.378-383, 2004.
42. Kalidas, K.; Shaw, A.C.; Crosby, A.H.; Newbury-Ecob, R.; Greenhalgh, L.; Temple, I.K.; Law, C.; Patel, A.; Patton, M.A.; Jeffery, S. Genetic heterogeneity in LEOPARD syndrome: two families with no mutations in PTPN11. *J Hum Genet*. v. 50(1):p.21-25, 2005.
43. Conti, E.; Dottorini, T.; Sarkozy, A.; Tiller, G.E.; Esposito, G.; Pizzuti, A.; Dallapiccola, B. A novel PTPN11 mutation in LEOPARD syndrome. *Hum Mutat*. v.21(6): p.654, 2003.
44. Sarkozy, A.; Conti, E.; Esposito, G.; Pizzuti, A.; Dallapiccola, B. et al. Nonsyndromic Pulmonary Valve Stenosis and the PTPN11 Gene. **Am J Med Genet**, v. 116A, p.389-390, 2003.
45. Kavamura, M. I.; Pomponi, M. G.; Zollino, M.; Lecce, R.; Murdolo, M. et al. PTPN11 mutations are not responsible for the cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome. **Eur J Hum Genet**, v.11, p.64-68, 2003.
46. Ion, A.; Tartaglia, M.; Song, X.; Kalidas, K.; van der Burgt, I. et al. Absence of PTPN11 mutations in 28 cases of cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome **Hum Genet**, v.111, p.421-427, 2002.

47. Troger, B.; Kutsche, K.; Bolz, H.; Luttgen, S.; Gal, A.; Almassy, Z.; Caliebe, A.; Freisinger, P.; Hobbiebrunken, E.; Morlot, M.; Stefanova, M.; Streubel, B.; Wieczorek, D.; Meinecke, P. No mutation in the gene for Noonan syndrome, PTPN11, in 18 patients with Costello syndrome. **Am J Med Genet.**, v.15;121A(1), p.82-4,2003.
48. Tartaglia, M.; Cotter, P. D.; Zampino, G.; Gelb, B. D.; Rauen, K. A. Exclusion of PTPN11 mutations in Costello syndrome: further evidence for distinct genetic etiologies for Noonan, cardio-facio-cutaneous and Costello syndromes, **Clin Genet.**, v.63(5), p.423-6,2003.
49. Ahmad, S.; Banville, D.; Zhao, Z.; Fischer, E. H.; Shen, S. H. A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90(6), p.2197-201,1993.
50. Feng, G. S.; Shen, R.; Heng, H. H.; Tsui, L. C.; Kazlauskas, A.; Pawson, T. Receptor-binding, tyrosine phosphorylation and chromosome localization of the mouse SH2-containing phosphotyrosine phosphatase. **Oncogene**, v.9(6), p.1545-50,1994.
51. Freeman, R. M.; Plutzky, J.; Neel, B. G. Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, p.11239-243,1992
52. Vogel, W.; Ullrich, A. Multiple in vivo phosphorylated tyrosine phosphatase SHP-2 engages binding to Grb2 via tyrosine 584 **Cell Growth Differ**, v.7(12),p.1589-97,1996.
53. Feng, G-S. Shp-2 Tyrosine Phosphatase: Signaling One Cell or Many **Exp Cell Res**, v.253, p.47-54,1999.
54. Stein-Gerlach, M.; Wallasch, C.; Ullrich, A. SHP-2, SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2. **Int J Biochem Cell Biol**, v.30, p. 559-566,1998.
55. Hof, P.; Pluskey, S.; Dhe-Paganon, S.; Eck, M. J.; Schoelson, S. E. Crystal Structure of the Tyrosine Phosphatase SHP-2. **Cell**, v.92, p.441-450,1998.
56. Bastien, L.; Ramachandran, C.; Liu, S.; Adam, M. Cloning, expression and mutational analysis of SH-PTP2, human protein-tyrosine phosphatase **Biochem Biophys Res Commun**, v.196(1), p.124-33,1993
57. Zhang, Z-Y. Protein Tyrosine Phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.42,p.209-234,2002.
58. Saxton, T. M.; Ciruna, B. G.; Holmyard, D.; Kulkarni, S.; Harpal, K.; Rossant, J.; Pawson, T. The SH2 tyrosine phosphatase shp2 is required for mammalian limb development **Nat Genet**, v.24(4),p.420-3,2000.
59. van Vactor, D.; O'Reilly, A. M.; Neel, B. G. Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. **Curr Opin Genet Dev**, v.8,p.112-126,1998.

60. Gent, J.; van Kerkhof, P.; Roza, M.; Bu, G.; Strous, G.J. Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. *Proc Nat Acad Sci USA* v. 99(15):p.9858-9863, 2002.
61. Stone, R. L.; Dixon, J. E. Protein-tyrosine Phosphatases. **J Biol Chem**, v.269(50), p.31323-31326, 1994.
62. al-Harbi, M. M.; Qureshi, S.; Ahmed, M. M.; Raza, M.; Miana, G. A.; Shah, A. H. Studies on the antiinflammatory, antipyretic and analgesic activities of santolin. **Jpn J Pharmacol**, v.64(3), p.135-9, 1994.
63. Stofega, M. R.; Herrington, J.; Billestrup, N.; Carter-Su, C. Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B. **Mol Endocrinol** v.14, p.1338-1350.
64. Yamada, S.; Shiono, S.; Joo, A.; Yoshimura, A. control mechanism of JAK/STAT signal transduction pathway. **FEBS Lett**, v.534, p.190-196, 2003
65. Gronberg, M.; Wulf, B. S.; Rasmussen, J. S.; Kjeldsen, T.; Gammeltoft, S. Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. **J Biol Chem**, v. 268, p. 23435-23440, 1993.
66. Kharitonov, A.; Chen, Z.; Sures, I.; Wang, H.; Schilling, J.; Ullrich, A. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. **Nature**, v.386, p.181-186, 1997.
67. Maile, L. A.; Badley-Clarke, J.; Clemmons, D. R. Structural analysis of the role of the beta 3 subunit of the alpha V beta 3 integrin in IGF-I signaling **J Cell Sci**.v.114(Pt 7), p.1417-25, 2001
68. Maile, L. A.; Clemmons, D. R. Regulation of Insulin-like Growth Factor I receptor dephosphorylation by SHPS-1 and tyrosine phosphatase SHP-2. **J Biol Chem** v.277, p.8955-8960, 2002
69. Maile, L. A.; Clemmons, D. R. The $\alpha V\beta 3$ Integrin Regulates Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptor Phosphorylation by Altering the Rate of Recruitment of the Src-Homology 2-Containing Phosphotyrosine Phosphatase-2 to the Activated IGF-I Receptor. **Endocrinology** v.143(11): p.4259 –4264, 2003
70. Belin, V.; Cusin, V.; Viot, G.; Girlich, D.; Toutain, A.; Moncla, A.; Vekemans, M.; Le Merrer, M.; Munnich, A.; Cormier-Daire, V. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). **Nat Genet**, v.19, p.67-9, 1998.
71. Rao, E.; Weiss, B.; Fukami, M.; Rump, A.; Niesler, B.; Mertz, A.; Muroya, K.; Binder, G.; Kirsch, S.; Winkelmann, M.; Nordsiek, G.; Heinrich, U.; Breuning, M. H.; Ranke, M. B.; Rosenthal, A.; Ogata, T.; Rappold, G. A. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. **Nature Genet**, 16: 54-63, 1997
72. Rosenfeld, R. G. A SHOX to the system. **J Clin Endocrinol Metab**, V.86(20), p.5674-5680, 2001.

73. Ross, J. L.; Scott, C. Jr.; Marttila, P.; Kowal, K.; Nass, A.; Papenhausen, P.; Abboudi, J.; Osterman, L.; Kushner, H.; Carter, P.; Ezaki, M.; Elder, F.; Wei, F.; Chen, H.; Zinn, A. R. Phenotypes Associated with SHOX Deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86(12),p.5674-80,2001.
74. Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadoupoulou E, Reinehr T, Onigata K, Ogata T. Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. **J Clin Endocrinol Metab** v.87, p.1402-6, 2002.
75. Souza, S. C. A. L. **Estudo das mutações e deleções do Gene SHOX em pacientes com baixa estatura idiopática, discondrosteose e síndrome Noonan** Tese (Doutorado em Endocrinologia e Metabologia).Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo, FMUSP, Brasil, 1999
76. Tanner, J. M.; Whitehouse, R. H. Height and weight charts from birth to 5 years allowing for length of gestation. For use in infant welfare clinics **Arch Dis Child**, v.48(10),p786-9,1973
77. Silva, E. G.; Shessarenko, N.; Arnhold, I. J.; Batista, M. C.; Estefan, V.; Osorio, M. G.; Marui, S.; Mendonca, B. B. GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. **Horm Res**. v.59(5), p.229-33,2003.
78. Miller, S. A; Dykes, D. D.; Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res** v.16:p.1215,1988.
79. Greulich, W.W.; Pyle, S.I. Radiographic atlas os skeletal development of the hand and wrist, 2 ed. Stanford University Press, Stanford.
80. Van Vliet, G.; Styne, D.M.; Kaplan, S.L; Grumbach, M.M. Responder: increase in height velocity of at least 2 cm per year. Growth hormone treatment for short stature. **N Engl J Med**. v.309(17):p.1016-22,1983
81. Saxton, T. M.; Henkemeyer, M.; Gasca, S.; Shen, R.; Rossi, D. J.; Shalaby, F.; Feng, G-S.; Pawson, T. Abnormal mesoderm patterning in mouse embryous mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. **EMBO j**, v.16(9), p.2352-2364, 1997
82. Stofega, M. R.; Herrington, J.; Billestrup, N.; Carter-Su, C. Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B. **Mol Endocrinol**, v.14(9), p.1338-50,2000.
83. Kim, S.; Jiang, J.; Yi, W.; Fengi, G. S.; Frank, S. J. Involvement of the Src Homology 2-containing Tyrosine Phosphatase SHP-2 in Growth Hormone Signaling. **J Biol Chem**, v. 273, No. 4, p. 2344–2354, 1998.
84. Stofega, M. R.; Wang, H.; Ullrich, A.; Carter-Su, C. Growth Hormone Regulation of SIRP and SHP-2 Tyrosyl Phosphorylation and Association. **J Biol Chem**, v. 273, No. 12, p. 7112–7117, 1998.

85. Ouwens, D. M.; van der Zon, G. C.; Maassen, J. A. Modulation of insulin-stimulated glycogen synthesis by Src Homology Phosphatase 2. **Mol Cell Endocrinol**, v.175(1-2),p.131-40,2001.
86. Carpenter LR, Farruggella TJ, Symes A, Karow ML, Yancopoulos GD, Stahl N Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95(11),p.6061-6,1998
87. Kita, A.; Uotani, S.; Kuwahara, H.; Takahashi, R.; Oshima, K.; Yamasaki, H.; Mizugushi, H.; Hayakawa, T.; Nagayama, Y.; Yamagushi, Y.; Eguchi, K. Vanadate enhances leptin-induced activation of JAK/STAT pathway in CHO cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.303, p.805-809,2003.
88. Chughtai, N.; Schimchowitsch, S.; Lebrun, J. J.; Ali, S. Prolactin Induces SHP-2 Association with Stat5, Nuclear Translocation, and Binding to the β -Casein Gene Promoter in Mammary Cells. **J Biol Chem** v.277(34), p.31107-31114, 2002
89. Ali S, Nouhi Z, Chughtai N, Ali S SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. **J Biol Chem**,v.278(52),p.52021-31,2003
90. Berchtold S, Volarevic S, Moriggl R, Mercep M, Groner B. Dominant negative variants of the SHP-2 tyrosine phosphatase inhibit prolactin activation of Jak2 (janus kinase 2) and induction of Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5)-dependent transcription. **Mol Endocrinol**, v.12(4),p.556-567,1998.
91. Ali, S.; Ali, S. Recruitment of the protein-tyrosine phosphatase SHP-2 to the C-terminal tyrosine of the prolactin receptor and to the adaptor protein Gab2. **J Biol Chem**, v.275(50),p.39073-80,2000
92. Ali, S.; Chen, Z.; Lebrun, J. J.; Vogel, W.; Kharitonov, A.; Kelly, P. A.; Ullrich, A. PTP1D is a positive regulator of the prolactin signal leading to beta-casein promoter activation. **EMBO J**, v.2;15(1),p.135-42,1996.
93. Markova B, Herrlich P, Ronnstrand L, Bohmer FD. Identification of protein tyrosine phosphatases associating with the PDGF receptor. **Biochemistry**, v.42(9),p.2691-9,2003
94. Kuhne MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GS. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp **J Biol Chem**, v.268(16),p.11479-81,1993.
95. Diretriz para indicações e utilização da ecocardiografia na prática clínica. Arq Bras Cardiol, v.82(Supl.II),2004
96. Trappe, R.; Laccone, F.; Cobilanschi, J.; Meins, M.; Huppke, P.; Hanefeld, F.; Engel, W. MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet*. v.68:p.1093-1101,2001.
97. Jadayel, D.; Fain, P.; Upadhyaya, M.; Ponder, M.A.; Huson, S.M.; Carey, J.; Fryer, A.; Mathew, C.G.; Barker, D.F.; Ponder, B.A. Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature*. V.343:p.558-559,1990.

98. Carlson, K.M.; Bracamontes, J.; Jackson, C.E.; Clark, R.; Wells, S.A.Jr, Goodfellow, P.J. Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2b. *Am J Hum Genet.* v.55:p.1076-1082,1994.
99. Schuffenecker, I.; Ginet, N.; Goldgar, D.; Eng, C.; Chambe, B.; Boneu, A.; Houdent, C.; Pallo, D.; Schlumberger, M.; Thivolet, C.; Lenoir, G.M.; Le Groupe d'Étude des Tumeurs a Calcitonine. Prevalence and parental origin of *de novo* RET mutations in multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet.* v.60:p.233-237,1997.
100. Zhu,X.P.; Dunn, J.M.; Phillips, R.A.; Goddard, A.D.; Paton, K.E.; Becker, A.; Gallie, B.L. Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma. *Nature.* V.340:p.312-313, 1989.
101. Richards, F.M.; Payne, S.J.; Zbar, B.; Affara, N.A.; Ferguson-Smith, M.A.; Maher, E.R. Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. *Hum Mol Genet*, v.4:p.2139-2143, 1995.
102. Ketterling, R.P.; Vielhaber,E.; Li,X.; Drost, J.; Schaid, D.J.; Kasper, C.K.; Phillips, J.A.III; Koerper, M.A.; Kim, H.; Sexauer, C.; Gruppo, R.; Ambriz, R.; Paredes, R.; Sommer, S.S. Germline origins in the human F9 gene: frequent G:C→A:T mosaicism and increased mutations with advanced maternal age. *Hum Genet.* v.105:p.629-640, 1997.
103. Tartaglia, M.; Cordeddu, V.; Chang, H.; Shaw, A.; Kalidas, K.; Crosby, A.; Patton, M. A.; Sorcini, M.; van der Burgt, I.; Jeffery, S.; Gelb, B.D. Paternal germline origin and sex-ratio distortion in transmission of PTPN11 mutations in Noonan syndrome. *Am J Med Genet.* v.75: 000-000, 2004.