RENATA DA CUNHA SCALCO

**Estudo da mutação da *STAT5B* em Criciúma –
Santa Catarina: frequência e caracterização
fenotípica de indivíduos heterozigotos**

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de
Lima Jorge

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Scalco, Renata da Cunha

Estudo da mutação da STAT5B em Criciúma – Santa Catarina : frequência e caracterização fenotípica de indivíduos heterozigotos / Renata da Cunha Scalco. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Estatura/genética 2.Fatores de transcrição STAT/genética
3.População/genética 4.Biologia molecular/métodos 5.Síndrome de Laron/genética

USP/FM/DBD-241/15

Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia Genética (LIM/25) e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42), Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através dos processos 2010/19809-6 e 2011/15078-0.

Dedicatória

A Sinéia Domingos Melo,
exemplo de perseverança e fé.

Agradecimientos

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Onivaldo Scalco e Márcia Regina Garcia da Cunha Scalco, pelo incentivo constante e pela dedicação em me proporcionar as condições necessárias para que eu pudesse alcançar meus objetivos, e ao meu marido, Rafael Pereira Tirapeli, pelo apoio e paciência em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador, Alexander Augusto de Lima Jorge, pelo estímulo, amizade e disponibilidade. Agradeço também às Prof^{as}. Dr^{as}. Berenice Bilharinho Mendonça e Ana Claudia Latronico pela oportunidade de ter realizado o doutorado neste serviço e ao Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold pela confiança e pelos conhecimentos compartilhados.

Agradeço às amigas que fiz neste período, com quem dividi alegrias e preocupações: Alexsandra Christianne Malaquias de Moura Ribeiro, Gabriela de Andrade Vasques, Ana Pinheiro Machado Canton, Andria Carla Vito Lido, Fernanda de Azevedo Correa, Adriana Farrant Braz, Aline Pedrosa Otto, Marcela Moura França e Andrea de Castro Leal.

Agradeço aos funcionários dos laboratórios LIM/25 e LIM/42, em especial às biólogas Mariana Ferreira de Assis Funari e Rosana Midori Aracava, pelo suporte essencial na bancada, à biomédica Maria Aparecida Medeiros Stavale Ultra e às secretárias Francinilda da Silva Pereira Oliveira e Eliete Helena Santiago pela ajuda em vários momentos.

Agradeço ao Dr. Carlos André Tonelli, por ter aberto os caminhos para as coletas de amostras de controles em Criciúma e ao Dr. Júlio Cezar Cechinel, por ter disponibilizado seu laboratório para as coletas de amostras das famílias. Agradeço também aos funcionários do Centro de Especialidades em Saúde e do Laboratório Pasteur de Criciúma, em especial a Leandro Machado, sempre prestativo.

Agradeço aos Drs. Edelson Flávio Morato, Aguinaldo Roberto Pinto e Mariana Borsa, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela extração dos linfócitos posteriormente enviados ao laboratório da Dr^a. Kari Nadeau da Universidade de Stanford.

Agradeço aos nossos colaboradores, em especial à Dra. Cintia Fridman e a Fernanda Toledo Gonçalves pelo estudo dos haplogrupos do cromossomo Y e do DNA mitocondrial, e a Vivian Hwa pelo importante auxílio com os artigos.

Agradeço a todos os participantes da pesquisa, em especial aos membros das famílias afetadas pela mutação c.424_427del da *STAT5B*, por terem cedido seu tempo e seus dados. Agradeço principalmente a Sinéia Domingos Melo, cujo apoio e participação ativa tornaram possível este estudo.

Agradeço, por fim, a Deus pela proteção constante e por ter me cercado de todas essas pessoas.

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

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

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Sinalização do hormônio de crescimento.....	2
1.2	Insensibilidade ao hormônio de crescimento.....	3
1.3	Caracterização da <i>STAT5B</i>	5
1.4	Mutações na <i>STAT5B</i>	8
1.5	Caracterização dos pacientes com mutações em homozigose na <i>STAT5B</i>	9
1.5.1	Quadro clínico.....	9
1.5.2	Alterações laboratoriais.....	12
1.6	Mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> na região de Criciúma – Santa Catarina e a possível participação do efeito fundador.....	14
1.7	Efeito de mutações em heterozigose em outros genes associados ao crescimento sobre a variabilidade da altura.....	16
2.	OBJETIVOS.....	18
3.	MÉTODOS.....	20
3.1	Considerações éticas.....	21
3.2	Casuística.....	21
3.2.1	Avaliação da frequência da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> em Criciúma.....	21
3.2.2	Avaliação do fenótipo da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> em heterozigose.....	22
3.2.3	Avaliação do impacto das mutações descritas da <i>STAT5B</i> em heterozigose.....	24
3.3	Estudo da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i>	24
3.3.1	Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos.....	24
3.3.2	Genotipagem da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> através da técnica de análise de fragmentos.....	26
3.4	Avaliação da presença de efeito fundador.....	28
3.4.1	Análise de microssatélites.....	28
3.4.2	Análise dos haplogrupos do cromossomo Y e do DNA mitocondrial.....	29
3.5	Análise fenotípica.....	30
3.5.1	Avaliação antropométrica.....	30
3.5.2	Entrevista.....	31
3.5.3	Avaliação laboratorial.....	31

3.6	Sequenciamento completo do exoma	32
3.7	Genotipagem de variante alélica da <i>Janus quinase 3</i> encontrada no sequenciamento exômico	33
3.8	Frequência de variantes alélicas patogênicas da <i>STAT5B</i> em outras populações	34
3.9	Análise estatística	35
4.	RESULTADOS.....	36
4.1	Avaliação da frequência da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> em heterozigose na população de Criciúma.....	37
4.2	Avaliação da segunda família possivelmente afetada por mutações da <i>STAT5B</i>	39
4.3	Análise da origem da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i>	39
4.3.1	Origem relatada das famílias	39
4.3.2	Análise de microssatélites	40
4.3.3	Análise dos haplogrupos do cromossomo Y e do mtDNA	41
4.4	Fenótipo dos heterozigotos para a mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i>	43
4.5	Sequenciamento completo do exoma de uma familiar heterozigota para a mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i>	48
4.6	Genotipagem da variante c.1627 G>C da <i>Janus quinase 3</i> (<i>JAK3</i>)	50
4.7	Impacto das mutações da <i>STAT5B</i> em heterozigose sobre a altura	52
5.	DISCUSSÃO.....	55
5.1	Frequência da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> em heterozigose na população de Criciúma e possibilidade de recorrência de homozigose	56
5.2	O efeito fundador e a origem da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i>	57
5.3	Modelos para a base genética de caracteres complexos.....	58
5.4	Fenótipo da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> em heterozigose.....	59
5.5	Impacto das mutações da <i>STAT5B</i> em heterozigose sobre a altura	60
5.6	A participação de mutações raras com efeito moderado sobre a variabilidade de altura	61
6.	CONCLUSÕES.....	63
7.	ANEXOS	65
8.	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICES	86

Listas

Lista de abreviaturas

ALS	<i>Acid-labile subunit</i> ; subunidade ácido-lábil
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
DCC	Domínio <i>coiled-coil</i>
DLD	Domínio de ligação ao DNA
DN	Domínio N-terminal
DT	Domínio C-terminal de transativação
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
Escore Z	Escore de desvio-padrão para idade e sexo
ESP	<i>NHLBI-GO Exome Sequencing Project</i>
Et al	E outros
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GCSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> ; fator estimulador de colônias de granulócitos
GH	<i>Growth hormone</i> ; hormônio do crescimento
GHBP	<i>Growth hormone binding protein</i> ; proteína de ligação ao hormônio de crescimento
GHI	<i>Growth hormone insensitivity</i> , insensibilidade ao hormônio de crescimento
GHR	<i>Growth hormone receptor</i> ; receptor do hormônio de crescimento
GHRH	<i>Growth hormone releasing hormone</i> ; hormônio liberador do hormônio de crescimento
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> ; estudos de associação genômica ampla
HT	Heterozigoto
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> ; fator de crescimento insulina-símile 1
IGFALS	Gene da subunidade ácido-lábil

IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i> ; proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de interleucina 2
IL2RA	Subunidade alfa do receptor de interleucina 2
IP-3K	<i>Inositol-trisphosphate 3-kinase</i> ; fosfatidilinositol 3-quinase
JAK2	Janus quinase 2
JAK3	Janus quinase 3
L	Região ligante
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> ; quinases proteicas ativadas por mitógenos
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não disponível
NK	Linfócitos <i>natural killer</i>
NOD	<i>Non-obese diabetic</i> ; diabéticos não obesos
N.S.	Não significativo
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
P	Fosforilação
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; reação em cadeia da polimerase
rhGH	Hormônio do crescimento recombinante humano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SH2	Domínio de homologia a Src 2
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
STAT5A	<i>Signal transducer and activator of transcription-5A</i> ; transdutor de sinal e ativador de transcrição 5A
STAT5B	<i>Signal transducer and activator of transcription-5B</i> ; transdutor de sinal e ativador de transcrição 5B
Treg	Linfócitos T reguladores
Tris-HCl	Hidrocloreto de tris (hidroximetil) aminometano
WT	<i>Wild type</i> ; homozigoto para o alelo normal

Lista de símbolos

=	Igual a
<	Menor que
±	Mais ou menos
céls/mm ³	Células por milímetro cúbico
cm	Centímetro
cM	Centimorgan
g/dl	Gramas por decilitro
kg	Quilograma
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Microlitro
µUI/ml	Microunidades internacionais por mililitro
mg/dl	Miligramas por decilitro
mg/ml	Miligrama por mililitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanograma
ng/µl	Nanograma por microlitro
ng/ml	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
pmol	Picomol
UI/ml	Unidades internacionais por mililitro

Lista de figuras

- Figura 1 -** Papel da STAT5B na transdução do sinal do hormônio de crescimento e da interleucina-2 4
- Figura 2 -** Representação dos 19 éxons do gene *STAT5B*, dos domínios da proteína STAT5B e das mutações descritas até o momento 6
- Figura 3 -** Localização do município de Criciúma no estado de Santa Catarina e no Brasil..... 14
- Figura 4 -** Estratégia para a avaliação da frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* em Criciúma 23
- Figura 5 -** Estratégia para a avaliação do fenótipo da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose..... 23
- Figura 6 -** Resultado da análise de fragmentos de DNA em eletroforese capilar de amostras representativas de indivíduos homozigotos para o alelo normal (não portadores), heterozigotos e homozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B*..... 27
- Figura 7 -** Heredograma das famílias identificadas com a mutação c.424_427del da *STAT5B*..... 44
- Figura 8 -** Comparação do escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) de altura de adultos da população da região de Criciúma, do grupo de familiares não portadores da mutação c.424_427del da *STAT5B* e do grupo de indivíduos heterozigotos para esta mutação 47

Figura 9 -	Comparação do escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) de IGF-1 e IGFBP-3 entre o grupo de familiares não portadores da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> (WT) e o grupo de indivíduos heterozigotos para esta mutação .(HT)	48
Figura 10 -	Heredograma dos pacientes avaliados para a variante alélica c.1627 G>C na <i>JAK3</i>	51
Figura 11 -	Número de indivíduos heterozigotos para mutações na <i>STAT5B</i> em cada escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) da altura	54
Figura 12 -	Número de indivíduos homozigotos (em azul) e heterozigotos (em laranja) para mutações na <i>STAT5B</i> em cada escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) da altura.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Resumo dos principais achados clínicos dos pacientes com mutações da <i>STAT5B</i> em homozigose descritos na literatura	11
Tabela 2 -	Resumo dos principais achados laboratoriais dos pacientes com mutações da <i>STAT5B</i> em homozigose descritos na literatura	13
Tabela 3 -	Frequências alélicas de variantes patogênicas da <i>STAT5B</i> encontradas no estudo atual e em bases de dados públicas (ESP e ExAC)	38
Tabela 4 -	Resultados dos haplogrupos do cromossomo Y e do DNA mitocondrial	42
Tabela 5 -	Comparação entre indivíduos não portadores da mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i> e seus familiares heterozigotos para a mesma	45
Tabela 6 -	Genes associados a pneumopatias de causa hereditária	50
Tabela 7 -	Dados dos pacientes homozigotos para mutações na <i>STAT5B</i> e de seus familiares de primeiro grau	53

Lista de anexos

Anexo A -	Termo de consentimento livre e esclarecido	66
Anexo B -	Dados clínicos dos indivíduos heterozigotos para a mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i>	70
Anexo C -	Dados clínicos dos indivíduos homozigotos para o alelo normal da <i>STAT5B</i>	71
Anexo D -	Exames gerais dos pacientes heterozigotos para a mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i>	72
Anexo E -	Exames gerais dos indivíduos homozigotos para o alelo normal da <i>STAT5B</i>	73
Anexo F -	Exames hormonais dos indivíduos heterozigotos para a mutação c.424_427del da <i>STAT5B</i>	74
Anexo G -	Exames hormonais dos indivíduos homozigotos para o alelo normal da <i>STAT5B</i>	75

Lista de apêndices

- Apêndice A -** Scalco RC, Pugliese-Pires PN, Jorge AAL. Deficiência da *STAT5B*: uma nova síndrome de insensibilidade ao hormônio de crescimento associada a acometimento imunológico. Arq Bras Endocrinol Metab 2013; 57(5):333-338.
- Apêndice B -** Scalco RC, Hwa V, Domené HM, Jasper HG, Belgorosky A, Marino R, Pereira AM, Tonelli CA, Wit JM, Rosenfeld RG, Jorge AAL. *STAT5B* mutations in heterozygous state have negative impact on height: another clue in human stature heritability. European Journal of Endocrinology. 2015;173..

Resumo

Scalco RC. *Estudo da mutação da STAT5B em Criciúma – Santa Catarina: frequência e caracterização fenotípica de indivíduos heterozigotos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Mutações inativadoras em homozigose no gene do transdutor de sinal e ativador de transcrição 5B (*STAT5B*) causam insensibilidade ao hormônio de crescimento associada a disfunção imunológica grave que se manifesta na forma de infecções exacerbadas e de repetição, pneumonia intersticial linfocítica e outros eventos autoimunes. A caracterização do fenótipo destas mutações em heterozigose não foi realizada previamente. Dois pacientes descritos com mutação em homozigose na *STAT5B* (c.424_427del / p.L142RfsX19) são irmãos brasileiros naturais de Criciúma – Santa Catarina, sem consanguinidade conhecida na família. Houve também o relato de dois outros casos semelhantes na cidade, já falecidos, sugerindo que mutações na *STAT5B* pudessem ser relativamente frequentes nesta região. Os objetivos deste estudo foram investigar a frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* na população de Criciúma, avaliar a existência de efeito fundador e caracterizar o efeito da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose sobre o fenótipo antropométrico e hormonal. Para investigar a frequência desta mutação em Criciúma, 1192 indivíduos da população foram genotipados. Foram identificados sete indivíduos heterozigotos, caracterizando uma frequência alélica mínima de 0,29% (intervalo de confiança 95%: 0,08 a 0,5%), significativamente mais alta que a frequência de outras variantes patogênicas da *STAT5B* descritas em bases de dados públicas. Utilizando-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi possível estimar a incidência de casos de homozigotos para o alelo mutado em um a cada 40 anos. No entanto, utilizando-se a maior frequência possível de acordo com o intervalo de confiança, esta incidência poderia atingir um a cada 13 anos. Além disso, foram estudados os pais dos dois casos relatados como semelhantes aos pacientes homozigotos para mutações na *STAT5B* e estes pais eram portadores da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose. Para avaliar o efeito fundador, foram analisados dois marcadores próximos à mutação c.424_427del da *STAT5B* nos pacientes homozigotos para a mesma, em 33 indivíduos heterozigotos de sete famílias independentes e em 53 indivíduos controles. O mesmo haplótipo estava presente nos pacientes homozigotos para a mutação e em todos os heterozigotos, enquanto em apenas 9,4% dos controles ($p < 0,001$), apontando a probabilidade de que a mutação c.424_427del nas diferentes famílias tenha sido herdada de um antepassado em comum. Para avaliar o efeito da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose, foram comparados em conjunto os 33 indivíduos heterozigotos e os 38 familiares não portadores em relação à altura e a alguns exames laboratoriais (gerais e

hormonais). Os indivíduos heterozigotos foram significativamente mais baixos, com uma redução na altura de 0,6 desvios-padrão ($p = 0,006$). Também apresentaram redução significativa dos desvios-padrão de fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1) e da proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile (IGFBP-3), sem alteração em outros exames. Esses achados mostram que as mutações na *STAT5B* em heterozigose causam um impacto negativo significativo na altura, mais leve que o visto em pacientes com mutações em homozigose, com altura dentro da variação normal. Esse resultado favorece a hipótese de que variantes patogênicas raras em heterozigose contribuem para a variabilidade da altura normal.

Descritores: estatura/genética; fatores de transcrição STAT/genética; população/genética; biologia molecular/métodos; síndrome de Laron/genética.

Summary

Scalco RC. *Study of STAT5B mutation in Criciúma – Santa Catarina: frequency and phenotypic characterization of heterozygous individuals* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Homozygous inactivating mutations in signal transducer and activator of transcription 5B gene (*STAT5B*) cause growth hormone insensitivity associated with signs of severe immune dysfunction, such as recurrent infections, lymphoid interstitial pneumonia and other autoimmune events. The phenotypic characterization of these mutations in heterozygous state has not been accomplished previously. Two patients with a homozygous *STAT5B* mutation (c.424_427del / p.L142RfsX19) are Brazilian brothers born in the city of Criciúma, Santa Catarina, and there is not known consanguinity in their family. Moreover, there was a report about two similar cases in this city, already deceased, suggesting that *STAT5B* mutations could be relatively frequent in this region. The objectives of this study were to evaluate the frequency of *STAT5B* c.424_427del mutation in Criciúma, to assess the existence of the founder effect and to characterize the effect of heterozygous *STAT5B* c.424_427del mutation on anthropometric and hormonal phenotypes. To evaluate the frequency of this mutation in Criciúma, 1192 individuals from the population were genotyped. Seven heterozygous individuals were identified, which characterized a minimum allele frequency of 0.29% (95% confidence interval: 0.08 to 0.5%), significantly higher than the frequency of other pathogenic variants described in public databases. By using the Hardy-Weinberg law, it was possible to estimate the incidence of cases of individuals homozygous for this mutation at one every 40 years. However, by using the highest possible frequency according to the confidence interval, this incidence could reach one every 13 years. Additionally, the parents of the two reported cases who were similar to patients with homozygous *STAT5B* mutations were genotyped and these parents were heterozygous for *STAT5B* c.424_427del mutation. To assess the founder effect, two markers near the mutation were analyzed in the two boys homozygous for *STAT5B* c.424_427del mutation, in 33 heterozygous individuals from seven unrelated families and in 53 control individuals. The same haplotype was present in the homozygous boys and in all heterozygous individuals, while in only 9,4% control individuals ($p < 0,001$), pointing to the probability that *STAT5B* c.424_427del mutation in different families has been inherited from a common ancestor. To study the effects of heterozygous *STAT5B* c.424_427del mutation, 33 heterozygous individuals were compared to 38 non-carrier relatives on height and some laboratorial tests. Heterozygous individuals were significantly shorter than their non-

carrier relatives, with a height reduction of 0.6 standard deviation scores ($p=0,006$). Furthermore, they had a significant reduction in insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) standard deviation scores, without differences in the other exams. These findings show that heterozygous *STAT5B* mutations cause a significant negative impact on height, milder than the effect seen in patients with homozygous mutations, with height within the normal range. This result favors the hypothesis that rare pathogenic variants in heterozygous state contribute to normal height variability.

Descriptors: body height/genetics; STAT transcription factors/genetics; population/genetics; molecular biology/methods; Laron syndrome/genetics.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sinalização do hormônio de crescimento

O hormônio de crescimento (GH) é produzido e secretado pelos somatotrofos na adeno-hipófise sob a regulação principal de dois hormônios hipotalâmicos, o hormônio liberador do GH (GHRH; *growth hormone releasing hormone*) e a somatostatina. Cerca de 50% do GH circulante encontra-se ligado à proteína de ligação ao GH (GHBP; *growth hormone binding protein*), que é originada através da clivagem proteolítica do domínio extracelular do receptor de GH (GHR; *growth hormone receptor*) ⁽¹⁾.

O GH realiza as suas ações metabólicas e promotoras do crescimento através da ligação ao GHR, um receptor de membrana pertencente à família dos receptores de citocinas classe I ⁽²⁾. O GHR possui um único domínio transmembrana e não apresenta atividade enzimática intrínseca, devendo estar associado na sua porção intracitoplasmática a uma proteína com atividade de tirosina quinase conhecida como Janus quinase 2 (JAK2) para que ocorra a transdução do sinal intracelular. A ligação do GH a dois GHR que se encontram pré-dimerizados na superfície celular ⁽³⁾ promove uma alteração na conformação espacial da porção intracitoplasmática dos GHR, permitindo a fosforilação das JAK2. Uma vez fosforiladas, as JAK2 passam a fosforilar múltiplos resíduos de tirosina presentes nos GHR, gerando sítios de acoplamento para outras moléculas sinalizadoras ⁽³⁾.

Os GHR e as JAK2 ativam assim vias de sinalização comuns a vários receptores, como a via das quinases proteicas ativadas por mitógenos (MAPK; *mitogen-activated protein kinase*) e a via do fosfatidilinositol 3-quinase (IP-3K; *inositol-trisphosphate 3-kinase*), importantes para os efeitos metabólicos e para alguns efeitos proliferativos do GH. Além destas vias, os receptores de citocinas possuem uma via de sinalização própria que utiliza proteínas citoplasmáticas conhecidas como transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs; *Signal transducers and activators of transcription*) ⁽²⁾. Dentre as sete STATs conhecidas até o momento, a que exerce papel principal na transdução do sinal do GHR em humanos é a STAT5B. Esta, quando fosforilada, forma um dímero e se transloca para o núcleo, onde sua ligação aos elementos responsivos à STAT5B no ácido desoxirribonucleico (DNA; *deoxyribonucleic acid*) leva à expressão de diversos genes como o do fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1; *insulin-like growth factor 1*), da proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile (IGFBP-3; *insulin-like growth factor-binding protein 3*) e da subunidade ácido-lábil (ALS; *acid-labile subunit*) ⁽⁴⁾ (Figura 1).

1.2 Insensibilidade ao hormônio de crescimento

A insensibilidade ao hormônio de crescimento (GHI - *growth hormone insensitivity*, *Online Mendelian Inheritance in Man* - OMIM 262500) foi descrita pela primeira vez em 1966 por Laron ⁽⁵⁾ e é definida como a inabilidade dos tecidos-alvo em responder normalmente à ação do GH.

Figura 1 - Papel da STAT5B na transdução do sinal do hormônio de crescimento e da interleucina-2

ALS - subunidade ácido-lábil; GH - hormônio de crescimento; GHR - receptor do hormônio de crescimento; IGF-1 - fator de crescimento insulina-símile 1; IGFBP-3 - proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile; IL-2 - interleucina-2; IL-2R - receptor de IL-2; JAK 2 - janus quinase 2; P - fosforilação; STAT - transdutor de sinal e ativador de transcrição; Y - resíduos de tirosina.

O fenótipo clássico da GHI consiste em baixa estatura grave pós-natal associada a características faciais típicas também observadas em pacientes com deficiência congênita do GH (nariz em sela, fronte olímpica, esclera azulada, hipoplasia de face e cabelos esparsos), voz aguda e infantil, obesidade com distribuição centrípeta, micropênis nos meninos e história de hipoglicemia nos primeiros meses de vida ⁽⁵⁾. Os pacientes apresentam valores elevados ou inapropriadamente normais de GH, acompanhados de

concentrações baixas de IGF-1, e não respondem ao tratamento com GH exógeno ⁽⁵⁾.

A GHI é causada principalmente por mutações no *GHR*, sendo que mais de 70 mutações já foram descritas neste gene ⁽⁶⁾. Em 2003, foi relatado o caso da primeira paciente com GHI causada por uma mutação na via de sinalização pós *GHR*, no gene *STAT5B* ⁽⁷⁾. Desde então, foram descritos outros nove pacientes de sete famílias com mutações inativadoras em homozigose na *STAT5B* ⁽⁸⁻¹⁴⁾ e foi observado que, além das características clínicas encontradas na GHI secundária a mutações no *GHR*, esses pacientes também apresentam disfunção imunológica grave, com infecções exacerbadas e de repetição e eventos autoimunes.

1.3 Caracterização da *STAT5B*

O gene *STAT5B* está localizado no cromossomo 17q11.2 e é formado por dezenove éxons. Sua expressão é ubíqua e ele dá origem à proteína *STAT5B*, composta por 787 aminoácidos que se dividem em seis domínios: os domínios N-terminal e *coiled-coil*, responsáveis pelas interações proteína-proteína; um domínio de ligação ao DNA; uma região de ligação entre domínios sem função definida até o momento; um domínio de homologia a Src 2 (SH2), que permite a ligação das proteínas *STAT* a tirosinas fosforiladas de receptores ativados ou de outros peptídeos e a dimerização entre proteínas *STATs*; e um domínio C-terminal de transativação, crítico para a interação com outros fatores de transcrição ⁽⁴⁾ (Figura 2).

Figura 2 - Representação dos 19 éxons do gene *STAT5B*, dos domínios da proteína *STAT5B* e das mutações descritas até o momento

DCC - domínio *coiled-coil*; DLD - domínio de ligação ao DNA; DN - domínio N-terminal; DT - domínio C-terminal de transativação; L - região ligante; SH2 - domínio de homologia a Src 2; Y699 - resíduo de tirosina fosforilado na ativação das STATs.

A *STAT5* foi descrita inicialmente em 1994 como um fator de transcrição da glândula mamária induzido pela ação da prolactina ⁽¹⁵⁾. No ano seguinte, alguns estudos demonstraram de forma independente a existência de duas proteínas relacionadas com mais de 90% dos aminoácidos em comum, chamadas então de *STAT5A* e *STAT5B* ^(16, 17). Diversos trabalhos mostraram a participação dessas duas proteínas no crescimento, na sinalização da prolactina, no desenvolvimento das células T e da autotolerância em animais ⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Dentre os que avaliaram especificamente a ação da *STAT5B*, um estudo mostrou redução de 20 a 30% no tamanho de camundongos machos *knockout* para seu gene, acompanhada de redução no IGF-1, o que não foi visto nas fêmeas ⁽¹⁸⁾. Neste mesmo estudo, a deleção concomitante da *STAT5A* e da *STAT5B* resultou em uma redução no tamanho de

camundongos de ambos os sexos semelhante à observada em camundongos deficientes em GH ou em GHR. Outro trabalho mostrou redução na atividade citolítica de linfócitos *natural killer* (NK) em camundongos *knockout* para a *STAT5B*, o que não foi visto em camundongos *knockout* para a *STAT5A* ⁽²¹⁾

Interessantemente, foi descrita a presença de uma mutação *missense* (p.L327M) na *STAT5B* em camundongos NOD (*non-obese diabetic*), que são um modelo animal para o estudo de diabetes tipo 1 ⁽²²⁾. Em um estudo complementar a este, foi avaliado o efeito da superexpressão da *STAT5B* não mutada nos camundongos NOD e foi observado que houve redução da incidência de diabetes espontâneo e induzido por ciclofosfamida nesses animais, o que foi relacionado em especial ao aumento dos linfócitos T reguladores (Treg) ⁽²³⁾.

Esses efeitos se explicam pela participação das STATs na via de sinalização de outras moléculas que utilizam os receptores de citocina, como a prolactina, a eritropoetina, a trombopoetina, o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF; *granulocyte colony-stimulating factor*), o interferon gama e várias interleucinas (IL), entre elas a IL-2 ⁽²⁴⁾ (Figura 1). A ligação da IL-2 ao seu receptor leva à expressão, via *STAT5B*, de genes que incluem o *FOXP3* (*forkhead box P3*), que promove o desenvolvimento e função dos Treg, o *IL2RA* (subunidade alfa do receptor de interleucina 2), que favorece a ativação de linfócitos T, e o *Bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*), um fator antiapoptótico ⁽²⁵⁾. Os Treg são essenciais no controle da resposta imune e na prevenção da autoimunidade ⁽²⁶⁾ e a redução em seu número e função,

vista em pacientes com mutações em homozigose no gene *STAT5B* ⁽²⁷⁾, explica os quadros autoimunes presentes nos mesmos. Já a maior susceptibilidade a infecções poderia ser justificada tanto por um aumento na apoptose de células T quanto por um defeito na ativação dos linfócitos T citotóxicos ⁽²⁵⁾.

1.4 Mutações na *STAT5B*

As sete mutações publicadas até o momento distribuem-se de forma relativamente uniforme entre os éxons 5 e 17 (Figura 2). São duas deleções (c.424_427del / p.Leu142ArgfsX19 e c.1680delG / p.Arg560ArgfsX16) e duas inserções (c.1102insC / p.Gln368ProfsX9 e c.1191insG / p.Asn398GlufsX16) levando a uma alteração tipo *frameshift*, uma mutação tipo *nonsense* (c.454C>T / p.Arg152X) e duas mutações tipo *missense* (c.1888G>C / p.Ala630Pro e c.1937T>C / p.Phe646Ser).

Todas estão presentes em homozigose e a herança é considerada autossômica recessiva, com presença de consanguinidade conhecida em três famílias. Quatro dos dez pacientes nasceram na Argentina, uma na Turquia, um no Caribe, duas irmãs nasceram no Kuwait e dois irmãos nasceram no Brasil. Duas pacientes argentinas foram adotadas logo após o parto, não havendo disponibilidade de dados sobre suas famílias biológicas.

1.5 Caracterização dos pacientes com mutações em homozigose na *STAT5B*

1.5.1 Quadro clínico

O peso ao nascimento dos pacientes foi normal ou pouco diminuído para a idade gestacional, assim como o comprimento ao nascimento (descrito em cinco pacientes), o que pode ser explicado pela relativa independência do crescimento pré-natal em relação ao GH. No entanto, o crescimento pós-natal foi muito comprometido, com padrão semelhante ao observado em pacientes com GHI secundária a mutações no *GHR*, e o escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) de altura ao diagnóstico variou entre -3,0 e -9,9 (Tabela 1). Ao contrário do que foi observado em modelos animais, em humanos não houve diferença entre os sexos no efeito das mutações da *STAT5B* sobre o crescimento ⁽⁴⁾.

Foi relatada a presença de características fenotípicas de GHI, como fronte olímpica, hipoplasia de face e voz aguda em seis pacientes. A puberdade foi atrasada em oito dos nove pacientes que atingiram idade para seu início, provavelmente pelo IGF-1 baixo e estado de doença crônica. A idade óssea também estava atrasada nos seis casos em que foi descrita ⁽⁴⁾.

Sete dos dez pacientes apresentaram quadro de doença pulmonar crônica grave e de início precoce (Tabela 1). O diagnóstico presuntivo ou confirmado por biópsia foi de pneumonia intersticial linfocítica, caracterizada por infiltração difusa do interstício por uma mistura polimórfica de linfócitos, histiócitos e plasmócitos. É uma patologia de etiologia desconhecida, rara

em crianças e frequentemente associada a doenças autoimunes ou à síndrome da imunodeficiência adquirida ⁽²⁸⁾. Esta doença causa fibrose pulmonar progressiva, sendo que três pacientes faleceram por insuficiência respiratória (casos 1, 2 e 7 da Tabela 1) e um foi submetido a transplante pulmonar, até o momento com boa evolução (caso 8 da Tabela 1) ⁽¹³⁾.

Outras manifestações relatadas foram varicela grave / hemorrágica em seis pacientes e eczema grave em outros sete. Além disso, cinco dos pacientes tiveram história de infecções de repetição. Foram descritos também dois casos de tireoidite autoimune, um caso de artrite reumatóide juvenil de início precoce (diagnosticado aos dois anos de idade), dois casos de púrpura trombocitopênica idiopática, um de psoríase, um de alopecia e um de doença celíaca ⁽⁴⁾ (Tabela 1).

Não houve resposta à terapia com GH recombinante humano (rhGH) nos cinco pacientes em que foi tentada, assim como ocorre nos indivíduos com GHI secundária a mutações no *GHR*. O tratamento com IGF-1 recombinante humano (rhIGF-1) é aprovado para crianças com deficiência primária grave de IGF-1, o que inclui pacientes com GHI ⁽²⁹⁾. No entanto, nos dois irmãos brasileiros foi tentada a terapia com rhIGF-1 e não se notou melhora do padrão de crescimento, possivelmente pelo estado de doença crônica ⁽¹³⁾.

Tabela 1 - Resumo dos principais achados clínicos dos pacientes com mutações da *STAT5B* em homozigose descritos na literatura

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mutação no c.DNA	c.1888G>C	c.1191insG	c.454C>T	c.1102insC	c.1680delG	c.454C>T	c.424_427del	c.1937T>C		
Efeito na proteína	p.A630P	p.N398EfsX16	p.R152X	p.Q368PfsX9	p.R560RfsX16	p.R152X	p.L142RfsX19	p.F646S		
Referência	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)		
Sexo	F	F	F	M	F	F	F	M	M	F
País de origem	Argentina	Turquia	Argentina	Caribe	Kuwait	Argentina	Brasil	Argentina		
Altura mãe (cm)	155,8	160	142,3	165,6	160,2	ND	156	ND		
Altura pai (cm)	173,6	169	160	164,3	167,7	ND	165	ND		
Consanguinidade	sim	sim	não	não	sim	adotada	não	adotada		
Idade ao dx (a)	16,5	16,4	15,3	31	4	2	12	6	2	14,8
Z altura ao dx	-7,5	-7,8	-9,9	-5,9	-5,6	-5,8	-5,3	-5,6	-3,0	-6,0
Acometimento pulmonar	sim	sim	sim	não	sim	não	sim	sim	sim	não
Varicela grave	sim	ND	sim	sim	ND	ND	sim	sim	não	sim
Eczema grave	sim	sim	sim	não	ND	ND	sim	sim	sim	sim
Outras manifestações	sim ^a	sim ^b	sim ^c	sim ^d	sim ^e	sim ^f	sim ^g	não	sim ^h	sim ⁱ

a – anos; cm – centímetros; dx – diagnóstico; ND – não disponível; Z – escore de desvio-padrão para idade e sexo. As pacientes 5 e 6 são irmãs e os pacientes 8 e 9 são irmãos. a- Herpes zoster recorrente; b- Infecções pulmonares de repetição, púrpura trombocitopênica idiopática; c- Infecções de repetição em pele, trato respiratório e trato gastrointestinal, ceratite e uveíte recorrentes por herpes zoster; d- Ictiose congênita; e- Bronquiectasia; f- Artrite reumatoide juvenil; g- Sepsis neonatal, diarreia crônica, ceratite, herpes zoster, tireoidite autoimune, displasia ectodérmica disidróica, infecções pulmonares de repetição; h- Púrpura trombocitopênica idiopática; i- Infecções de repetição, tireoidite autoimune, psoríase, alopecia.

1.5.2 Alterações laboratoriais

Todos os pacientes homozigotos para mutações na *STAT5B* apresentaram GH basal normal ou elevado (Tabela 2). As concentrações de IGF-1, IGFBP-3 e ALS foram sempre baixas e não houve normalização do IGF-1 nos seis casos em que se fez teste de geração com rhGH. A GHBP foi sempre normal, ao contrário do que acontece na maioria dos pacientes com mutação do *GHR*, em que a GHBP é baixa ⁽⁴⁾. A prolactina foi elevada em seis dos sete pacientes em que foi dosada, provavelmente por uma interferência com seu mecanismo de retroalimentação negativa, uma vez que sua sinalização também é realizada através da *STAT5B* ⁽¹³⁾.

Em relação à avaliação imunológica, não existe um padrão tão claro como no perfil hormonal. Oito de nove pacientes avaliados tinham linfopenia de células T, sete de nove apresentavam redução dos linfócitos NK e oito de nove apresentavam hipergamaglobulinemia. Em uma das pacientes, foi realizado estudo *in vitro* que mostrou baixa proliferação dos linfócitos T em resposta a mitógenos e antígenos, documentando uma disfunção generalizada nessas células ⁽⁹⁾. Foi sugerido também que a hipergamaglobulinemia poderia ser resultado de uma desregulação das células B secundária a um controle inadequado das mesmas pelas células T disfuncionais ⁽⁹⁾. Um estudo recente demonstrou redução da expressão de IL-2R e de FOXP3 em linfócitos isolados de seis pacientes com mutações em homozigose na *STAT5B* e associação da redução de FOXP3 com menor função dos Treg nesses pacientes ⁽³⁰⁾.

Tabela 2 - Resumo dos principais achados laboratoriais dos pacientes com mutações da *STAT5B* em homozigose descritos na literatura

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mutação no c.DNA	c.1888G>C	c.1191insG	c.454C>T	c.1102insC	c.1680delG	c.454C>T	c.424_427del	c.1937T>C		
Efeito na proteína	p.A630P	p.N398EfsX16	p.R152X	p.Q368PfsX9	p.R560RfsX16	p.R152X	p.L142RfsX19	p.F646S		
Referência	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)		
GH basal (ng/ml)	9,4	14,2	4,2	0,1	5,7	17,7	1,8	1,7	1,0	1,7
IGF-1 (ng/ml)	38	7	indetectável	14	<5	<5	0,8	34	<25	<5
PRL (ng/ml)	102	ND	169	110	ND	ND	15	61	77	83
IgG	↑	↑	↑	ND	ND	ND	ND	↑	↔	↑
Linfócitos T	↓	↔	↓	ND	ND	ND	ND	↓	↓	↓
Linfócitos NK	↔	↔	↓	ND	ND	ND	ND	↓	↓	↓

GH – hormônio de crescimento; IGF-1 – fator de crescimento insulina-símile 1; IgG – imunoglobulina G; linfócitos NK – linfócitos *natural killer*; ND – não disponível; PRL – prolactina; Z – escore de desvio-padrão para idade e sexo; ↑ - aumentado; ↓ - reduzido; ↔ - sem alteração. As pacientes 5 e 6 são irmãs e os pacientes 8 e 9 são irmãos.

1.6 Mutação c.424_427del da *STAT5B* na região de Criciúma – Santa Catarina e a possível participação do efeito fundador

Dentre os dez pacientes com mutações em homozigose na *STAT5B*, dois são irmãos nascidos na cidade de Criciúma, descritos em 2010 por pesquisadores do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (Laboratório de Investigação Médica - LIM/42) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Criciúma localiza-se na região do extremo sul de Santa Catarina, a uma latitude 28°40'39" Sul e a uma longitude 49°22'11" Oeste (Figura 3) e, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), sua população estimada em 2014 era de 204.667 habitantes.

Figura 3 - Localização do município de Criciúma no estado de Santa Catarina e no Brasil

Os pais destes pacientes, heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B*, negaram consanguinidade. Foi realizada uma revisão da genealogia das famílias materna e paterna por três gerações, não sendo

observados laços entre elas. Ambos desconheciam a origem de suas famílias, residentes na região de Criciúma há muitos anos.

Além disso, eles relataram a existência de uma outra família em Criciúma na qual duas crianças apresentaram quadro clínico muito semelhante ao dos pacientes homozigotos para mutações na *STAT5B* e faleceram devido a insuficiência respiratória. A ausência de consanguinidade entre os pais heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* e o encontro de outra família com quadro provavelmente associado a uma mutação na *STAT5B* sugeriram que esta mutação pudesse ser relativamente frequente em heterozigose na região.

Uma explicação para um possível aumento na prevalência da mutação c.424_427del da *STAT5B* em Criciúma seria o efeito fundador. Este fenômeno da evolução ocorre quando uma nova população é formada por um pequeno número de indivíduos vindos de uma população original. Consequentemente, pode haver redução da variação genética e estes indivíduos podem representar uma amostra não aleatória dos genes da população original ⁽³¹⁾.

A colonização da região de Criciúma aconteceu somente no final do século XIX, durante o ciclo da imigração europeia. Em 1880, chegaram os primeiros 141 indivíduos de 22 famílias de italianos provenientes da região do Vêneto, no norte da Itália. Em 1890, começaram a chegar imigrantes alemães e poloneses, além de migrantes da região de Laguna descendentes de portugueses. Em 1913, iniciou-se a exploração do carvão, o que atraiu

um grande número de trabalhadores do litoral e da região próxima da serra, principalmente das cidades de Tubarão, Araranguá, Laguna e Lages ⁽³²⁾.

No caso da existência do efeito fundador, a mutação teria sido trazida por indivíduo(s) em algum momento da colonização desta região. Em uma população pequena, a presença deste(s) indivíduo(s) já configuraria uma frequência alta do alelo mutado e, à medida que a população fosse crescendo, também aumentaria o número de descendentes portadores da mutação. Com o passar dos anos, a proximidade e noção de unidade familiar entre muitos desses indivíduos poderia ter se perdido, explicando o encontro ao acaso de dois portadores que desconheciam consanguinidade.

Outros estudos já demonstraram casos semelhantes, em que o efeito fundador explicou a presença da mesma mutação em famílias aparentemente não relacionadas. Em relação à GHI, por exemplo, foi demonstrado através do estudo de haplótipos que a mutação E180*splice* no *GHR*, encontrada em diversas famílias brasileiras, em uma comunidade no Equador e em pacientes de Israel, Chile e Estados Unidos, tinha a mesma origem ^(33, 34).

1.7 Efeito de mutações em heterozigose em outros genes associados ao crescimento sobre a variabilidade da altura

Alguns grupos mostraram que enquanto mutações em homozigose em genes associados à regulação do crescimento causam baixa estatura grave, mutações em heterozigose nos mesmos genes podem estar associados a

uma redução mais leve da altura ⁽³⁵⁻³⁸⁾. Tomando-se como exemplo genes do eixo GH-IGF-1, indivíduos heterozigotos para uma mutação no *IGF1* foram 0,6 desvios-padrão da altura mais baixos que seus familiares não portadores ⁽³⁵⁾ e indivíduos heterozigotos para mutações na *IGFALS* (gene da ALS) foram em média 0,9 desvios-padrão mais baixos que seus familiares não portadores ⁽³⁶⁾.

Nesses trabalhos, o quadro clínico dos indivíduos heterozigotos era muito mais leve que a doença apresentada pelos pacientes homozigotos para as mesmas mutações, sugerindo um efeito genético dose-dependente. Até o momento, não há estudos caracterizando o fenótipo de mutações da *STAT5B* em heterozigose.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

- 2.1 Investigar a frequência do alelo mutado c.424_427del da *STAT5B* na população descendente de indivíduos naturais de Criciúma – Santa Catarina.
- 2.2 Avaliar a presença do efeito fundador como causa do encontro desta mutação em diferentes famílias da região.
- 2.3 Estudar o impacto da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose sobre a altura e eixo GH/IGF-1.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki (adotada na 18ª Assembleia Médica Mundial, Helsinki, Finlândia, 1964). O projeto de pesquisa foi submetido à aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FMUSP (protocolo de pesquisa número 310/11). Após a aprovação do estudo, foi obtido o consentimento livre e esclarecido por escrito junto aos indivíduos controles voluntários e aos indivíduos das famílias portadoras da mutação c.424_427del da *STAT5B* e/ou seus responsáveis legais (o modelo do termo utilizado encontra-se na seção Anexos).

3.2 Casuística

3.2.1 Avaliação da frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* em Criciúma

Para o estudo da frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* na população de Criciúma, foi calculado que a coleta de amostras de DNA de 1.080 indivíduos permitiria avaliar a presença deste alelo em uma frequência de 0,25% na população com um poder estatístico de 99%. Essas pessoas deveriam ser maiores de 18 anos e descendentes de indivíduos naturais de

Criciúma, das cidades vizinhas e/ou que fizeram parte de Criciúma no passado (incluindo Urussanga, Içara, Morro da Fumaça, Cocal do Sul, Siderópolis, Nova Veneza e Forquilha). Foram selecionadas para participar do estudo todas as pessoas presentes no Centro de Especialidades em Saúde de Criciúma em dias aleatórios entre 2010 e 2014 que preenchessem os critérios de inclusão acima, totalizando 1201 participantes (Figura 4).

3.2.2 Avaliação do fenótipo da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose

Para a análise do efeito da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose, foram avaliados: 52 familiares diretos dos dois pacientes homozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* (casos-índice); os indivíduos heterozigotos para esta mutação identificados através da pesquisa na população e seus familiares; e quatro indivíduos de outra família de Criciúma em que foi identificada a mesma mutação após relato de casos semelhantes ao de pacientes com mutações em homozigose na *STAT5B*.

O fenótipo antropométrico e laboratorial foi então comparado entre os 33 indivíduos identificados como heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* e 38 familiares não portadores (Figura 5).

Figura 4- Estratégia para a avaliação da frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* em Criciúma

Figura 5 - Estratégia para a avaliação do fenótipo da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose

3.2.3 Avaliação do impacto das mutações descritas da *STAT5B* em heterozigose sobre a altura

Para a investigação do efeito das mutações descritas da *STAT5B* em heterozigose, foi feita uma revisão na literatura procurando dados de familiares dos pacientes com outras mutações na *STAT5B* e também foi feito contato com os autores desses outros estudos, solicitando-se possíveis dados adicionais ainda não publicados. Foram encontrados desta forma dados sobre a altura de treze familiares de primeiro grau desses pacientes, todos heterozigotos para alguma das mutações descritas na *STAT5B*.

3.3 Estudo da mutação c.424_427del da *STAT5B*

3.3.1 Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos

Amostras de DNA genômico de leucócitos foram obtidas através de coleta de sangue periférico dos membros da família dos casos-índice, dos heterozigotos encontrados na população de Criciúma e de seus familiares. Nos indivíduos controles de Criciúma, essas amostras foram obtidas através do esfregaço de mucosa oral.

No caso das amostras de DNA obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico, 6 ml de sangue venoso eram coletados em tubos com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 25 mM e submetidos ao método de extração com cloreto de sódio (NaCl) saturado ⁽³⁹⁾. Esta técnica consiste em duas etapas de lise de hemácias com 114 mM de cloreto de amônia e 1 mM de carbonato de amônia, seguidas de uma etapa de lise de leucócitos com

hidrocloro de tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH 8,0), utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS - 0,2%) e proteinase K (160 miligramas (mg) por ml). A precipitação do DNA era feita com etanol absoluto gelado, seguida de lavagem com etanol 70%, finalizando com sua suspensão em TE (10:0,1) (TrisHCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0). A concentração do DNA extraído era obtida por leitura em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (uma amostra de DNA na concentração de 50 µg/ml a 260 nm terá uma absorbância igual a 1). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material é superior a 1,75. As amostras de DNA eram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M pH 8,0), contendo o corante SYBR Safe® (Invitrogen) na concentração de uma vez, e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade. Como padrões de massa, eram utilizados 500 ng do marcador de peso molecular λ HindIII (250 ng/µl) e 20 ng do λ DNA (10 ng/µl).

No caso das amostras de DNA obtidas através do esfregaço de mucosa oral, eram adicionados 200 µL de TES (Tris HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; SDS 0,6%) e 5 µL de proteinase K (10 mg/ml) aos tubos contendo as escovas com os esfregaços, que eram então incubados por 2 horas a 42 °C. Após a incubação, as escovas eram retiradas e eram adicionados 42 µL de NaCl saturado (6M) a cada tubo, seguindo-se agitação manual vigorosa. A solução era centrifugada por um minuto a 15.000 G e o

sobrenadante era transferido para um novo tubo, seguido da adição de 2 vezes o volume em etanol absoluto. Após agitação e nova centrifugação deste tubo, o etanol era descartado e o *pellet* de DNA formado era “lavado” com etanol 70% por diversas vezes. Por fim, o *pellet* de DNA era diluído com 30 µL de TE 10:0,1.

3.3.2 Genotipagem da mutação c.424_427del da *STAT5B* através da técnica de análise de fragmentos

A mutação c.424_427del da *STAT5B* é caracterizada pela perda de quatro nucleotídeos, sendo possível detectá-la pela técnica de análise de fragmentos. Para isso, um fragmento da região envolvendo a mutação era amplificado através de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se um par de *primers* específico, sendo o *primer* reverso marcado com o fluorocromo FAM (direto 5' CTCAGTCTTCCTCCCATTCG 3' e reverso 5' GGCTCTCCTGGTACTGGA 3'). Todas as amplificações foram realizadas utilizando-se um termociclador automático *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto o DNA) e um controle positivo (com DNA de paciente heterozigoto para a mutação). O volume final de 25 µL continha cerca de 100 ng de DNA genômico, 15 µM de cada *primer*, 500 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1 U de Taq polimerase (GoTaq promega®) e tampão da reação (KCl 50mM; MgCl₂ 1,5mM; Tris-HCl 10mM pH 9,0). A reação de PCR consistia em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento

a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos; por fim, 40 minutos a 72 °C para extensão final. Estas amostras eram então submetidas à eletroforese capilar em um sequenciador automático ABI PRISM 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e analisadas pelo programa de análise de fragmentos GeneScan (Applied Biosystems). Através do sequenciamento de amostras aleatórias, foi demonstrado que os fragmentos de 212 pares de base (pb) observados no GeneScan correspondiam ao alelo com a mutação c.424_427del da *STAT5B*, enquanto os fragmentos de 216 pb no GeneScan correspondiam ao alelo normal (Figura 6).

Figura 6 - Resultado da análise de fragmentos de DNA em eletroforese capilar de amostras representativas de indivíduos homozigotos para o alelo normal (não portadores), heterozigotos e homozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B*

3.4 Avaliação da presença de efeito fundador

3.4.1 Análise de microssatélites

Para avaliar se o encontro da mutação c.424_427del da *STAT5B* em indivíduos de diferentes famílias em Criciúma era devido ao efeito fundador, foram genotipados três marcadores polimórficos localizados a menos de um centimorgan (cM) desta mutação nos dois casos-índice, nos 33 indivíduos heterozigotos para esta mutação e em 53 controles escolhidos de forma aleatória.

Os marcadores D17S1793 (localizado a 0,01 cM da mutação), D17S1801 (localizado a 0,04 cM da mutação) e D17S932 (localizado a 0,83 cM da mutação) foram analisados através da técnica de análise de fragmentos. Para isso, fragmentos das regiões que envolvem os marcadores foram amplificados através de PCR utilizando-se um par de *primers* específico para cada marcador, sendo os *primers* diretos marcados com o fluorocromo FAM (D17S1793: direto 5' CCAGCCCAAGGTTTACATC 3' e reverso 5' CACCAGTTCCCTGCGAG 3'; D17S1801: direto 5' ATCCTCCCACCTCAGC 3' e reverso 5' ATGAAAAATGAAATTACAAACAATC 3'; D17S932: direto 5' GCTAAAAATACACGGATGG 3' e reverso 5' TGCAAGACTGCGTCTC 3). Todas as amplificações foram realizadas utilizando-se um termociclador automático *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) e acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto o DNA) e um controle positivo (com DNA de paciente heterozigoto para a mutação).

O volume final de 25 µL tinha a mesma composição descrita acima para a genotipagem da mutação c.424_427del da *STAT5B*.

A reação de PCR para o marcador D17S1801 consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos; por fim, 40 minutos a 72 °C para extensão final. A reação de PCR para o marcador D17S932 foi igual à do marcador D17S1801 exceto pelo tempo de extensão nos ciclos (45 segundos) e pelo tempo de extensão final (50 minutos). A reação de PCR para o marcador D17S1793 foi a mesma descrita acima para a genotipagem da mutação c.424_427del da *STAT5B*. Estas amostras foram então submetidas à eletroforese capilar em um sequenciador automático ABI PRISM 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e analisadas pelo programa de análise de fragmentos GeneScan (Applied Biosystems).

3.4.2 Análise dos haplogrupos do cromossomo Y e do DNA mitocondrial

Para avaliar a origem da mutação c.424_427del da *STAT5B*, foram analisados os haplogrupos do cromossomo Y e do DNA mitocondrial (mtDNA) em indivíduos heterozigotos e representativos das diferentes famílias portadoras desta mutação no Laboratório de Imunohematologia e Hematologia Forense (LIM/40) do Hospital das Clínicas da FMUSP.

A avaliação dos haplogrupos do cromossomo Y foi realizada utilizando-se o AmpFISTR® Yfiler™ Kit (Applied Biosystems) que contém os

marcadores DYS19, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385 a/b, DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 e Y GATA H4. Estas amostras foram então submetidas à eletroforese capilar em um sequenciador automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) e analisadas pelo programa de análise de fragmentos GeneMapper (Applied Biosystems). A nomenclatura dos alelos foi determinada de acordo com as recomendações da Comissão de DNA da Sociedade Internacional de Genética Forense. A classificação do haplogrupo foi feita utilizando-se o programa de predição de haplogrupos FTDNA 2.0 (<http://www.hprg.com/hapest5/index.html>).

Em relação à análise do mtDNA, as subregiões HV1, HV2 e HV3 da região-controle foram amplificadas utilizando-se os *primers* L15879 e H727. O sequenciamento foi feito com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Estas amostras foram então submetidas à eletroforese capilar em um sequenciador automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) e analisadas pelo programa de análise BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

3.5 Análise fenotípica

3.5.1 Avaliação antropométrica

Todos os indivíduos tiveram sua altura medida com um estadiômetro portátil. Os valores de altura foram transformados em escore Z utilizando-se

a curva de referência americana ⁽⁴⁰⁾, recentemente validada para uso na população brasileira ⁽⁴¹⁾.

3.5.2 Entrevista

A entrevista foi realizada com os membros da família dos casos-índice, com os heterozigotos encontrados na população de Criciúma e com seus familiares. Foi questionada a presença de doenças atuais e prévias, em especial de patologias apresentadas pelos pacientes homozigotos para mutações na *STAT5B*, como doenças respiratórias ou cutâneas, infecções de repetição, varicela grave, artrite reumatóide juvenil, tireoidite autoimune, púrpura trombocitopênica idiopática e doença celíaca.

3.5.3 Avaliação laboratorial

A avaliação laboratorial foi realizada com os membros da família dos casos-índice, com os heterozigotos encontrados na população de Criciúma e com seus familiares, sempre com os indivíduos em jejum pela manhã. Foram coletados 20 ml de sangue por punção em veia periférica, sendo 14 ml em dois tubos secos, 4 ml em um tubo com EDTA (para hemograma) e 2 ml em um tubo com fluoreto de sódio (para glicemia). As dosagens foram realizadas em um laboratório local (Laboratório Pasteur) e/ou em laboratório de referência (Laboratório Pardini), sendo que a escolha dos laboratórios foi determinada por questões logísticas quanto ao transporte de materiais biológicos perecíveis entre Criciúma e São Paulo.

As dosagens de GH, IGF-1 e IGFBP-3, foram realizadas por quimioluminescência (IMMULITE®, Siemens, Deerfield, IL, EUA), de prolactina por quimioluminescência (F. Hoffmann – La Roche Ltd), de imunoglobulina E (IgE) por quimioluminescência (ADVIA Bayer), de imunoglobulinas G e A (IgG e IgA) por turbidimetria, de insulina e peptídeo C por eletroquimioluminescência. IGF-1 e IGFBP-3 foram expressos em escore Z ⁽⁴²⁾.

3.6 Sequenciamento completo do exoma

O sequenciamento completo do exoma foi realizado em uma familiar dos casos-índice, heterozigota para a mutação c.424_427del da *STAT5B* e portadora de pneumopatia crônica de etiologia indeterminada, com biópsia compatível com pneumonia intersticial linfocítica. O objetivo foi avaliar a presença de outras causas genéticas de pneumopatias e a possível participação da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose neste fenótipo. O exoma foi realizado em serviço terceirizado (Laboratório Mendelics), feito a partir de DNA extraído de sangue periférico, utilizando-se Illumina's Nextera Exome Enrichment Kits (Illumina, San Diego, CA) para a preparação da biblioteca e captura, e o sequenciador Illumina HiSeq. Os alinhamentos e anotações de variantes foram realizados utilizando-se estratégia de bioinformática descrita previamente ⁽⁴³⁾. Foi fornecida ao executor da análise uma lista com os genes associados a pneumopatias e com os genes envolvidos na sinalização dos receptores de citocinas.

3.7 Genotipagem de variante alélica da *Janus quinase 3* encontrada no sequenciamento exômico

No sequenciamento exômico foi identificada uma variante alélica *missense* no éxon 12 do gene da Janus quinase 3 (*JAK3*). Para avaliar sua participação no quadro pulmonar da paciente, a variante foi estudada em oito de seus familiares diretos através do sequenciamento do éxon 12 da *JAK3*. Este foi amplificado através de PCR utilizando-se o seguinte par de *primers*: direto 5' CTCTTCTGCTGTCCCCTCAC 3' e reverso 5' CCAGGTCCCTGTGTGTTTTT 3'. A amplificação foi realizada utilizando-se um termociclador automático *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) e acompanhada de um controle negativo (todos os reagentes, exceto o DNA). O volume final de 25 µL continha cerca de 100 ng de DNA genômico, 20 µM de cada *primer*, 500 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1 U de Taq polimerase (GoTaq promega®) e tampão da reação (KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 9,0). A reação de PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos; por fim, sete minutos a 72 °C para extensão final.

Cerca de 30 ng dos produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a incubação com 10 U da enzima ExoSAP-IT (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 15 minutos a 37 °C, seguida da inativação da enzima com a incubação dos

produtos a 80 °C por 15 minutos. Subsequentemente, a reação de sequenciamento foi realizada com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Vinte nanogramas de cada produto de PCR purificado, 2 µl da enzima, 6 µl de tampão de sequenciamento e 5 µM do *primer* reverso do éxon 12 da JAK3 foram submetidos ao protocolo de sequenciamento que consistiu em 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por quatro minutos, realizado no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Estas amostras foram precipitadas segundo o protocolo do fabricante e então submetidas à eletroforese capilar em um sequenciador automático ABI PRISM 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A análise foi realizada pelo programa Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

3.8 Frequência de variantes alélicas patogênicas da *STAT5B* em outras populações

A frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* foi comparada à frequência de outras variantes alélicas patogênicas identificadas neste gene em duas bases de dados populacionais públicas: o *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) ⁽⁴⁴⁾ e o *NHLBI-GO Exome Sequencing Project* (ESP) ⁽⁴⁵⁾. Foram consideradas patogênicas apenas as variantes alélicas classificadas como *stop gain* ou *frameshift*, uma vez que nenhuma das variantes alélicas classificadas como *missense* nessas bases de dados foram avaliadas através de estudos funcionais.

3.9 Análise estatística

Variáveis numéricas com distribuição normal foram comparadas através do teste T não pareado ou ANOVA seguido do teste Tukey. Variáveis numéricas sem distribuição paramétrica foram analisadas através do teste Mann-Whitney Rank Sum ou do Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks. Dados categóricos foram comparados através do teste chi-quadrado ou teste exato de Fisher conforme apropriado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas com SigmaStat versão 3.5 (Systat Software Inc. Chicago, IL) e MedCalc (versão 11.1.1.0, MedCalc Software bvba, Mariakerke, Belgium).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose na população de Criciúma

Dentre os 1192 indivíduos avaliados da população, sete foram identificados como sendo heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B*. Dois deles foram posteriormente identificados como sendo familiares de terceiro e quarto grau dos casos-índice. Os outros cinco são de quatro famílias não sabidamente relacionadas, sendo que dois são irmãos avaliados em dias diferentes sem conhecimento prévio da pesquisadora.

Considerando-se sete alelos mutados em um total de 2384 alelos avaliados, a frequência alélica mínima desta mutação em Criciúma foi de 0,29% (intervalo de confiança 95%: 0,08 a 0,5%). Esta frequência alélica foi significativamente mais alta que a frequência de outras variantes alélicas patogênicas da *STAT5B* observadas em bases de dados públicas ($p < 0,001$, Tabela 3).

Tabela 3 - Frequências alélicas de variantes patogênicas da *STAT5B* encontradas no estudo atual e em bases de dados públicas (ESP e ExAC)

Banco de dados	Referência	Variante alélica patogênica*	Frequência alélica (%)	Número total de alelos	p
Estudo atual		17:40375522 TGGAG/T; p.L142RfsX19	0.29	2.384	
ESP	(45)	17:40370236:C/T; p.Q368*	0.008	13.006	<0,0001
ExAC	(44)	17:40384025 G/A; p.Gln41Ter	0.001	121.406	<0,0001
	(44)	17:40370235:T/TG; p.Gln368ProfsTer9	0.08	118.824	0,001
	(44)	17:40370235 TG/T; p.Gln368ArgfsTer2	0.03	118.824	<0,0001
	(44)	17:40379567 G/GC; p.His89AlafsTer11	0.001	121.240	<0,0001

ESP- *NHLBI-GO Exome Sequencing Project*; ExAC- *Exome Aggregation Consortium* (ExAC)

*- Foram consideradas patogênicas apenas as variantes alélicas classificadas como *stop gain* ou *frameshift*.

4.2 Avaliação da segunda família possivelmente afetada por mutações da *STAT5B*

Foram avaliados quatro indivíduos de outra família em Criciúma, na qual duas crianças apresentaram quadro clínico muito semelhante ao dos pacientes homozigotos para mutações na *STAT5B* e faleceram devido a insuficiência respiratória. Os pais dessas crianças eram primos em primeiro grau e heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B*. Assim, é possível inferir que seus filhos falecidos eram homozigotos para esta mutação e faleceram por fibrose pulmonar progressiva.

Considerando-se esta família em conjunto com as quatro identificadas através da busca ativa na população e com as famílias materna e paterna dos casos-índice, foram encontradas no total sete famílias independentes portadoras da mutação c.424_427del da *STAT5B* em Criciúma.

4.3 Análise da origem da mutação c.424_427del da *STAT5B*

4.3.1 Origem relatada das famílias

Nenhum dos indivíduos avaliados das sete famílias portadoras da mutação c.424_427del da *STAT5B* soube precisar a origem de seus antepassados remotos. Em quatro famílias, os antepassados mais distantes com local de nascimento conhecido foram pais ou avós dos familiares mais velhos e nasceram em Tubarão, cidade localizada a cerca de 60 km de Criciúma (Figura 3). Em uma família mesmo a origem dos pais era desconhecida e em outras duas famílias a origem era de cidades que já

fizeram parte de Criciúma (Içara a cerca de 11 km e Nova Veneza a cerca de 18 km de Criciúma). No entanto, Criciúma foi elevada à condição de município em 1925, após ser desmembrada de Araranguá, e Araranguá por sua vez foi desmembrada de Tubarão em 1880. Assim, a origem comum mais remota conhecida destas famílias parece ser a cidade de Tubarão.

4.3.2 Análise de microssatélites

Para avaliar se a presença da mesma mutação da *STAT5B* nessas sete famílias foi causada por efeito fundador, foi feita a análise de microssatélites próximos a esta mutação. O marcador D17S1793 não foi informativo por apresentar baixa variabilidade alélica, sendo então descartado na análise.

Foram identificados onze alelos para o marcador D17S932, com tamanhos variando entre 178 e 202 pb, e nove alelos para o marcador D17S1801, com tamanhos variando entre 220 e 244 pb. Os alelos 188 pb do marcador D17S932 e 232 pb do marcador D17S1801 foram os mais frequentemente encontrados nos indivíduos controles, com frequências alélicas de 24% e 53%, respectivamente.

A análise destes marcadores mostrou que os dois pacientes homozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* tinham o haplótipo D17S932 196, D17S1801 242. O mesmo haplótipo foi identificado em todos os indivíduos heterozigotos (100%), porém em apenas 5 de 53 indivíduos controles (9,4%, $p < 0,001$), favorecendo a hipótese de um antepassado em

comum de quem herdaram este haplótipo e assim a presença do efeito fundador.

4.3.3 Análise dos haplogrupos do cromossomo Y e do mtDNA

Foram estudados os haplogrupos do cromossomo Y de seis indivíduos heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* não relacionados (Tabela 4). O haplogrupo R1b, que é encontrado principalmente na Europa Ocidental, estava presente em três deles. Dois indivíduos tinham o haplogrupo J (J1 e J2a1), encontrado principalmente no Oriente Médio mas difuso na Europa, e um deles tinha o haplogrupo I2a1, encontrado em toda a Europa porém principalmente na região dos Bálcãs ⁽⁴⁶⁾.

Em relação ao mtDNA, foram estudados os polimorfismos da região controle em sete indivíduos heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* não relacionados (Tabela 4). Os haplogrupos B4 e C1, encontrados nos povos indígenas das Américas, estavam presentes em três deles, e o haplogrupo H, a linhagem materna mais comum na Europa, estava presente em dois. Os últimos dois indivíduos tinham os haplogrupos K1a e V7a, ambos de origem europeia, porém o primeiro mais prevalente na Bélgica, Irlanda e Alemanha e o segundo na Escandinávia ⁽⁴⁶⁾.

Tabela 4 - Resultados dos haplogrupos do cromossomo Y e do DNA mitocondrial

Família	Haplogrupo do cromossomo Y	Origem geográfica	Haplogrupo mitocondrial	Origem geográfica
1	J2a1	Oriente Médio, Europa	H	Europa
2	R1b	Europa Ocidental	C1	América (ameríndios),
3	R1b	Europa Ocidental	H	Europa
4	sexo feminino		B4	América (ameríndios) Ásia, Oceania
5	I2a1	Europa (Balcãs)	B4	América (ameríndios) Ásia, Oceania
6	J1	Oriente Médio, Norte da África, Europa	V7a	Europa (Escandinávia)
7	R1b	Europa Ocidental	K1a	Noroeste da Europa

4.4 Fenótipo dos heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B*

Foram avaliados 52 familiares diretos dos casos-índice, sendo 23 familiares maternos e 29 familiares paternos. Dentre os 52, 21 foram heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* e 31 não eram portadores (Figura 7A). Nas outras cinco famílias identificadas com a mesma mutação, foram estudados 19 indivíduos, sendo 12 heterozigotos e sete não portadores (Figura 7B). Todos os indivíduos heterozigotos eram caucasianos.

Dado que através da análise dos microssatélites próximos à mutação foi possível inferir a presença de um antepassado comum, os dados dos indivíduos das sete famílias foram analisados em conjunto (Tabela 5). Os resultados individuais das avaliações antropométricas e exames laboratoriais encontram-se nos Anexos B a G.

No total, foram analisados os dados de 33 indivíduos heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* e de 38 familiares não portadores da mutação. Foram excluídos da análise os cônjuges não diretamente relacionados aos casos-índice (famílias I e II). Uma familiar heterozigota para a mutação foi excluída da análise da altura por apresentar baixa estatura grave (escore Z de altura -3,5) de etiologia indeterminada. Dentre os 71 indivíduos avaliados, 16 eram crianças, sendo 7 heterozigotas para a mutação.

Figura 7 – Heredogramas das famílias identificadas com a mutação c.424_427del da *STAT5B*.

A – Família dos pacientes homozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* (indicados com setas). Os asteriscos marcam os dois familiares com pneumopatia de origem indeterminada. **B** – Outras famílias identificadas na região com a mesma mutação. Símbolos em preto representam pacientes homozigotos para a mutação, em cinza representam os heterozigotos e em branco representam os não portadores. Os pontos de interrogação representam os indivíduos não genotipados. Indivíduo x.y - indivíduo número y da família número x.

Tabela 5 - Comparação entre indivíduos não portadores da mutação c.424_427del da *STAT5B* e seus familiares heterozigotos para a mesma

	Não portadores média ± DP mediana (p25; p75)	Heterozigotos média ± DP mediana (p25; p75)	P
N	38	33	
Sexo (F:M)	26:12	16:17	N.S.
Idade (anos)	28 ± 22 24 (13; 36)	41 ± 23 44 (20; 61)	0,012
Z altura	-0,2 ± 1,0 -0,3 (-0,8; 0,7)	-0,8 ± 0,9 -0,9 (-1,4; -0,4)	0,006
GH basal (ng/ml)	1,0 ± 1,6 0,3 (0,1; 1,2)	1,4 ± 2,2 0,4 (0,2; 1,4)	N.S.
Z IGF-1	0,3 ± 1,3 0,2 (-0,3; 1,0)	-0,4 ± 1,2 -0,4 (-1,1; 0,4)	0,028
Z IGFBP-3	0,0 ± 1,5 0,0 (-0,9; 1,2)	-0,9 ± 1,4 -0,6 (-1,6; 0,0)	0,02
Prolactina (ng/ml)	13,0 ± 10,6 9,6 (7,1; 14,5)	12,5 ± 7,2 10,2 (7,7; 14,7)	N.S.
Glicemia (mg/dl)	84 ± 12 84 (73; 92)	90 ± 14 88 (82; 94)	N.S.
Insulinemia (μUI/ml)	6,6 ± 3,8 5,9 (3,6; 8,8)	7,1 ± 7,3 5,4 (2,8; 8,1)	N.S.
Peptídeo C (ng/ml)	2,0 ± 1,1 1,7 (1,3; 2,1)	2,3 ± 1,4 2,0 (1,4; 2,5)	N.S.
Leucócitos (cél/mm³)	6935 ± 2695 6200 (5500; 7450)	6893 ± 2008 6200 (5700; 7700)	N.S.
Linfócitos (cél/mm³)	2831 ± 1756 2519 (1856; 2959)	2362 ± 1147 1928 (1680; 2629)	N.S.
Eosinófilos (cél/mm³)	353 ± 185 302 (242; 392)	351 ± 171 316 (243; 403)	N.S.
IgG (mg/dl)	1054 ± 249 1065 (962; 1187)	1022 ± 205 1043 (851; 1155)	N.S.
IgA (mg/dl)	225 ± 123 196 (139; 298)	244 ± 141 228 (137; 319)	N.S.
IgE (UI/ml)	143 ± 191 55 (16; 187)	178 ± 238 102 (26; 206)	N.S.

DP – desvio-padrão; GH – hormônio de crescimento; IGF-1 – fator de crescimento insulina-símile tipo 1; IGFBP-3 – proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile; IgG/IgA/IgE – imunoglobulinas G, A e E; N.S. – não significativo; p25/p75 – percentis 25 e 75.

Os familiares não portadores da mutação c.424_427del da *STAT5B* tiveram um escore Z de altura de $-0,2 \pm 1,0$, semelhante ao dos indivíduos controles da população de Criciúma ($-0,4 \pm 0,8$, $p = 0,63$). Já os indivíduos heterozigotos foram significativamente mais baixos que seus familiares não portadores da mutação, com escore Z altura de $-0,8 \pm 0,9$ ($p = 0,006$, intervalo de confiança 95% $-1,1$ a $-0,2$), embora dentro da variação normal da altura. Quando a análise foi feita excluindo-se as crianças, o mesmo resultado foi encontrado, com escore Z altura de $-0,8 \pm 0,9$ para os heterozigotos e de $-0,2 \pm 1,0$ para os não portadores ($p = 0,02$, Figura 8).

Os indivíduos heterozigotos também apresentaram escores Z de IGF-1 e de IGFBP-3 significativamente mais baixos que seus familiares não portadores da mutação ($p = 0,028$ e $0,02$ respectivamente, Figura 9). Não houve diferença entre os grupos em relação aos outros exames laboratoriais.

Nove indivíduos heterozigotos tinham história prévia ou atual de doenças de pele, sendo que quatro apresentavam eczema na avaliação. Já nos familiares não portadores, apenas um relatava história prévia de alergia cutânea ($p = 0,004$).

Figura 8 - Comparação do escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) de altura de adultos da população da região de Criciúma, do grupo de familiares não portadores da mutação c.424_427del da *STAT5B* e do grupo de indivíduos heterozigotos para esta mutação
N.S - não significativo

Figura 9 - Comparação do escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) de IGF-1 e IGFBP-3 entre o grupo de familiares não portadores da mutação c.424_427del da *STAT5B* (WT) e o grupo de indivíduos heterozigotos para esta mutação (HT)

IGF-1 - fator de crescimento insulina-símile 1; IGFBP-3 - proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile.

4.5 Sequenciamento completo do exoma de uma familiar heterozigota para a mutação c.424_427del da *STAT5B*

Uma prima em segundo grau dos casos-índice, heterozigota para a mutação c.424_427del da *STAT5B*, tem pneumopatia crônica de etiologia indeterminada (Figura 7A), sem história de exposição a agentes externos associados a doença pulmonar. Exames de avaliação de função pulmonar mostraram distúrbio ventilatório tipo restritivo de intensidade moderada a

grave e uma biópsia pulmonar evidenciou parênquima pulmonar com áreas de espessamento intersticial próximas aos bronquíolos respiratórios, com infiltrado inflamatório intersticial constituído por linfócitos, plasmócitos e histiócitos. Seu pai, um heterozigoto obrigatório para a mesma mutação, faleceu aos 55 anos de idade por insuficiência respiratória secundária a uma pneumopatia crônica não investigada.

O quadro pulmonar desta paciente apresenta uma evolução mais lenta e benigna que a dos pacientes com mutações em homozigose na *STAT5B*, uma vez que aos 35 anos de idade ainda não necessita utilizar oxigenioterapia contínua nem tem indicação de transplante pulmonar. No entanto, sua biópsia é compatível com pneumonia intersticial linfocítica. Assim, foi solicitado o estudo do exoma desta paciente para avaliação de outras possíveis causas genéticas para sua doença pulmonar.

A análise molecular foi possível em 99,5% do exoma com cobertura média de 165 vezes. O estudo do exoma afastou outras mutações na *STAT5B*, que poderiam levar a doença pulmonar por heterozigose composta, e também afastou mutações nos outros genes reconhecidamente associados a pneumopatias até este momento (Tabela 6). Todos esses genes tiveram 100% de cobertura. Foi identificada uma variante alélica *missense* (c.1627 G>C / p.Val543Leu) no éxon 12 do gene da Janus quinase 3 (*JAK3*), ausente em 7.200 controles caucasianos, porém considerada benigna por métodos de predição *in silico* ^(47, 48).

Tabela 6 – Genes associados a pneumopatias de causa hereditária

Símbolo	Nome	OMIM
<i>CFTR</i>	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>	602421
<i>MUC5B</i>	<i>Mucin 5, subtype B, tracheobronchial</i>	600770
<i>SCNN1A</i>	<i>Sodium channel, nonvoltage-gated 1, alpha subunit</i>	600228
<i>SCNN1B</i>	<i>Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta subunit</i>	600760
<i>SCNN1G</i>	<i>Sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma subunit</i>	600761
<i>SFTPA1</i>	<i>Surfactant, pulmonary-associated protein A1</i>	178630
<i>SFTPA2</i>	<i>Surfactant, pulmonary-associated protein A2</i>	178642
<i>SFTPC</i>	<i>Surfactant, pulmonary-associated protein C</i>	178620
<i>TERC</i>	<i>Telomerase RNA component</i>	602322
<i>TERT</i>	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	187270

OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man

4.6 Genotipagem da variante c.1627 G>C da *Janus quinase 3 (JAK3)*

Uma vez que a JAK3 está envolvida na via de sinalização dos receptores de citocinas, como o receptor de IL-2, e mutações inativadoras em homozigose em seu gene causam imunodeficiência combinada grave⁽⁴⁹⁾, a pneumopatia da paciente poderia ter sido causada por um mecanismo digênico, em que defeitos em heterozigose na *STAT5B* e na *JAK3* atuariam de forma conjunta. Para avaliar esta hipótese, foi estudada a presença desta variante alélica da *JAK3* nos familiares mais próximos à paciente.

De oito familiares estudados, cinco apresentaram esta variante alélica, sendo que dois deles eram heterozigotos para a mutação c.424_427del da

STAT5B. Ambos eram assintomáticos do ponto de vista pulmonar. Um desses indivíduos era filho da paciente portadora de pneumopatia e poderia ainda não ter sintomas pulmonares pela sua idade (8 anos). No entanto, o outro familiar portador da mutação na *STAT5B* e da variante alélica na *JAK3* era tio da paciente, tinha 78 anos de idade e era ex-tabagista, sendo esperado que já tivesse acometimento pulmonar se a hipótese do mecanismo digênico estivesse correta. Assim, foi considerado pouco provável que esta hipótese explicasse a pneumopatia nesses pacientes (Figura 10).

Figura 10 – Heredograma dos pacientes avaliados para a variante alélica c.1627 G>C na *JAK3*

Os pacientes marcados em preto apresentam pneumopatia crônica de etiologia indeterminada. *JAK3* - janus quinase 3; *STAT5B* - transdutor de sinal e ativador de transcrição 5B; WT/Mut - heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B*; WT/Var - heterozigotos para a variante alélica c.1627 G>C na *JAK3*.

4.7 Impacto das mutações da *STAT5B* em heterozigose sobre a altura

Através da revisão dos relatos de pacientes homozigotos para mutações da *STAT5B* na literatura e do contato feito com seus autores, foram encontrados dados de altura de 13 familiares de primeiro grau (pais e irmãos) de seis pacientes. Duas pacientes foram adotadas logo após o nascimento e não há dados sobre seus pais biológicos (uma com a mutação c.454C>T / p.Arg152X e a outra com a mutação c.1937T>C / p.Phe646Ser) ^(12, 14). Adicionalmente, foram incluídos nesta análise os pais dos pacientes homozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* e os pais dos outros casos de Criciúma com quadro clínico semelhante ao dos casos-índice. Todos esses familiares eram heterozigotos para mutações na *STAT5B*.

O escore Z de altura desses indivíduos, calculado em relação a cada população de origem, foi $-1,4 \pm 0,8$. Não houve diferença no acometimento da altura entre homens e mulheres. Os dados individuais encontram-se na Tabela 7 e na Figura 11. Em comparação, os pacientes homozigotos para mutações da *STAT5B* apresentaram escore Z de altura de $-6,2 \pm 1,8$, significativamente mais baixo que o dos seus familiares heterozigotos para estas mutações ($p < 0,001$) (Figura 12).

Tabela 7 - Dados dos pacientes homozigotos para mutações na *STAT5B* e de seus familiares de primeiro grau

Família n°	Ref	Consanguinidade	Mutação c.DNA	Origem	Escore Z de altura em relação à população de origem			
					Pacientes	Pais	Mães	Irmãos
1	(7)	Sim	c.1888G>C	Argentina	-7,5	-0,3	-1,2	
2	(8)	Sim	c.1191insG	Turquia	-7,8	-0,9	-0,6	
3	(10)	Não	c.1102insC	Caribe	-5,9	-2,8	-0,8	-2,3 / -0,8
4	(9)	Não	c.454C>T	Argentina	-9,9	-2,2	-3,3	-2,0
5	(11)	Sim	c.1680delG	Kuwait	-5,6 / -5,8	-1,3	-0,6	
6	(12)	Adotada	c.454C>T	Argentina	-5,3	ND	ND	
7	(13)	Não	c.424_427del	Brasil	-5,6 / -3,0	-1,5	-1,0	
8	(14)	Adotada	c.1937T>C	Argentina	-5,95	ND	ND	
9	atual	Sim	c.424_427del	Brasil	ND*	-0,9	-1,9	
Média ± DP					-6,2 ± 1,8		-1,4 ± 0,8	
Mediana (variação)					-5,9 (-9,9; -3,0)		-1,2 (-3,3; -0,3)	

ND - não disponível

* - pacientes faleceram antes da avaliação.

Figura 11 - Número de indivíduos heterozigotos para mutações na *STAT5B* em cada escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) da altura

Figura 12 - Número de indivíduos homozigotos (em azul) e heterozigotos (em laranja) para mutações na *STAT5B* em cada escore de desvio-padrão para idade e sexo (escore Z) da altura

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose na população de Criciúma e possibilidade de recorrência de homozigose

Foram descritos apenas 10 casos de pacientes com GHI secundária a mutações na *STAT5B* desde 2003. Apesar da probabilidade de haver subdiagnóstico desta condição, pode-se considerá-la uma síndrome rara. Ainda assim, a mutação c.424_427del da *STAT5B* foi encontrada em heterozigose em sete famílias em Criciúma e a sua frequência alélica na população local foi de 0,29%, mais de três vezes maior que a da variante alélica patogênica mais frequente encontrada em bancos de dados públicos (Tabela 3).

Utilizando-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg ⁽⁵⁰⁾ e considerando-se q igual a 0,0029, a frequência de indivíduos heterozigotos para esta mutação seria $2pq$ ou 0,005783. Em uma população de 204.667 habitantes, esse valor corresponderia a aproximadamente 1.183 indivíduos heterozigotos. Já a frequência de indivíduos homozigotos para o alelo mutado seria q^2 ou 0,0000084. Com este valor e a taxa de nascidos vivos fornecida pelo IBGE (2.981 crianças em 2013), foi possível estimar a incidência de homozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* em 1 a cada 40 anos. No entanto, utilizando-se a maior frequência possível de acordo com o intervalo de confiança (0,5%), esta incidência poderia atingir 1 a cada 13 anos. Como

retorno à sociedade, serão enviadas às secretarias de saúde das cidades de Criciúma e Tubarão cartas informativas sobre os resultados e implicações desta tese.

5.2 O efeito fundador e a origem da mutação c.424_427del da *STAT5B*

A presença da mutação c.424_427del da *STAT5B* em sete famílias não sabidamente relacionadas poderia ter como causas sua recorrência ou o efeito fundador. No entanto, o encontro do mesmo haplótipo em todos os indivíduos heterozigotos e em apenas 9,4% dos indivíduos controles da mesma região tornou improvável que esta mutação tivesse origens independentes. Consequentemente, foi possível concluir que os indivíduos portadores desta mutação tiveram um antepassado em comum de quem herdaram este haplótipo, caracterizando a existência do efeito fundador.

A origem comum descoberta entre as famílias foi a cidade de Tubarão. O povoamento de Tubarão começou em 1774, com a abertura do caminho entre Lages e Laguna, inicialmente como um ponto de parada dos tropeiros. Seus primeiros habitantes foram imigrantes de origem portuguesa e açoriana e brasileiros com ancestralidade mista. Em 1877, começaram a chegar imigrantes europeus, predominantemente italianos, mas também alemães e poloneses⁽⁵²⁾.

A análise dos haplogrupos do cromossomo Y e mtDNA mostrou que a origem comum das sete famílias é europeia, uma vez que não foram encontrados haplogrupos de origem africana e os haplogrupos de origem

ameríndia estavam presentes em apenas três famílias. A distribuição geográfica dos haplogrupos europeus apontou para uma origem provável da Europa Ocidental ⁽⁴⁶⁾. Considerando-se a história da formação de Tubarão, esse achado sugeriu uma provável origem portuguesa para a mutação, embora não tenha sido possível excluir outras origens europeias. A presença de haplogrupos de origem ameríndia no mtDNA evidenciou a existência de casamentos entre descendentes de europeus e americanos nativos, como observado em outras populações da América Latina ⁽⁵¹⁾.

5.3 Modelos para a base genética de caracteres complexos

Em condições de saúde e nutrição adequadas, a genética é o principal determinante da altura, sendo responsável por cerca de 80% de sua variabilidade ⁽⁵⁴⁾. Nas últimas décadas, foram identificados diversos genes responsáveis por formas graves de baixa estatura com herança mendeliana ⁽⁵⁵⁾, porém os fatores genéticos responsáveis pela variabilidade de altura de indivíduos normais e pela baixa estatura próxima ao limite inferior da normalidade são muito menos conhecidos.

De acordo com a hipótese doença comum - variante comum, um número limitado de variantes genéticas comuns com efeito moderado sobre o fenótipo poderia explicar a maior parte da variabilidade de características quantitativas e do risco de doenças complexas na população ⁽⁵⁶⁾. No entanto, apesar do aumento progressivo no número de indivíduos avaliados nos estudos de associação genômica ampla (GWAS, *genome-wide association*

studies), os *loci* encontrados ainda explicam uma fração pequena da variabilidade da altura. Um GWAS recente ⁽⁵⁷⁾ identificou 697 variantes em 423 *loci* que juntos explicaram apenas um quinto da herdabilidade da altura adulta. Além disso, o efeito individual de cada polimorfismo de nucleotídeo único (SNP; *single nucleotide polymorphisms*) encontrado neste tipo de estudo é pequeno (menos de 0,5 cm) ⁽⁵⁸⁾.

Surgiram então três modelos que tentam explicar a variabilidade de características quantitativas e do risco de doenças complexas na população. Segundo o modelo infinitesimal, um grande número de variantes genéticas comuns, com efeitos individuais pequenos, dispostas ao longo de todo o genoma, seria a maior fonte dessa variação. No modelo dos alelos raros, a maior parte da variabilidade seria explicada por alelos raros com grande efeito individual. Por fim, de acordo com o modelo da herdabilidade em sentido amplo, devem ser considerados também as interações genótipo-genótipo, genótipo-ambiente e efeitos epigenéticos. Autores moderados consideram que provavelmente os três modelos contribuem em diferentes graus para diferentes características e doenças ⁽⁵⁹⁾.

5.4 Fenótipo da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose

Os indivíduos heterozigotos para a mutação c.424_427del da *STAT5B* foram significativamente mais baixos que seus familiares não portadores, embora dentro da variação normal para a altura. Considerando-se o desvio-padrão médio para ambos os sexos igual a 6,5 cm, a redução encontrada no

escore Z de altura de 0,6 equivale a uma perda de 3,9 cm, um efeito individual muito maior que o atribuído aos SNPs identificados nos GWAS. Os escores Z do IGF-1 e IGFBP-3 significativamente mais baixos vistos nestes indivíduos sugerem que uma diminuição da sensibilidade à ação do GH poderia explicar ao menos parcialmente a redução observada na altura.

Adicionalmente, esses indivíduos apresentaram significativamente mais doenças de pele, em especial eczema, em relação a seus familiares não portadores da mutação. Além disso, dois deles apresentaram pneumopatia crônica de etiologia indeterminada. Em ambas as situações, os acometimentos foram mais leves que os vistos nos pacientes homozigotos para mutações da *STAT5B*, porém não pode ser descartada a hipótese de terem sido causadas pela própria mutação em heterozigose. São necessários mais estudos para confirmar esta hipótese e, neste caso, explicar a variabilidade fenotípica encontrada, uma vez que outros heterozigotos não foram afetados.

5.5 Impacto das mutações da *STAT5B* em heterozigose sobre a altura

A análise em conjunto dos dados disponíveis sobre a altura de indivíduos heterozigotos para diferentes mutações da *STAT5B* também mostrou uma redução significativa em sua estatura em relação à média de suas populações de origem. A diminuição neste caso foi ainda maior do que a vista nos portadores da mutação c.424_427del da *STAT5B*, sendo equivalente a 9,1cm. Esta diferença pode ser explicada pelo número

pequeno de dados disponíveis e/ou por efeitos variáveis dependentes de cada mutação da *STAT5B*.

5.6 A participação de mutações raras com efeito moderado sobre a variabilidade da altura

A redução da altura vista em indivíduos heterozigotos para mutações da *STAT5B* corrobora os dados de outros estudos que avaliaram o efeito de alterações em heterozigose em genes envolvidos no processo de crescimento. No eixo GH-IGF-1, Walenkamp *et al* constataram que indivíduos portadores da mutação p.V44M em heterozigose no gene *IGF1* foram 0,6 desvios-padrão da altura mais baixos que seus familiares não portadores, o que equivale a uma redução de 3,9 cm ⁽³⁵⁾. Outro grupo demonstrou que indivíduos portadores de mutações em heterozigose na *IGFALS* foram em média 0,9 DP mais baixos que seus familiares não portadores, ou 5,8 cm ⁽³⁶⁾.

Mutações em heterozigose em genes envolvidos no controle do crescimento ósseo também tiveram impacto sobre a altura. Um exemplo foi o estudo de uma família com a mutação c.1092delT no gene do receptor do peptídeo natriurético tipo B (*NPR2*), em que os heterozigotos para a mutação foram 1,4 desvios-padrão mais baixos que seus familiares não portadores, o que é equivalente a uma redução de 9,1 cm na altura ⁽⁵³⁾.

Os resultados do presente estudo em conjunto com os dados acima favorecem a hipótese de que variantes patogênicas raras em heterozigose

contribuem para a variabilidade da altura normal e para a determinação da baixa estatura em um modelo poligênico.

6 Conclusões

- 6.1 A frequência da mutação c.424_427del da *STAT5B* na população de Criciúma-SC foi de 0,29% (intervalo de confiança 95%: 0,08 a 0,5%).
- 6.2 A mutação c.424_427del da *STAT5B* identificada nas famílias deste estudo teve origem em um antepassado comum, caracterizando a presença do efeito fundador.
- 6.3 A presença da mutação c.424_427del da *STAT5B* em heterozigose conferiu uma redução pequena, porém significativa na altura, IGF-1 e IGFBP-3.

7 Anexos

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Estudo do fenótipo associado à mutação p.L142fsX161 da STAT5B em heterozigose".

PESQUISADOR : Alexander Augusto de Lima Jorge

CARGO/FUNÇÃO: Médico Responsável e Professor Associado INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL
Nº 80.218

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – O senhor(a) esta sendo convidado a participar do estudo abaixo descrito:

Recentemente identificamos em Criciúma dois irmãos com um quadro de baixa estatura grave associada à doença pulmonar. Trata-se de uma doença genética rara.

O objetivo do estudo é analisar se os familiares destes dois irmãos apresentam alguma alteração, mesma que mínima do crescimento e dos hormônios relacionados.

Outro objetivo é avaliar se a alteração genética achada nestes dois pacientes encontra-se presente na população de Criciúma.

2 – Não existem procedimentos experimentais e não rotineiros no presente estudo.

3 – Os seguintes procedimentos rotineiros serão realizados:

Para todos os indivíduos (familiares dos pacientes e indivíduos saudáveis da população de Criciúma), será obtido DNA através de uma escova/cotonete que será passada na parte interna da bochecha.

Apenas para os familiares dos pacientes serão coletados 3 tubos pequenos de sangue ($\pm$ 10 ml) de veia periférica para análise hormonal. Todo estudo será realizado em nosso laboratório.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

Apenas os relacionados à coleta de sangue simples: dor mínima no local da punção e risco mínimo de formar mancha roxa local (equimose) ou de infecção local.

5 – O estudo não traz benefícios diretos aos envolvidos. Porém, nosso estudo ajudará a melhor definir a importância das alterações genéticas encontradas nos pacientes estudados.

6 – Não existe procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais os participantes do estudo possam optar

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr *Alexander Augusto de Lima Jorge*. que pode ser encontrado no endereço - *Faculdade de Medicina da USP (LIM-25) - Av. Dr. Arnaldo, 455 5º andar sala 5340 CEP 01246-903 São Paulo – SP* Telefone(s) (55 11) 3061-7252. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da

pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMUSP – Av. Dr. Arnaldo 455 – São Paulo – SP – CEP 01246-903, telefone: 3061-7412, – E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

No caso de retirada do consentimento, todas as amostras serão destruídas e nenhum resultado será processado.

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante;

10 – Durante o estudo, qualquer resultado relevante para o participante será imediatamente informado ao mesmo. Ao término do estudo todos os envolvidos serão informados dos resultados do mesmo e orientados caso haja alguma importância para seu estado de saúde.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – O pesquisador compromete-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo do fenótipo associado à mutação p.L142fsX161 da STAT5B em heterozigose”. Eu discuti com o Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorde voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo B – Dados clínicos dos indivíduos heterozigotos (HT) para a mutação c.424_427del da *STAT5B*

HT x.y	Sexo	Idade (a)	Z altura	Eczema na avaliação
I.2	F	83	-1,2	ausente
I.4	F	65,4	-1,8	ausente
I.5	M	60,5	0,1	ausente
I.6	M	69,0	-0,8	ausente
I.9	F	24,3	-0,5	ND
I.11	M	20,3	1,2	ausente
I.12	M	18,4	1,6	ausente
I.13	M	51,6	-1,1	ausente
I.15	F	45,7	-0,5	ausente
I.17	F	41,8	-1,0	ausente
I.19	F	5,6	-0,34	ausente
I.20	M	12,9	-0,8	ausente
II.2	M	70,5	-1,7	ausente
II.3	M	69,9	-0,9	ausente
II.4	M	44,9	-1,5	ausente
II.8	M	43,7	-1,4	ausente
II.9	M	42,2	-1,6	ausente
II.12	F	32,6	-0,1	presente
II.18	F	23,7	-1,0	ausente
II.21	F	14,2	-0,8	ausente
II.29	M	8,4	0,8	presente
III.1	M	63,2	-0,9	ausente
III.2	F	60,3	-1,9	ausente
IV.1	F	71,7	-3,5*	ausente
IV.2	F	44,4	-1,9	ausente
IV.4	F	11,5	-0,9	presente
V.2	M	39,5	-1,5	ausente
V.3	F	13,1	-1,1	ausente
V.4	M	5,2	-1,3	ausente
VI.1	F	54,5	-1,5	ND
VI.2	M	50,3	0,2	presente
VI.3	F	38,8	-1,2	ausente
VII.1	M	67,1	-0,3	ND

A – anos; heterozigoto x.y – indivíduo heterozigoto para a mutação c.424_427del da *STAT5B* número y da família número x; ND – não disponível; Z altura – escore de desvio-padrão da altura para idade e sexo; * - excluída da análise de altura pela baixa estatura grave de causa indeterminada.

Anexo C - Dados clínicos dos familiares não portadores (*wild type* – WT) da mutação c.424_427del da *STAT5B*

WT x.y	Sexo	Idade (a)	Z altura	Eczema na avaliação
I.1	F	88,5	-1,3	ausente
I.3	M	78,7	-0,8	ausente
I.7	F	69,5	-1,9	ausente
I.8	F	26,0	0,5	ausente
I.10	F	22,8	1,2	ausente
I.14	M	46,7	-0,1	ausente
I.16	M	28,3	0,5	ausente
I.18	M	0,9	-0,3	ausente
I.21	F	26,4	0,3	ausente
I.22	M	19,9	1,1	ausente
I.23	F	8,0	0,7	ausente
II.1	F	61,2	-1,0	ausente
II.5	F	42,8	0,2	ausente
II.6	F	36,5	-0,8	ausente
II.7	M	36,7	-0,3	ausente
II.10	M	36,0	-1,2	ausente
II.11	F	34,7	1,2	ausente
II.13	F	24,4	-0,1	ausente
II.14	F	22,6	0,6	ausente
II.15	F	26,3	-1,2	ausente
II.16	F	21,8	0,8	ausente
II.17	F	4,7	1,1	ausente
II.19	M	16,7	1,1	ausente
II.20	M	19,5	-2,0	ausente
II.22	F	17,5	-2,0	ausente
II.23	M	10,3	-0,3	ausente
II.24	F	14,7	-0,5	ausente
II.25	F	12,3	0,1	ausente
II.26	M	10,0	0,7	ausente
II.27	F	4,5	ND	ausente
II.28	F	14,1	1,6	ausente
III.3	F	42,2	-1,2	ausente
III.4	F	25,6	-0,4	ausente
IV.3	F	26,0	-0,8	ausente
IV.5	M	5,7	-0,7	ausente
IV.6	F	1,6	-1,3	ausente
V.1	F	67,6	-0,8	ausente
VI.4	F	6,5	-1,0	ausente

A – anos; não portador x.y – familiar não portador da mutação c.424_427del da *STAT5B* número y da família número x; ND – não disponível; Z altura – escore de desvio-padrão da altura para idade e sexo.

Anexo D - Exames gerais dos pacientes heterozigotos (HT) para a mutação c.424_427del da *STAT5B*

HT x.y	Leuco (cél/s/mm ³)	Linfo (cél/s/mm ³)	Eosino (cél/s/mm ³)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgE (UI/ml)	Gli (mg/dl)	Ins (μU/ml)	PepC (ng/ml)
I.2	5900	1841	584	1192	365	136	88	2,3	1,3
I.4	6400	2899	262	780	248	81	92	13,4	4,1
I.5	4900	1847	270	1043	510	30	103	7,9	5,0
I.6	5700	1579	239	766	686	122	128	8,5	2,4
I.9	6100	2349	360	1062	287	159	86	3,0	1,4
I.12	7500	2693	338	1230	319	4	88	7,4	2,2
I.13	5400	1269	243	824	228	331	86	10,0	2,9
I.15	4200	1453	193	1037	252	117	82	4,0	1,4
I.17	4620	1700	100	1006	155	2	72	7,0	2,1
I.19	9800	4410	686	1155	122	33	82	1,3	1,5
I.20	6100	2086	354	1050	133	827	82	1,7	0,8
II.2	8800	1206	370	1169	424	276	94	3,5	1,3
II.3	5800	1212	296	1234	330	234	118	5,3	3,2
II.4	6370	2300	100	1077	316	107	91	8,6	1,4
II.8	7600	1748	342	851	215	3	76	12,4	3,2
II.9	6200	1965	260	1147	190	3	103	19,5	4,0
II.12	6200	1928	236	1441	390	509	86	4,5	2,4
II.18	5800	1914	464	915	182	44	88	6,5	1,9
II.21	4600	2300	276	1070	114	938	91	5,4	1,6
II.29	5600	1680	504	981	150	ND	86	ND	ND
IV.1	4600	1334	138	775	217	50	113	4,9	1,7
IV.2	7100	1441	220	753	86	90	86	2,1	1,3
IV.4	7700	3326	316	1119	66	1	72	3,4	2,1
V.2	10600	2629	403	956	241	166	78	7,3	2,3
V.3	7700	2626	316	936	137	15	78	2,1	2,0
V.4	8300	4366	324	803	69	97	75	1,4	0,6
VI.2	12300	5018	726	1285	262	422	111	37,5	6,9
VI.3	7200	1843	763	1403	329	197	90	1,8	1,4
VII.1	10800	5551	497	581	68	1	94	6,0	2,2

Eosino – eosinófilos; gli – glicemia de jejum; HT x.y – indivíduo heterozigoto para a mutação c.424_427del da *STAT5B* número y da família número x; IgA – imunoglobulina A; IgE – imunoglobulina E; IgG – imunoglobulina G; ins – insulinemia; leuco – leucócitos; linfo – linfócitos; ND – não disponível; pep C – peptídeo C. Os indivíduos I.11, III.1, III.2 e VI.1 não coletaram exames laboratoriais.

Anexo E – Exames gerais dos familiares não portadores (*wild type* – WT) da mutação c.424_427del da *STAT5B*

WT x.y	Leuco (cél/s/mm ³)	Linfo (cél/s/mm ³)	Eosino (cél/s/mm ³)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgE (UI/ml)	Gli (mg/dl)	Ins (μU/ml)	PepC (ng/ml)
I.1	6600	3439	251	1104	405	7,3	98	8,4	2,9
I.3	8800	3696	590	1755	229	433	71	3,5	6,2
I.7	6000	2232	294	ND	ND	5	99	3,4	1,2
I.8	6100	2080	214	1301	231	54	84	1,6	1,2
I.10	5700	1773	165	1052	186	70	92	2,5	1,6
I.14	5000	1570	265	692	436	155	107	2,2	1,1
I.16	6200	1767	279	984	277	60	111	12,5	2,9
I.18	12600	8631	479	418	12	13	96	4,4	1,5
I.21	8400	2512	378	1071	180	18	95	5,0	2,0
I.22	3800	1391	175	1230	190	286	89	8,5	1,7
I.23	5500	2305	204	1100	203	404	97	9,7	1,9
II.1	5100	1841	301	1014	520	30	79	13,7	2,1
II.5	6200	2393	304	1075	393	27	74	1,9	ND
II.6	6300	2526	328	1049	297	35	89	10,5	1,9
II.7	ND	ND	ND	923	241	162	82	16,5	4,1
II.10	4600	1978	271	1095	202	2	70	8,9	2,5
II.11	4400	1584	352	1277	307	11	85	3,7	1,7
II.13	8400	2906	319	1446	461	580	92	13,7	2,8
II.14	6200	1773	236	1209	176	2	ND	6,4	0,9
II.15	7700	1856	323	1046	352	27	77	6,2	1,6
II.16	6500	2789	267	880	376	13	77	7,4	1,0
II.17	9000	3465	324	1067	139	72	67	7,2	1,5
II.19	5500	1485	275	1204	113	5540	92	5,6	2,0
II.20	5700	2679	399	1189	298	143	91	6,4	2,0
II.22	6700	3250	429	902	110	304	65	5,0	1,5
II.23	4600	2659	239	962	131	55	74	5,1	1,3
II.24	6500	2977	397	1034	216	43	75	7,8	2,9
II.25	5500	2569	374	1064	129	109	70	9,0	2,0
II.26	4200	1970	210	1153	167	245	72	3,4	1,2
II.27	13000	3835	585	784	143	17	73	2,7	1,0
II.28	6400	1856	512	964	139	757	88	4,4	1,6
IV.3	6500	2750	221	1358	146	16	92	10,9	3,6
IV.5	6200	2672	180	684	121	213	73	1,9	1,4
IV.6	16800	9811	756	581	22	63	72	ND	ND
VI.4	9100	3231	1092	1182	115	15	90	5,2	1,3

Eosino – eosinófilos; gli – glicemia de jejum; IgA – imunoglobulina A; IgE – imunoglobulina E; IgG – imunoglobulina G; ins – insulinemia; leuco – leucócitos; linfo – linfócitos; ND – não disponível; pep C – peptídeo C; WT x.y – indivíduo não portador da mutação c.424_427del da *STAT5B* número y da família número x. Os indivíduos III.3, III.4 e V.1 não coletaram exames laboratoriais.

Anexo F - Exames hormonais dos indivíduos heterozigotos (HT) para a mutação c.424_427del da *STAT5B*

HT x.y	GH basal (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)	Z IGF-1	IGFBP-3 (µg/ml)	Z IGFBP-3	Prolactina (ng/ml)
I.2	0,8	31,3	-3,2	1630	-3,0	6,8
I.4	< 0,05	50	-3,0	3820	-1,0	7,7
I.5	0,6	161	0,8	5590	0,9	11,8
I.6	0,2	85	-1,1	992	-5,2	7,9
I.9	0,1	223	0,4	5370	0,0	28,3
I.12	0,1	357	0,2	5330	0,4	18,5
I.13	< 0,05	107	-1,0	2650	-3,1	13
I.15	0,2	142	-0,5	4510	-0,2	9,7
I.17	0,4	123	-1,0	3300	-2,0	18,3
I.19	0,3	ND	ND	ND	ND	5,2
I.20	0,7	249	-0,5	3300	-1,2	14,4
II.2	3,0	83	-1,2	2400	-2,8	8,1
II.3	0,4	111	-0,1	3420	-1,1	7,0
II.4	0,1	227	1,4	4900	0,2	26,1
II.8	5,6	211	1,1	3218	-1,9	6,9
II.9	< 0,05	98	-2,0	4090	-0,8	3,5
II.12	5,8	214	0,6	4750	-0,2	35,2
II.18	4,9	171	-0,6	4850	-0,5	15
II.21	0,4	435	0,3	5090	-0,2	10,2
II.29	1,5	42,4	-2,3	2710	0,0	9,3
IV.1	8,7	80	-1,1	2900	-1,5	7,7
IV.2	0,3	191	0,7	3790	-1,2	12,1
IV.4	1,4	427	1,3	6510	1,2	12,4
V.2	0,3	164	-0,2	4580	-0,2	17,8
V.3	0,5	662	1,4	5960	0,3	12,6
V.4	2,0	62	-1,5	2400	0,0	8,1
VI.2	0,3	157	0,2	4860	0,1	7,4
VI.3	0,2	147	-0,6	4130	-0,8	8,4
VII.1	0,1	108	-0,3	2420	-2,8	14,0

GH – hormônio de crescimento; HT x.y – indivíduo heterozigoto para a mutação c.424_427del da *STAT5B* número y da família número x; IGF-1 – fator de crescimento insulina-símile tipo 1; IGFBP-3 – proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile; ND – não disponível; Z – escore de desvio-padrão para idade e sexo. Os indivíduos I.11, III.1, III.2 e VI.1 não coletaram exames laboratoriais.

Anexo G – Exames hormonais dos familiares não portadores (*wild type* – WT) da mutação c.424_427del da *STAT5B*

WT x.y	GH basal (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)	Z IGF-1	IGFBP-3 (µg/ml)	Z IGFBP-3	Prolactina (ng/ml)
I.1	0,2	103	0,3	4510	2,3	4,6
I.3	0,5	137	1,1	3330	-0,2	13,6
I.7	0,2	145	0,9	2730	-2,3	4,6
I.8	1,6	202	0,1	3285	-2,3	52,5
I.10	1,4	202	0,0	5200	-0,1	7,4
I.14	0,8	88	-2,1	2700	-2,9	6,0
I.16	0,1	237	0,8	3170	-2,5	12,5
I.18	0,1	26,3	-2,9	3320	1,9	10,6
I.21	5,8	179	-0,3	3890	-1,4	7,3
I.22	0,1	245	-0,4	5190	0,5	6,8
I.23	0,2	322	1,8	5140	1,1	10,0
II.1	0,7	80	-1,6	2470	-2,9	7,0
II.5	0,1	183	0,5	4070	-0,8	16,6
II.6	1,2	291	2,2	4810	0,1	11,6
II.7	0,1	142	-0,8	3750	-1,4	8,4
II.10	0,1	157	-0,4	3940	-1,0	8,7
II.11	6,9	180	-0,1	4430	-0,6	41,5
II.13	1,1	210	0,2	7030	1,4	15,3
II.14	1,2	208	0,1	6920	1,3	12,4
II.15	2,7	277	1,4	4710	-0,4	16,8
II.16	1,4	247	0,8	3620	-1,9	19,4
II.17	3,0	211	1,9	3199	1,0	8,0
II.19	0,3	395	-0,5	5680	0,0	3,6
II.20	0,1	341	0,1	3900	-0,8	19,4
II.22	0,3	156	-2,5	4370	-0,9	23,4
II.23	0,1	108	-0,2	3690	-0,2	8,4
II.24	0,2	694	1,2	6140	0,2	34,6
II.25	0,2	623	1,7	5600	0,4	8,8
II.26	0,1	234	0,5	4800	0,6	7,1
II.27	0,2	178	0,9	4550	1,8	4,1
II.28	3,4	515	0,2	5470	0,3	10,3
IV.3	0,1	394	3,0	6730	1,5	12,7
IV.5	0,2	126	0,1	7180	3,2	6,2
IV.6	0,9	189	0,7	3520	1,9	9,6
VI.4	0,3	293	1,9	4920	1,6	4,8

GH – hormônio de crescimento; IGF-1 – fator de crescimento insulina-símile tipo 1; IGFBP-3 – proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile; WT x.y – indivíduo não portador da mutação c.424_427del da *STAT5B* número y da família número x; Z – escore de desvio-padrão para idade e sexo. Os indivíduos III.3, III.4 e V.1 não coletaram exames laboratoriais.

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Jorge AA, Marui S, Mendonca BB, Arnhold IJ. Crescimento Normal e Baixa Estatura. In: Saad MJA, Maciel RMB, Mendonca BB, editors. Endocrinologia. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2007. p. 187-226.
2. Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab*. 2000;71(1-2):293-314.
3. Waters MJ, Brooks AJ. Growth hormone receptor: structure function relationships. *Horm Res Paediatr*. 2011;76 Suppl 1:12-6.
4. Hwa V, Nadeau K, Wit JM, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: lessons from STAT5b gene mutations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 Feb;25(1):61-75.
5. Laron Z. Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958-2003. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Mar;89(3):1031-44.
6. David A, Hwa V, Metherell LA, Netchine I, Camacho-Hubner C, Clark AJ, et al. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity. *Endocrine reviews*. 2011 Aug;32(4):472-97.
7. Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med*. 2003 Sep 18;349(12):1139-47.

-
8. Hwa V, Little B, Adiyaman P, Kofoed EM, Pratt KL, Ocal G, et al. Severe growth hormone insensitivity resulting from total absence of signal transducer and activator of transcription 5b. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jul;90(7):4260-6.
 9. Bernasconi A, Marino R, Ribas A, Rossi J, Ciaccio M, Oleastro M, et al. Characterization of immunodeficiency in a patient with growth hormone insensitivity secondary to a novel STAT5b gene mutation. *Pediatrics.* 2006 Nov;118(5):e1584-92.
 10. Vidarsdottir S, Walenkamp MJ, Pereira AM, Karperien M, van Doorn J, van Duyvenvoorde HA, et al. Clinical and biochemical characteristics of a male patient with a novel homozygous STAT5b mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Sep;91(9):3482-5.
 11. Hwa V, Camacho-Hubner C, Little BM, David A, Metherell LA, El-Khatib N, et al. Growth hormone insensitivity and severe short stature in siblings: a novel mutation at the exon 13-intron 13 junction of the STAT5b gene. *Horm Res.* 2007;68(5):218-24.
 12. Boyanovsky A, Lozano A, Testa G, editors. Growth hormone insensitivity and immunodeficiency: mutation in the STAT5B gene. *8th Joint Meeting of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society/European Society for Paediatric Endocrinology* 2009; New York: ESPE.
 13. Pugliese-Pires PN, Tonelli CA, Dora JM, Silva PC, Czepielewski M, Simoni G, et al. A novel STAT5B mutation causing GH insensitivity syndrome associated with hyperprolactinemia and immune dysfunction in two male siblings. *Eur J Endocrinol.* 2010 Aug;163(2):349-55.

14. Scaglia PA, Martinez AS, Feigerlova E, Bezrodnik L, Gaillard MI, Di Giovanni D, et al. A novel missense mutation in the SH2 domain of the STAT5B gene results in a transcriptionally inactive STAT5b associated with severe IGF-I deficiency, immune dysfunction, and lack of pulmonary disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 May;97(5):E830-9.
15. Wakao H, Gouilleux F, Groner B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J.* 1994 May 1;13(9):2182-91.
16. Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 12;92(19):8831-5.
17. Mui AL, Wakao H, Harada N, O'Farrell AM, Miyajima A. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-5 transduce signals through two forms of STAT5. *J Leukoc Biol.* 1995 May;57(5):799-803.
18. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell.* 1998 May 29;93(5):841-50.
19. Mayr S, Welte T, Windegger M, Lechner J, May P, Heinrich PC, et al. Selective coupling of STAT factors to the mouse prolactin receptor. *Eur J Biochem.* 1998 Dec 1;258(2):784-93.
20. Snow JW, Abraham N, Ma MC, Herndier BG, Pastuszak AW, Goldsmith MA. Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *J Immunol.* 2003 Nov 15;171(10):5042-50.

-
21. Imada K, Bloom ET, Nakajima H, Horvath-Arcidiacono JA, Udy GB, Davey HW, et al. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J Exp Med*. 1998 Dec 7;188(11):2067-74.
 22. Davoodi-Semiromi A, McDuffie M, Litherland S, Clare-Salzler M. A mutant Stat5b with weaker DNA binding affinity defines a key defective pathway in nonobese diabetic mice. *J Biol Chem*. 2004 Mar 19;279(12):11553-61.
 23. Jin Y, Purohit S, Chen X, Yi B, She JX. Over-expression of Stat5b confers protection against diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mice via up-regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 10;424(4):669-74.
 24. Nadeau K, Hwa V, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: an unsuspected cause of growth failure, immunodeficiency, and severe pulmonary disease. *J Pediatr*. 2011 May;158(5):701-8.
 25. Casanova JL, Holland SM, Notarangelo LD. Inborn errors of human JAKs and STATs. *Immunity*. 2012 Apr 20;36(4):515-28.
 26. Burchill MA, Goetz CA, Prlic M, O'Neil JJ, Harmon IR, Bensinger SJ, et al. Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):5853-64.
 27. Cohen AC, Nadeau KC, Tu W, Hwa V, Dionis K, Bezrodnik L, et al. Cutting edge: Decreased accumulation and regulatory function of CD4+CD25(high) T cells in human STAT5b deficiency. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):2770-4.

-
28. Marchiori E, Damato S, Rodrigues R, Valiante PM, Mendonça RG, Miyagui T, et al. [Lymphocytic interstitial pneumonia: correlation of high-resolution computed tomography findings with anatomopathology]. *Radiol Bras*. 2002;35(4):199-203.
 29. Collett-Solberg PF, Misra M. The role of recombinant human insulin-like growth factor-I in treating children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jan;93(1):10-8.
 30. Jenks JA, Seki S, Kanai T, Huang J, Morgan AA, Scalco RC, et al. Differentiating the roles of STAT5B and STAT5A in human CD4+ T cells. *Clin Immunol*. 2013 Aug;148(2):227-36.
 31. Mayr E. Speciation and selection. *Proc Am Philos Soc*. 1949 Dec 29;93(6):514-9.
 32. Contribuidores da Wikipédia. Criciúma. Wikipédia, a enciclopédia livre [serial on the Internet]. 2015: Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Crici%C3%BAma&oldid=42543959>.
 33. Jorge AA, Menezes Filho HC, Lins TS, Guedes DR, Damiani D, Setian N, et al. [Founder effect of E180splice mutation in growth hormone receptor gene (GHR) identified in Brazilian patients with GH insensitivity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005 Jun;49(3):384-9.
 34. Goncalves FT, Fridman C, Pinto EM, Guevara-Aguirre J, Shevah O, Rosembloom AL, et al. The E180splice mutation in the GHR gene causing Laron syndrome: witness of a Sephardic Jewish exodus from the Iberian Peninsula to the New World? *Am J Med Genet A*. 2014 May;164A(5):1204-8.

-
35. Walenkamp MJ, Vidarsdottir S, Pereira AM, Karperien M, van Doorn J, van Duyvenvoorde HA, et al. Growth hormone secretion and immunological function of a male patient with a homozygous STAT5b mutation. *Eur J Endocrinol*. 2007 Feb;156(2):155-65.
 36. Fofanova-Gambetti OV, Hwa V, Wit JM, Domene HM, Argente J, Bang P, et al. Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (IGFALS) gene mutations on stature: results from the international acid-labile subunit consortium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Sep;95(9):4184-91.
 37. Jorge AA, Funari MF, Nishi MY, Mendonca BB. Short stature caused by isolated SHOX gene haploinsufficiency: update on the diagnosis and treatment. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2010 Dec;8(2):79-85.
 38. Vasques GA, Arnhold IJ, Jorge AA. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(4):222-9.
 39. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.
 40. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data*. 2000 Jun 8(314):1-27.
 41. Silva DA, Pelegriani A, Petroski EL, Gaya AC. Comparison between the growth of Brazilian children and adolescents and the reference growth charts: data from a Brazilian project. *J Pediatr (Rio J)*. 2010 Mar-Apr; 86(2):115-20.

-
42. Elmlinger MW, Kuhnel W, Weber MM, Ranke MB. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(6):654-64.
 43. Bertola DR, Yamamoto GL, Almeida TF, Buscarilli M, Jorge AA, Malaquias AC, et al. Further evidence of the importance of RIT1 in Noonan syndrome. *Am J Med Genet A*. 2014 Nov;164A(11):2952-7.
 44. (ExAC) EAC. Exome Aggregation Consortium (ExAC). Cambridge, MA 2014 [cited 2015 23/04/2015]; Disponível em: <http://exac.broadinstitute.org>.
 45. (ESP) NGESP. Exome Sequencing Project (ESP). Seattle, WA 2015 [cited 2015 28/04/2015]; Disponível em: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
 46. Hay M. European Prehistory, Anthropology & Genetics. Eupedia [serial on the Internet]. 2004: Disponível em: <http://www.eupedia.com/genetics/>.
 47. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248-9.
 48. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010 Aug;7(8):575-6.
 49. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jan 10;368(2):161-70.

-
50. Stern C. The Hardy-Weinberg Law. *Science*. 1943 Feb 5;97(2510):137-8.
 51. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000 Aug;67(2):444-61.
 52. Vettoretti A. História da Cidade 2014: Disponível em: http://www.tubarao.sc.gov.br/cms/pagina/ver/codMapaItem/22109#.VXs gi_IVhBc.
 53. Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, Prickett TC, Espiner EA, Potter LR, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Apr;91(4):1229-32.
 54. Silventoinen K, Sammalisto S, Perola M, Boomsma DI, Cornes BK, Davis C, et al. Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Res*. 2003 Oct;6(5):399-408.
 55. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Sep;99(9):3080-92.
 56. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996 Sep 13;273(5281):1516-7.
 57. Wood AR, Esko T, Yang J, Vedantam S, Pers TH, Gustafsson S, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet*. 2014 Nov;46(11):1173-86.
 58. Lettre G. Genetic regulation of adult stature. *Curr Opin Pediatr*. 2009 Aug;21(4):515-22.

59. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. Nat Rev Genet. 2012 Feb;13(2):135-45.

9 Apêndices

Apêndice A -

Scalco RC, Pugliese-Pires PN, Jorge AAL. Deficiência da *STAT5B*: uma nova síndrome de insensibilidade ao hormônio de crescimento associada a acometimento imunológico. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013; 57(5):333-338.

revisão

Deficiência da *STAT5B*: uma nova síndrome de insensibilidade ao hormônio de crescimento associada a acometimento imunológico

STAT5B deficiency: a new growth hormone insensitivity syndrome associated to immunological dysfunction

Renata C. Scalco¹, Patrícia N. Pugliese-Pires¹, Alexander A. L. Jorge¹

SUMÁRIO

Uma nova apresentação da insensibilidade ao hormônio de crescimento (IGH), causada por mutações em homozigose no gene *STAT5B* (transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 5B), foi caracterizada nos últimos anos. Sua particularidade é a associação com quadros de disfunção imunológica grave, sendo o mais característico a pneumonite intersticial linfocítica. A presença concomitante de doenças crônicas imunológicas pode fazer com que a baixa estatura seja erroneamente considerada uma consequência do quadro clínico, levando ao subdiagnóstico dessa forma de IGH. O objetivo desta revisão é divulgar o conhecimento atual sobre essa rara patologia, facilitando o reconhecimento de pacientes com IGH secundária a mutações no gene *STAT5B* em ambulatórios de endocrinologia e de outras especialidades. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013;57(5):333-8

Descritores

STAT5B; baixa estatura; insensibilidade ao hormônio de crescimento; disfunção imunológica; autoimunidade

SUMMARY

A new presentation of growth hormone insensitivity (GHI) caused by homozygous mutations in *STAT5B* (signal transducer and activator of transcription 5B) gene has been characterized in the last years. Its particularity is the association with severe immune dysfunction, especially with lymphocytic interstitial pneumonitis. This may mislead physicians into considering short stature as secondary to chronic immunological disease and consequently into underdiagnosing this form of GHI. The objective of this review is to propagate current knowledge about this rare pathology, facilitating the diagnosis of patients with GHI due to *STAT5B* mutations in endocrinology and other specialties clinics. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013;57(5):333-8

Keywords

STAT5B; short stature; growth hormone insensitivity; immune dysfunction; autoimmunity

¹ Unidade de Endocrinologia Genética, LIM-25, Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

Correspondência para:

Alexander A. L. Jorge
Unidade de Endocrinologia Genética, LIM-25, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455, 5º andar, sala 5340
01246-903 – São Paulo, SP, Brasil
alexj@usp.br

Recebido em 19/Ago/2012
Aceito em 12/Nov/2012

INTRODUÇÃO

O sistema hormônio de crescimento (*growth hormone* – GH)/fator de crescimento insulina-símile tipo 1 (*insulin-like growth factor 1* – IGF-1) é o principal determinante e regulador do crescimento linear. Um dos defeitos descritos no eixo GH/IGF-1 é a insensibilidade ao hormônio de crescimento (IGH, OMIM: #262500), definida como a inabilidade dos tecidos-alvo em responder normalmente à ação do GH (1).

A apresentação clássica da IGH, conhecida como síndrome de Laron, é caracterizada pela presença do fenótipo de deficiência de GH congênita (baixa estatura importante, fronte olímpica, hipoplasia de face, obesidade centrípeta, micropênis, hipoglicemia na infância) com dosagem de IGF-1 baixa e de GH alta ou inapropriadamente normal. No entanto, o quadro clínico e laboratorial da IGH varia dentro de um espectro que vai da síndrome de Laron a apresentações mais leves que

Copyright © 2013. Todos os direitos reservados.

STAT5B: baixa estatura e imunodisfunção

podem ser confundidas com a baixa estatura idiopática (1). As causas mais comuns de IGH são mutações no gene do receptor de GH (*GHR*; OMIM: *600946), sendo que mais de setenta já foram descritas até o momento (2,3), a maioria herdada de maneira autossômica recessiva (3,4).

Em 2003, foi descrito o primeiro paciente com IGH causada por uma mutação inativadora em homozigose no gene da *STAT5b* (*signal transducer and activator of transcription-5b gene – STAT5B*; OMIM: *604260), uma molécula-chave na transdução do sinal via GHR (5). Desde então, nove outros casos foram descritos e foi observado que, além das características clínicas semelhantes às dos indivíduos com síndrome de Laron, pacientes com defeitos em homozigose no gene *STAT5B* também apresentam disfunção imunológica grave, que se manifesta tanto com quadros secundários à imunodeficiência, como infecções de repetição, quanto com eventos autoimunes como a pneumonite intersticial linfocítica. A disfunção imunológica parece ser justificada pelo defeito na ação da interleucina 2 (IL-2), envolvida na ativação dos linfócitos T e no desenvolvimento dos linfócitos T reguladores (Treg), e cuja sinalização intracelular também é dependente da *STAT5b* (6).

Pelo possível acometimento de diversos órgãos e sistemas, esses pacientes podem procurar serviços de múltiplas especialidades (Pneumologia, Infectologia, Imunologia, Dermatologia etc.). Assim, o objetivo desta revisão é divulgar esse diagnóstico ainda recente e pouco conhecido, facilitando o reconhecimento desses pacientes em ambulatórios de endocrinologia e de outras especialidades.

PAPEL DA STAT5b NA SINALIZAÇÃO DO GH E INTERLEUCINAS

O GH realiza suas ações por meio da ligação ao GHR, um receptor de membrana pertencente à família dos receptores de citocinas classe I (7) (Figura 1). O GHR possui um único domínio transmembrânico e não apresenta atividade enzimática intrínseca, devendo estar associado na sua porção intracitoplasmática a uma proteína com atividade de tirosina quinase conhecida como Janus quinase 2 (JAK2) para que ocorra a transdução do sinal intracelular. A ligação do GH a dois GHR que se encontram pré-dimerizados na superfície celular (8) promove uma alteração na conformação espacial da porção intracitoplasmática dos GHR, permitindo a fosforilação das JAK2. Uma vez fosforiladas, as JAK2 pas-

sam a fosforilar múltiplos resíduos de tirosina presentes nos GHR, gerando sítios de acoplamento para outras moléculas sinalizadoras (8). Os GHR e as JAK2 ativam assim vias de sinalização comuns a vários receptores, como a via das quinases proteicas ativadas por mitógenos (MAPK) e a via do fosfatidilinositol 3-quinase (IP-3K), importantes para os efeitos metabólicos e para alguns efeitos proliferativos do GH. Além dessas vias, os receptores de citocinas possuem uma via de sinalização própria que utiliza proteínas citoplasmáticas conhecidas como STATs (7). Entre as sete STATs conhecidas até o momento, a que exerce papel principal na transdução do sinal do GHR em humanos é a *STAT5b*. Esta, quando fosforilada, forma um dímero e se transloca para o núcleo, onde sua ligação aos elementos responsivos aos dímeros da *STAT5b* no DNA leva à expressão de diversos genes como o da IGF1, de sua proteína ligadora (IGFBP-3) e da subunidade ácido-lábil (ALS) (9).

Outras moléculas que utilizam os receptores de citocina e consequentemente a via de sinalização das STATs incluem a prolactina, a eritropoetina, a trombopoetina, o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), o interferon gama e várias interleucinas, entre elas a IL-2 (10) (Figura 1). A ligação da IL-2 ao seu receptor leva à expressão via *STAT5b* de genes que incluem o *FOXP3*, que promove o desenvolvimento e função dos Treg, o *IL2RA*, que favorece a ativação de linfócitos T, e genes que codificam os fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL (6). Os Treg são essenciais no controle da resposta imune e na prevenção da autoimunidade (11) e a redução em seu número e função, vista em pacientes com mutações em homozigose no gene *STAT5B* (12), explica os quadros autoimunes encontrados. Já a maior suscetibilidade a infecções poderia ser justificada tanto por um aumento na apoptose de células T quanto por um defeito na ativação dos linfócitos T citotóxicos (6).

MUTAÇÕES NO GENE STAT5B

O gene *STAT5B* está localizado no cromossomo 17q11.2 e é formado por dezenove éxons. Sua expressão é ubíqua e ele dá origem à proteína *STAT5b*, composta por 787 aminoácidos que se dividem em seis domínios: os domínios N-terminal e *coiled-coil*, responsáveis pelas interações proteína-proteína, um domínio de ligação ao DNA, uma região de ligação entre domínios sem função definida, um domínio de homologia a Src 2 (SH2), que permite a ligação das proteínas STAT

STAT5B: baixa estatura e imunodistúrbio

Figura 1. Papel da STAT5b na transdução do sinal do hormônio de crescimento (GH) e da interleucina-2 (IL-2). JAK2 = janus quinase 2; STAT = *signal transducer and activator of transcription*; ALS = subunidade ácido-lábil; GH = hormônio de crescimento; IGF-1 = fator de crescimento insulina-símile tipo 1; IGFBP-3 = proteína 3 de ligação ao IGF; IL-2R = receptor de IL-2.

a tirosinas fosforiladas de receptores ativados ou de outros peptídeos e a dimerização entre proteínas STATs, e um domínio C-terminal de transativação, crítico para a interação com outros fatores de transcrição (9).

As sete mutações descritas até o momento distribuem-se de forma relativamente uniforme entre os éxons 5 e 17 (Figura 2). São duas deleções (c.424_427del/p.Leu142ArgfsX19 e c.1680delG/p.Arg560ArgfsX16) e duas inserções (c.1102insC/p.Gln368ProfsX9 e c.1191insG/p.Asn398GlufsX16), levando a uma alteração do quadro de leitura (mutação tipo *frameshift*), uma mutação tipo *nonsense* (c.454C>T/p.Arg152X) e duas mutações do tipo *missense* (c.1888G>C/p.Ala630Pro e c.1937T>C/p.Phe646Ser).

Dos dez pacientes descritos até o momento, dois são irmãos nascidos na cidade de Criciúma – Santa Catarina (13). Os pais dos meninos, heterozigotos para a mutação identificada nos filhos (c.424_427del), negam consanguinidade e, mesmo após revisão da genealogia de ambas as famílias por três gerações, não foram

observados laços entre as famílias materna e paterna. Esse fato sugere que a mutação encontrada possa ser prevalente em heterozigose na região, possivelmente por um efeito fundador.

CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM MUTAÇÕES NO GENE *STAT5B*

Quadro clínico

A herança é autossômica recessiva e houve confirmação de consanguinidade em três famílias. O comprimento e peso ao nascimento dos pacientes quando descritos foram normais ou pouco diminuídos para a idade gestacional, o que pode ser explicado pela relativa independência do crescimento pré-natal em relação ao GH. No entanto, o crescimento pós-natal foi muito comprometido, com padrão semelhante ao observado em pacientes com síndrome de Laron, e os escores Z de altura ao diagnóstico variaram entre -3,0 e -9,9 (Tabela 1).

Copyright © 2013, Editora e Distribuidora da Universidade de São Paulo

STAT5B: baixa estatura e imunodistúrbio

Figura 2. Representação dos 19 éxons do gene *STAT5B*, dos domínios da proteína STAT5b e das mutações descritas até o momento. DN: domínio N-terminal; DCC: domínio *coiled-coil*; DLD: domínio de ligação ao DNA; L: região ligante; SH2: domínio de homologia a Src 2; Y699: resíduo de tirosina fosforilado na ativação das STATs; DT: domínio C-terminal de transativação.

Tabela 1. Resumo dos principais achados clínicos dos pacientes com defeitos em homozigose no gene *STAT5B* descritos na literatura.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mutações	c.1888G>C	c.1191 insG	c.454C>T	c.454C>T	c.1102insC	c.1680delG	c.1937T>C		c.424_427del	
Referência	(5)	(17)	(14)	(18)	(19)	(20)	(21)		(13)	
Sexo	F	F	F	F	M	F	F	F	M	M
País de origem	Argentina	Turquia	Argentina	Argentina	Caribe	Kuwait	Argentina		Brasil	
Altura mãe (cm)	155,8	160	142,3	ND	165,6	160,2	160,2	ND	156	156
Altura pai (cm)	173,6	169	160	ND	164,3	167,7	167,7	ND	165	165
Consanguinidade	Sim	Sim	Não	Adotada	Não	Sim	Sim	Adotada	Não	Não
Idade ao diagnóstico (anos)	16,5	16,4	15,3	12	31	4	2	14,8	10,0	3,0
Z da altura ao diagnóstico	-7,5	-7,8	-9,9	-5,3	-5,9	-5,6	-5,8	-6,0	-5,6	-3,0
Comprometimento pulmonar	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Varicela grave	Sim	ND	Sim	Sim	Sim	ND	ND	Sim	Sim	Não
Eczema grave	ND	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	Sim	Sim	Sim
Outras manifestações	Sim ¹	Sim ²	Sim ³	Sim ⁴	Não	Sim ⁵	Sim ⁶	Sim ⁷	Não	Sim ⁸

ND: não disponível. As pacientes 6 e 7 são irmãs e os pacientes 9 e 10 são irmãos. Outras manifestações: 1. Herpes zoster recorrente; 2. Infecções pulmonares de repetição, diátese hemorrágica; 3. Infecções de repetição em pele, trato respiratório e trato gastrointestinal, ceratite e uveíte recorrentes por herpes zoster; 4. Sepsis neonatal, diarreia crônica, ceratite, herpes zoster, tireoidite autoimune, displasia esquelética disdrótica, infecções pulmonares de repetição; 5. Infecções pulmonares de repetição, bronquiectasia; 6. Artrite reumatoide juvenil; 7. Infecções de repetição, tireoidite autoimune; 8. Púrpura trombocitopênica idiopática.

Na maioria dos casos foram relatadas características fenotípicas de IGH, como fronte olímpica, hipoplasia de face e voz aguda. A puberdade foi atrasada em sete dos oito pacientes que atingiram idade para seu início, provavelmente pelo IGF-1 baixo e estado de doença crônica. A idade óssea também estava atrasada em todos os casos em que foi relatada. O desenvolvimento cognitivo foi normal nos pacientes em que foi descrito.

Alterações imunológicas

Sete dos dez pacientes apresentaram quadro de doença pulmonar crônica grave e de início precoce (Tabela 1). O diagnóstico (confirmado por biópsia pulmonar em alguns pacientes e presuntivo em outros) foi de

pneumonite intersticial linfocítica, uma patologia de etiologia desconhecida, rara em crianças e frequentemente associada a doenças autoimunes. Essa doença causa fibrose pulmonar progressiva, sendo que duas pacientes faleceram por insuficiência respiratória e um foi submetido a transplante pulmonar, até o momento com boa evolução (13). Outras manifestações relatadas foram varicela grave/hemorragia em seis pacientes e eczema grave em outros sete. Além disso, a maioria dos pacientes tem história de infecções de repetição. Foram descritos também dois casos de tireoidite autoimune, um caso de artrite reumatoide juvenil de início precoce (diagnóstico aos dois anos de idade) e um caso de púrpura trombocitopênica (Tabela 1).

Alterações laboratoriais

Os pacientes apresentaram GH basal normal ou elevado, em geral com aumento importante durante teste de estímulo. Dosagens de IGF-1, IGFBP-3 e ALS foram invariavelmente baixas e não houve aumento nos casos em que se fez teste de geração com rhGH (Tabela 2). A proteína de ligação ao GH (GHBP) foi sempre normal, ao contrário do que acontece na maioria dos pacientes com mutação do *GHR*. A prolactina foi elevada em seis dos sete pacientes em que foi dosada, provavelmente por uma interferência com seu mecanismo de retroalimentação negativa pela mutação no gene *STAT5B* (13).

Em relação à avaliação imunológica não existe um padrão tão claro como no perfil hormonal. Dos seis pacientes avaliados, quatro apresentaram hipergamaglobulinemia e cinco tinham linfopenia de células T. Quatro dos pacientes também apresentavam redução dos linfócitos *natural killer* (NK). Em uma das pacientes, foi realizado estudo *in vitro* que mostrou baixa proliferação dos linfócitos T em resposta a mitógenos e antígenos, documentando uma disfunção generalizada nessas células (14). Foi sugerido também que a hipergamaglobulinemia poderia ser resultado de uma desregulação das células B secundária a um controle inadequado destas pelas células T disfuncionais (14).

Tratamento

Em relação à baixa estatura, não houve resposta à terapia com GH recombinante humano (rhGH) em pacientes com mutações no gene *STAT5B*, assim como ocorre nos indivíduos com IGH secundária a mutações no *GHR*. O tratamento com IGF-1 recombinante humano (rhIGF-1) é aprovado para crianças com deficiência primária grave de IGF-1, o que inclui pacientes com IGH (15). Em pessoas com IGH causada por mutações no *GHR*, essa terapia já foi avaliada e um dos estudos, en-

volvendo 76 indivíduos tratados, mostrou um incremento mediano na velocidade de crescimento do primeiro ano de tratamento de 5,3 cm/ano (16). No entanto, nos dois irmãos brasileiros foi tentada a terapia com rhIGF-1 e não se notou melhora do padrão de crescimento, possivelmente pelo estado de doença crônica (13).

Também não existe um tratamento específico para a disfunção imunológica até o momento. Foi sugerida a possibilidade de transplante de medula óssea para corrigir a deficiência de células T nos pacientes com mutações no gene *STAT5B*, porém este ainda não foi realizado em nenhum dos pacientes descritos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico de IGH secundária a mutações no gene *STAT5B* deve ser suscitado em pacientes com quadro de IGH e alterações imunológicas, especialmente quando há linfopenia de células T e/ou hiperprolactinemia. O estudo molecular do gene *STAT5B* permite a confirmação dessa condição. Como os pacientes com mutações na *STAT5B* têm doenças imunológicas graves e de início precoce, sua baixa estatura pode ser erroneamente considerada consequência do processo inflamatório crônico, levando ao subdiagnóstico dessa patologia. Diagnosticar adequadamente esses pacientes é o primeiro passo para a ampliação do conhecimento sobre essa forma mais rara de IGH, permitindo no futuro a descoberta de um tratamento específico para essa síndrome.

Agradecimentos: este trabalho obteve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp): processos 2011/15078-0 para Renata C. Scalco e 2010/19809-6 para Alexander A. L. Jorge; e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): n° 304678/2012-0 para Alexander A. L. Jorge.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

Tabela 2. Resumo dos principais achados laboratoriais dos pacientes com defeitos em homozigose no gene *STAT5B* descritos na literatura

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mutações	c.1888G>C	c.1191 insG	c.454C>T	c.454C>T	c.1102 insC	c.1680delG	c.1937T>C	c.424_427del		
Referência	(5)	(17)	(14)	(18)	(19)	(20)	(21)	(13)		
GH basal (ng/ml)	9,4	14,2	4,2	1,8	0,1	5,7	17,7	ND	1,7	1,0
Escore Z IGF-1	< -3	< -3	Indetectável	< -3	-8,2	< -3	< -3	Indetectável	< -3	< -3
PRL (ng/ml)	102	ND	169	15	110	ND	ND	83	61	77
IgG	Aumentada	Aumentada	Aumentada	ND	ND	ND	ND	Aumentada	Aumentada	Normal
Linfócitos T	Reduzidos	Normais	Reduzidos	ND	ND	ND	ND	Reduzidos	Reduzidos	Reduzidos
Linfócitos NK	Normais	Normais	Reduzidos	ND	ND	ND	ND	Reduzidos	Reduzidos	Reduzidos

ND: não disponível. Linfócitos NK: linfócitos *natural killer*. As pacientes 6 e 7 são irmãs e os pacientes 9 e 10 são irmãos.

Copyright © 2013. Todos os direitos reservados.

STAT5b: baixa estatura e imunodisfunção

REFERÊNCIAS

1. Jorge AA. [Short stature investigation: clinical, laboratorial and genetic aspects concerning the growth hormone insensitivity (GHI)]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(6):1056-65.
2. Diniz ET, Jorge AA, Arnhold LJ, Rosenbloom AL, Bandeira F. [Novel nonsense mutation (p.Y113X) in the human growth hormone receptor gene in a Brazilian patient with Laron syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(8):1264-71.
3. David A, Hwa V, Metherell LA, Netchine I, Camacho-Hubner C, Clark AJ, et al. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity. *Endocr Rev.* 2011;32(4):472-97.
4. Jorge AA, Souza SC, Arnhold LJ, Mendonça BB. The first homozygous mutation (S226I) in the highly-conserved WSXWS-like motif of the GH receptor causing Laron syndrome: suppression of GH secretion by GnRH analogue therapy not restored by dihydrotestosterone administration. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;60(1):36-40.
5. Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med.* 2003;349(12):1139-47.
6. Casanova JL, Holland SM, Notarangelo LD. Inborn errors of human JAKs and STATs. *Immunity.* 2012;36(4):515-28.
7. Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):293-314.
8. Waters MJ, Brooks AJ. Growth hormone receptor: structure function relationships. *Horm Res Paediatr.* 2011;76 Suppl 1:12-6.
9. Hwa V, Nadeau K, Wit JM, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: lessons from STAT5b gene mutations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(1):61-75.
10. Nadeau K, Hwa V, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: an unsuspected cause of growth failure, immunodeficiency, and severe pulmonary disease. *J Pediatr.* 2011;158(5):701-8.
11. Burchill MA, Yang J, Yang KB, Farrar MA. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett.* 2007;114(1):1-8.
12. Cohen AC, Nadeau KC, Tu W, Hwa V, Dionis K, Bezrodnik L, et al. Cutting edge: decreased accumulation and regulatory function of CD4+ CD25(high) T cells in human STAT5b deficiency. *J Immunol.* 2006;177(5):2770-4.
13. Pugliese-Pires PN, Tonelli CA, Dora JM, Silva PC, Czepielewski M, Simoni G, et al. A novel STAT5B mutation causing GH insensitivity syndrome associated with hyperprolactinemia and immune dysfunction in two male siblings. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(2):349-55.
14. Bernasconi A, Marino R, Ribas A, Rossi J, Ciaccio M, Oleastro M, et al. Characterization of immunodeficiency in a patient with growth hormone insensitivity secondary to a novel STAT5b gene mutation. *Pediatrics.* 2006;118(5):e1584-92.
15. Collett-Solberg PF, Misra M. The role of recombinant human insulin-like growth factor-I in treating children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(1):10-8.
16. Chernauek SD, Backeljauw PF, Frane J, Kuntze J, Underwood LE. Long-term treatment with recombinant insulin-like growth factor (IGF)-I in children with severe IGF-I deficiency due to growth hormone insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):902-10.
17. Hwa V, Little B, Adiyaman P, Kofoed EM, Pratt KL, Ocal G, et al. Severe growth hormone insensitivity resulting from total absence of signal transducer and activator of transcription 5b. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(7):4260-6.
18. Boyanovsky A, Lozano A, Testa G, editors. Growth hormone insensitivity and immunodeficiency: mutation in the STAT5B gene. 8th Joint Meeting of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society/European Society for Paediatric Endocrinology; 2009.
19. Vidarsdottir S, Walenkamp MJ, Pereira AM, Karperien M, van Doorn J, van Duyvenvoorde HA, et al. Clinical and biochemical characteristics of a male patient with a novel homozygous STAT5b mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3482-5.
20. Hwa V, Camacho-Hubner C, Little BM, David A, Metherell LA, El-Khatib N, et al. Growth hormone insensitivity and severe short stature in siblings: a novel mutation at the exon 13-intron 13 junction of the STAT5b gene. *Horm Res.* 2007;68(5):218-24.
21. Martinez A, Scaglia PA, Rivas M. Novel STAT5b gene mutation in a patient presenting GH insensitivity and immunodeficiency. *Horm Res.* 2007;68(suppl 1):33.

Apêndice B -

Scalco RC, Hwa V, Domené HM, Jasper HG, Belgorosky A, Marino R, Pereira AM, Tonelli CA, Wit JM, Rosenfeld RG, Jorge AAL. *STAT5B* mutations in heterozygous state have negative impact on height: another clue in human stature heritability. *European Journal of Endocrinology*. 2015;173..

EJE 150398—16/6/2015—16:36—KALPANA.S—522460—XML StyleD – pp. 1–7

Clinical Study

R C Scalco and others

Heterozygous *STAT5B* mutations and height

173:3

1–7

***STAT5B* mutations in heterozygous state have negative impact on height: another clue in human stature heritability**

Renata C Scalco, Vivian Hwa¹, Horacio M Domené², Héctor G Jasper², Alicia Belgorosky³, Roxana Marino³, Alberto M Pereira⁴, Carlos A Tonelli⁵, Jan M Wit⁶, Ron G Rosenfeld⁷ and Alexander A L Jorge

Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM/25, Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Dr Arnaldo, 455 5º Andar Sala 5340, 01246-903 São Paulo, São Paulo, Brazil, ¹Division of Endocrinology, Cincinnati Center for Growth Disorders, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio 45229, USA, ²Centro de Investigaciones Endocrinológicas 'Dr César Bergadá' (CEDIE), CONICET – FEI – División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, C1425EFD Buenos Aires, Argentina, ³Endocrine Service, Hospital de Pediatría Garrahan, Ciudad Autónoma de Buenos Aires Pozos 1881, 1245 Buenos Aires, Argentina, ⁴Division of Endocrinology, Department of Medicine, Leiden University Medical Center, 2300 RC Leiden, The Netherlands, ⁵Extreme South of Santa Catarina University, 88806-000 Criciúma, Santa Catarina, Brazil, ⁶Department of Pediatrics, Leiden University Medical Center, 2300 RC Leiden, The Netherlands and ⁷Department of Pediatrics, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon 97239, USA

Correspondence should be addressed to A A L Jorge
Email
alexj@usp.br or
alexj@pq.cnpq.br

European Journal of Endocrinology

Abstract

Context and objective: GH insensitivity with immune dysfunction caused by *STAT5B* mutations is an autosomal recessive condition. Heterozygous mutations in other genes involved in growth regulation were previously associated with a mild height reduction. Our objective was to assess for the first time the phenotype of heterozygous *STAT5B* mutations. **Methods:** We genotyped and performed clinical and laboratory evaluations in 52 relatives of two previously described Brazilian brothers with homozygous *STAT5B* c.424_427del mutation (21 heterozygous). Additionally, we obtained height data and genotype from 1104 adult control individuals from the same region in Brazil and identified five additional families harboring the same mutation (18 individuals, 11 heterozygous). Furthermore, we gathered the available height data from first-degree relatives of patients with homozygous *STAT5B* mutations (17 individuals from seven families). Data from heterozygous individuals and non-carriers were compared. **Results:** Individuals carrying heterozygous *STAT5B* c.424_427del mutation were 0.6 SDS shorter than their non-carrier relatives ($P=0.009$). Heterozygous subjects also had significantly lower SDS for serum concentrations of IGF1 ($P=0.028$) and IGFBP3 ($P=0.02$) than their non-carrier relatives. The 17 heterozygous first-degree relatives of patients carrying homozygous *STAT5B* mutations had an average height SDS of -1.4 ± 0.8 when compared with population-matched controls ($P < 0.001$). **Conclusions:** *STAT5B* mutations in the heterozygous state have a significant negative impact on height (~ 3.9 cm). This effect is milder than the effect seen in the homozygous state, with height usually within the normal range. Our results support the hypothesis that heterozygosity of rare pathogenic variants contributes to normal height heritability.

European Journal of
Endocrinology
(2015) 173, 1–7

Introduction

Previous studies have demonstrated that while homozygous mutations in genes involved in growth regulation are the cause of severe syndromic short stature,

heterozygosity of the same variants can be associated with a milder height reduction (1, 2, 3, 4). For instance, in the growth hormone (GH) insulin-like growth factor 1

Clinical Study	R C Scalco and others	Heterozygous <i>STAT5B</i> mutations and height	173:3	2
----------------	-----------------------	---	-------	---

(IGF1) axis, heterozygous carriers of mutations in acid-labile subunit gene (*IGFALS*) (3) and *IGF1* gene (1) were shown to be significantly shorter than non-carriers, although generally still within the normal height range. These data support the concept that rare mono-allelic variants with moderate effects on phenotype can be associated with height variability (5) and, as such, can be an etiology for non-syndromic short stature (6, 7).

STAT5B is a key mediator of GH signaling, as well as of other signaling pathways, including those of prolactin and interleukin 2 (IL2) (8). Since 2003, ten patients have been reported to harbor seven different homozygous *STAT5B* mutations (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). These rare homozygous mutations in *STAT5B* cause GH insensitivity (GHI) and manifestations of immune dysregulation, such as increased susceptibility for opportunistic infections, lymphoid interstitial pneumonia, and eczema. GHI syndrome, classically associated with homozygous mutations in the GH receptor gene (*GHR*), is characterized by severe postnatal growth failure, normal to elevated GH levels, and low serum concentrations of ALS, IGF1, and IGF binding protein 3 (IGFBP3). Unlike most GHI patients carrying defects in *GHR*, however, serum concentrations of GH binding protein (GHBP), the proteolytically cleaved extracellular domain of *GHR*, were normal and prolactin levels were increased in patients carrying homozygous *STAT5B* mutations (reviewed in (8)).

To date, *STAT5B* deficiency is considered an autosomal recessive condition. The impact of heterozygous *STAT5B* mutations on growth and the GH-IGF axis, however, has not been carefully evaluated, due in part to the rarity of described cases and families. To address this issue, we evaluated a large community in which multiple members carry a previously described *STAT5B* frameshift mutation (15). By comparing their data with data from other families harboring other mutations in *STAT5B*, we provide evidence that heterozygous *STAT5B* mutations can influence stature.

Subjects and methods

Subjects

We evaluated 52 relatives of two Brazilian brothers with characterized GHI due to homozygous *STAT5B* c.424_427del mutation. Furthermore, an active search was done to investigate the prevalence of this mutation in the region where the index cases were born, identifying five unrelated heterozygous individuals among 1104 evaluated adult control subjects. Relatives of these five individuals were subsequently evaluated, totaling

18 subjects. Height data gathered from the remaining 1099 adult control individuals (non-carriers of *STAT5B* c.424_427del mutation) in the same region were used to assess the local population height.

Additionally, we gathered the available height data from first-degree heterozygous relatives of previously reported patients with homozygous *STAT5B* mutations. We also included in this group two recently diagnosed individuals heterozygous for *STAT5B* c.424_427del mutation, who lost two children with the same phenotype seen in patients with homozygous *STAT5B* mutations. In total, height data from 17 first-degree relatives from seven families were analyzed.

These studies were approved by the local ethics committees, and the patients or guardians gave their written informed consent.

Genotyping in families with *STAT5B* c.424_427del mutation

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using standard techniques. Genotyping for *STAT5B* c.424_427del mutation was done by fragment analysis technique. The primers were designed to amplify the region around this mutation (primer sequences and amplification protocols are available upon request). Genotyping was performed after the clinical evaluation.

Clinical and laboratory assessment in families with *STAT5B* c.424_427del mutation

Individuals from families with *STAT5B* c.424_427del mutation were evaluated by an investigator blinded for *STAT5B* genotype. They were questioned about pneumopathies, eczema, and other immune dysfunctions. Height and weight were assessed in all individuals. Total blood count, fasting glucose, and insulin, IgG, immunoglobulin A, and immunoglobulin E, basal GH, IGF1, IGFBP3, and prolactin were tested in 91% of the evaluated individuals. Serum GH, IGF1, IGFBP3, prolactin, and immunoglobulin E were measured through chemiluminescence assays and immunoglobulin A and IgG through turbidimetry. IGF1 and IGFBP3 were transformed to SDS (17).

Whole-exome sequencing

Whole-exome sequencing of genomic DNA, obtained from the peripheral blood of one individual heterozygous for *STAT5B* c.424_427del mutation and with pneumopathy of an unknown etiology, was performed with Illumina's Nextera Exome Enrichment kits (Illumina, San Diego, CA,

Clinical Study	R C Scalco and others	Heterozygous <i>STAT5B</i> mutations and height	173:3	3
----------------	-----------------------	---	-------	---

USA) for library preparation and exome capture and the Illumina HiSeq sequencer. Alignments and variant annotation were made as previously described (18).

Statistical methods

Because the patients came from many ethnic groups, height data were expressed as SDS for the appropriate country/ethnic group. The effect of one mutant allele vs WT was determined in the whole group.

Groups were compared by unpaired *t*-test or ANOVA followed by Tukey test for numerical variables with normal distribution. Numerical variables without parametric distribution were analyzed by Mann-Whitney Rank Sum Test or Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks. Categorical data were compared between groups through χ^2 test or Fisher's exact test as appropriate. Statistical significance was assumed for $P < 0.05$. Statistical analysis was made with SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA) and MedCalc version 11.1.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Results

Families harboring *STAT5B* c.424_427del mutation

The largest Brazilian family consisted of two patients with homozygous *STAT5B* c.424_427del mutation, 21 heterozygous carriers (including their non-consanguineous parents), and 31 non-carrier relatives (Supplementary

Figure 1, see section on supplementary data given at the end of this article). The other five families identified consisted of 11 heterozygous carriers and seven non-carrier relatives. When polymorphic markers around this mutation were studied, the same haplotype was found in these six families, which was consistent with the presence of a founder effect (data not shown) (19). Consequently, we analyzed all individuals from the six families together (Table 1).

In total, we analyzed data from 32 heterozygous carriers of *STAT5B* c.424_427del mutation (17 males) and 38 non-carrier family members (12 males). Unrelated spouses were not included. One heterozygous carrier was excluded from the height analysis because of severe short stature (height SDS -3.5) of unknown cause. Among the 70 evaluated individuals (aged 32.7 ± 18.5 years old), 16 were children (seven heterozygous for *STAT5B* mutation).

Non-carrier subjects in these families had a similar height SDS to individuals from the local population (height SDS -0.2 ± 1.0 vs -0.4 ± 0.8 respectively, $P = 0.63$). Heterozygous *STAT5B* c.424_427del individuals were significantly shorter (height SDS -0.8 ± 0.9) than their non-carrier relatives (height SDS difference of -0.6 , $P = 0.009$, CI 95% -1.1 to -0.2), although all were within the normal height range (Table 1). When the analysis was done excluding the children, the same results were obtained (height SDS -0.8 ± 0.9 vs -0.2 ± 1.0 for heterozygous and non-carrier relatives respectively, $P = 0.02$, Fig. 1). Furthermore, heterozygous carriers had significantly lower IGF1 and IGFBP3 SDS than their non-carrier relatives (Table 1).

Table 1 Clinical and biochemical characteristics of heterozygous carriers of *STAT5B* c.424_427del mutation vs non-carriers. Values are expressed as mean $\pm$ s.d.

	WT/Mut	WT/WT	P
n	32	38	
Dermopathy	9:32	1:38	0.004
Severe pneumopathy	1:32	0:38	NS
Height SDS	-0.8 ± 0.9^a	-0.2 ± 1.0	0.009
Basal GH (ng/ml)	1.4 ± 2.2	1.0 ± 1.6	NS
IGF1 SDS	-0.4 ± 1.2	0.3 ± 1.2	0.028
IGFBP3 SDS	-0.9 ± 1.4	0.0 ± 1.5	0.02
Prolactin (ng/ml)	12.5 ± 7.2	13.0 ± 10.6	NS
Glucose (mg/dl)	90 ± 14	83 ± 13	NS
Insulin (μ UI/ml)	6.9 ± 7.3	6.4 ± 3.9	NS
Hemoglobin (g/dl)	13.3 ± 1.3	13.4 ± 1.5	NS
Leucocytes (cells/mm ³)	6893 ± 2008	6935 ± 2695	NS
Lymphocytes (cells/mm ³)	3998 ± 1292	3598 ± 1329	NS
IgG (mg/dl)	1022 ± 205	1054 ± 249	NS
IgA (mg/dl)	244 ± 141	225 ± 123	NS
IgE (UI/ml)	220 ± 325	143 ± 191	NS

GH, growth hormone; IGF1, insulin-like growth factor 1; IGFBP3, insulin-like growth factor binding protein 3; IgA/IgE, immunoglobulins A and E; NS, non-significant.

^aExcluding one heterozygous carrier with severe short stature (height SDS -3.5).

Clinical Study	R C Scalco and others	Heterozygous <i>STAT5B</i> mutations and height	173:3	4
----------------	-----------------------	---	-------	---

Q3 Figure 1

Comparison of height SDS distribution among adult heterozygous carriers of *STAT5B* c.424_427del mutation ($n=25$), their non-carrier relatives ($n=28$), and a population sample from the same region in the south of Brazil ($n=1099$).

Other parameters, such as basal GH and prolactin concentrations, were not different between these groups.

Present or past history of dermatopathies was reported in nine out of 32 individuals heterozygous for *STAT5B* c.424_427del mutation and in one out of 38 individuals who were non-carriers ($P=0.004$). We clinically diagnosed eczema in four carriers. No differences in total blood count and immunoglobulin levels between carriers and non-carriers were observed (Table 1).

One cousin of the probands, who was heterozygous for *STAT5B* c.424_427del mutation, presented with a moderate

to severe restrictive pneumopathy of unknown etiology. Her disease was milder than the pneumopathy observed in patients homozygous for *STAT5B* mutations, since she was in her thirties and still not oxygen dependent. Exome sequencing excluded other *STAT5B* mutations and mutations in genes normally associated with pneumopathies (data not shown). A lung biopsy of this patient showed areas of interstitial thickening near respiratory bronchioles, inflammatory interstitial infiltrate with lymphocytes, plasmocytes and histiocytes, and mild interstitial fibrosis, which is compatible with lymphoid interstitial pneumonia. Her father, an obligatory heterozygous carrier for the same mutation, died of respiratory failure secondary to an uninvestigated chronic pneumopathy, but he had confounding factors such as smoking and working as a miner.

First-degree relatives of index cases carrying *STAT5B* mutations

Height data were obtained in 17 first-degree relatives of ten patients homozygous for *STAT5B* mutations (Table 2). Two Argentinian patients were adopted soon after birth and, consequently, data from their biological relatives were not available. Parents were consanguineous in four families and not consanguineous in three families. All of these relatives were heterozygous for *STAT5B* mutations with an average height SDS of -1.4 ± 0.8 when compared with appropriate population-matched controls ($P < 0.001$).

Discussion

In adequate health and nutritional conditions, genetic variation is the main determinant of stature, accounting for ~80% of height variability (20). Recent genome-wide

Table 2 Data of index patients homozygous for *STAT5B* mutations and their first-degree relatives.

Family no.	Reference	Consanguinity	cDNA mutation	Origin	Local height SDS			
					Patient	Fathers	Mothers	Siblings
1	(9)	Yes	c.1888G>C	Argentina	-7.5	-0.3	-1.2	
2	(10)	Yes	c.1191insG	Turkey	-7.8	-0.9	-0.6	
3	(11)	No	c.1102insC	Caribbean	-5.9	-2.8	-0.8	-2.3/-0.8
4	(12)	No	c.454C>T	Argentina	-9.9	-2.2	-3.3	-2.0
5	(13)	Yes	c.1680delG	Kuwait	-5.6/-5.8	-1.3	-0.6	
6	(14)	Adopted	c.454C>T	Argentina	-5.3	NA	NA	
7	(15)	No	c.424_427del	Brazil	-5.6/-3.0	-1.5	-1.0	
8	(16)	Adopted	c.1937T>C	Argentina	-5.95	NA	NA	
9	(19)	Yes	c.424_427del	Brazil	NA ^a	-0.9	-1.9	
Mean $\pm$ SDS					-6.2 $\pm$ 1.8		-1.4 $\pm$ 0.8	
Median (range)					-5.9 (-9.9; -3.0)		-1.2 (-3.3; -0.3)	

NA, not available.

^aPatients died before anthropometric assessment.

Clinical Study	R C Scalco and others	Heterozygous <i>STAT5B</i> mutations and height	173:3	5
----------------	-----------------------	---	-------	---

association studies (GWAS) identified 697 variants in 423 loci that, together, accounted for only one-fifth of adult height heritability (21). The individual effect of single nucleotide polymorphisms (SNPs) found in these studies, furthermore, is very small (<0.5 cm) (22). The inability of GWAS to explain all height heritability, despite the increasing number of evaluated individuals, suggests that numerous rare variants with a large-to-moderate effect have a role in height variability (23). However, it is difficult to evaluate the importance of rare variants in height variability through the current available methods, since each private allele is restricted to a few families or small populations.

In the present study, the analysis of a large family with many heterozygous carriers of the *STAT5B* c.424_427del mutation showed that these individuals are significantly shorter than their non-carrier relatives and local population controls (mean height SDS difference of 0.6). Assuming that the mean s.d. for adult height distribution is 6.5 cm, the mean height loss seen in these individuals can be estimated at 3.9 cm, which is a much larger individual effect than the 0.5 cm attributed to SNPs identified in GWAS. The significant reduction in IGF1 SDS and IGFBP3 SDS seen with *STAT5B* c.424_427del heterozygous carriers, furthermore, suggests that a decreased responsiveness to GH action could explain, at least in part, the observed height reduction.

Moreover, the analysis of the available height data from carriers of the different *STAT5B* mutations also displayed a significant reduction in height when compared to their population controls and was equivalent to a height decrease of 9.1 cm, an even greater difference than that observed for carriers of *STAT5B* c.424_427del mutation. This difference could be due to the relatively smaller number of first-degree relatives available for study and/or to the variable effects on height dependent on the individual *STAT5B* mutation itself. For the *STAT5B* c.424_427del mutation, the lack of expression of the mutant protein in reconstitution experiments (V Hwa, unpublished data) suggests that partial haploinsufficiency could explain the modest height reduction seen in heterozygous carriers. No dominant-negative *STAT5B* mutations have been reported to date, although, interestingly, a heterozygous *STAT5B* p.Gln177Pro variant was recently described in two GHI patients with severe short stature but no immunological dysfunction (24).

Heterozygous mutations in other genes along the GH-IGF1 axis similarly show larger individual effects on height than SNPs, supporting our finding. For example, in a family carrying *IGF1* p.V44M mutation, individuals heterozygous

for this mutation were 0.6 SDS shorter (equivalent to 3.9 cm) than their non-carrier relatives (1). Moreover, heterozygous carriers of *IGFALS* mutations were 0.9 SDS shorter (equivalent to 5.8 cm) than their non-carrier relatives (3). Heterozygous mutations in genes associated with bone growth regulation similarly impacted height: in a large family with many individuals heterozygous for a *NPR2* mutation, carriers were 1.4 SDS shorter than non-carriers (equivalent to 9.1 cm) (2). In all of these studies, the clinical presentation of heterozygous individuals was much milder than the disorder seen in patients homozygous for the same mutations. Altogether, the presence of these rare pathogenic mutations in the heterozygous state suggests that the loss of one functional allele may result in low-normal height and borderline short stature.

Finally, we observed that individuals with heterozygous *STAT5B* c.424_427del mutation reported more dermatopathies and skin allergies when compared to their non-carrier relatives ($P=0.004$). No difference in pneumopathies or other allergies was reported in either group, although two heterozygous carriers (a cousin of the probands and her father) had severe pneumopathy of unknown etiology. Further investigations are necessary to better characterize the potential effects of heterozygous *STAT5B* mutations in immunologic alterations.

In conclusion, we demonstrated that *STAT5B* mutations in the heterozygous state exert a significant negative impact on height. This effect is milder than the effect seen in the homozygous state, with height usually within the low normal range. Our results support the hypothesis that heterozygosity of rare pathogenic variants contributes to normal height heritability. Whether the cumulative effect of such variants could be responsible for a proportion of the missing height heritability posed by GWAS studies remains to be determined.

Supplementary data

This is linked to the online version of the paper at <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-15-0398>.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by Grants 2013/03236-5, 2010/19809-6 (to A A L Jorge), and 2011/15078-0 (to R C Scalco) from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP); Grant 304678/2012-0 (to A A L Jorge) from the

Clinical Study	R C Scalco and others	Heterozygous <i>STAT5B</i> mutations and height	173:3	6
----------------	-----------------------	---	-------	---

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and NIH R01HD078592 (to V Hwa).

Acknowledgements

The authors thank Dr Julio Cezar Cechinel from Laboratório Pasteur, Criciúma, SC, Brazil, for performing laboratory tests in individuals from families with *STAT5B* c.424_427del mutation.

References

- Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, Mohan S, Denley A, Forbes B, van Duyvenvoorde HA *et al.* Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005 **90** 2855–2864. (doi:10.1210/jc.2004-1254)
- Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, Espiner EA, Potter LR & Warman ML. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 1229–1232. (doi:10.1210/jc.2005-1949)
- Fofanova-Gambetti OV, Hwa V, Wit JM, Domene HM, Argente J, Bang P, Hogler W, Kirsch S, Pihoker C, Chiu HK *et al.* Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (IGFALS) gene mutations on stature: results from the international acid-labile subunit consortium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 4184–4191. (doi:10.1210/jc.2010-0489)
- Jorge AA, Funari MF, Nishi MY & Mendonça BB. Short stature caused by isolated SHOX gene haploinsufficiency: update on the diagnosis and treatment. *Pediatric Endocrinology Reviews* 2010 **8** 79–85.
- Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nature Reviews. Genetics* 2012 **13** 135–145. (doi:10.1038/nrg3118)
- Malaquias AC, Scalco RC, Fontenele EG, Costalonga EF, Baldin AD, Braz AF, Funari MF, Nishi MY, Guerra-Junior G, Mendonça BB *et al.* The sitting height/height ratio for age in healthy and short individuals and its potential role in selecting short children for SHOX analysis. *Hormone Research in Pediatrics* 2013 **80** 449–456.
- Vasques GA, Arnhold JF & Jorge AA. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Hormone Research in Pediatrics* 2014 **82** 222–229.
- Hwa V, Nadeau K, Wit JM & Rosenfeld RG. *STAT5b* deficiency: lessons from *STAT5b* gene mutations. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011 **25** 61–75. (doi:10.1016/j.beem.2010.09.003)
- Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, Pratt KL, Bezrodnik L, Jasper H, Tepper A *et al.* Growth hormone insensitivity associated with a *STAT5b* mutation. *New England Journal of Medicine* 2003 **349** 1139–1147. (doi:10.1056/NEJMoa022926)
- Hwa V, Little B, Adiyaman P, Kofoed EM, Pratt KL, Ocal G, Berberoglu M & Rosenfeld RG. Severe growth hormone insensitivity resulting from total absence of signal transducer and activator of transcription 5b. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005 **90** 4260–4266. (doi:10.1210/jc.2005-0515)
- Vidarsdottir S, Walenkamp MJ, Pereira AM, Karperien M, van Doorn J, van Duyvenvoorde HA, White S, Breuning MH, Roelfsema F, Kruithof MF *et al.* Clinical and biochemical characteristics of a male patient with a novel homozygous *STAT5b* mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 3482–3485. (doi:10.1210/jc.2006-0368)
- Bernasconi A, Marino R, Ribas A, Rossi J, Ciaccio M, Oleastro M, Ornani A, Paz R, Rivarola MA, Zelazko M *et al.* Characterization of immunodeficiency in a patient with growth hormone insensitivity secondary to a novel *STAT5b* gene mutation. *Pediatrics* 2006 **118** e1584–e1592. (doi:10.1542/peds.2005-2882)
- Hwa V, Camacho-Hubner C, Little BM, David A, Metherell LA, El-Khatib N, Savage MO & Rosenfeld RG. Growth hormone insensitivity and severe short stature in siblings: a novel mutation at the exon 13-intron 13 junction of the *STAT5b* gene. *Hormone Research* 2007 **68** 218–224. (doi:10.1159/000101334)
- Boyanovsky A, Lozano A & Testa G. Growth hormone insensitivity and immunodeficiency: mutation in the *STAT5B* gene. In *8th Joint Meeting of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society/European Society for Paediatric Endocrinology* pp P01–P07, 2009.
- Pugliese-Pires PN, Tonelli CA, Dora JM, Silva PC, Czepielewski M, Simoni G, Arnhold JF & Jorge AA. A novel *STAT5B* mutation causing GH insensitivity syndrome associated with hyperprolactinemia and immune dysfunction in two male siblings. *European Journal of Endocrinology/European Federation of Endocrine Societies* 2010 **163** 349–355. (doi:10.1530/EJE-10-0272)
- Scaglia PA, Martinez AS, Feigerlova E, Bezrodnik L, Gaillard ML, Di Giovanni D, Ballerini MG, Jasper HG, Heinrich JJ, Fang P *et al.* A novel missense mutation in the SH2 domain of the *STAT5B* gene results in a transcriptionally inactive *STAT5b* associated with severe IGF-I deficiency, immune dysfunction, and lack of pulmonary disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012 **97** E830–E839. (doi:10.1210/jc.2011-2554)
- Elmlinger MW, Kuhn W, Weber MM & Ranke MB. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM/FESCC* 2004 **42** 654–664.
- Bertola DR, Yamamoto GL, Almeida TF, Buscarilli M, Jorge AA, Malaquias AC, Kim CA, Takahashi VN, Passos-Bueno MR & Pereira AC. Further evidence of the importance of RIT1 in Noonan syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 2014 **164A** 2952–2957. (doi:10.1002/ajmg.a.36722)
- Scalco RC, Funari MF, Aracava RM, Tonelli CA & Jorge AA. Evidence for a Founder Effect of C.424_427del *STAT5B* Mutation Causing Growth Hormone Insensitivity in the South of Brazil. In *Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo*, pp MON-0161. Ed E Society. Chicago: Endocrine Review, 2014.
- Silventoinen K, Sammalisto S, Perola M, Boomsma DI, Cornes BK, Davis C, Dunkel L, De Lange M, Harris JR, Hjelmborg JV *et al.* Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Research* 2003 **6** 399–408. (doi:10.1375/136905203770326402)
- Wood AR, Esko T, Yang J, Vedantam S, Pers TH, Gustafsson S, Chu AY, Estrada K, Luan J, Kutalik Z *et al.* Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nature Genetics* 2014 **46** 1173–1186. (doi:10.1038/ng.3097)
- Lettre G. Genetic regulation of adult stature. *Current Opinion in Pediatrics* 2009 **21** 515–522. (doi:10.1097/MOP.0b013e32832c6dce)
- Johansson A, Jonasson I & Gyllenstein U. Extended haplotypes in the growth hormone releasing hormone receptor gene (GHRHR) are associated with normal variation in height. *PLoS ONE* 2009 **4** e4464. (doi:10.1371/journal.pone.0004464)
- Klammt J, Neumann D, Andrew SF, Vokurkova D, Stobbe H, Buckham K, Rosenfeld RG, Pfäffle R & Hwa V. Severe Short Stature and GH Insensitivity Due to a De Novo Heterozygous *STAT5B* Missense Mutation. In *Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo*, pp OR24-23. Chicago: Endocrine Society, 2014.

Received 15 April 2015

Revised version received 22 May 2015

Accepted 1 June 2015