MARIANA TENORIO ANTUNES REIS

**Avaliação fenotípica e de defeitos moleculares no *GNAS* em
pacientes com pseudo-hipoparatiroidismo (PHP) e
pseudopseudo-hipoparatiroidismo (PPHP)**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Regina Matsunaga Martin

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Reis, Mariana Tenorio Antunes

Avaliação fenotípica e de defeitos moleculares no *GNAS* em pacientes com pseudo-hipoparatiroidismo (PHP) e pseudopseudo-hipoparatiroidismo (PPHP) / Mariana Tenorio Antunes Reis. -- São Paulo, 2014.

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

Orientadora: Regina Matsunaga Martin.

Descritores: 1.Pseudo-hipoparatiroidismo 2.Pseudopseudo-hipoparatiroidismo
3.Proteína GNAS humana 4.Proteína-G estimuladora Gs 5.Osteodistrofia hereditária de Albright 6.Hipocalcemia 7.Hiperfosfatemia 8.Hormônio paratireóideo

USP/FM/DBD-346/14

Este trabalho foi realizado na Unidade de Doenças Osteometabólicas e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42) da disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com apoio da CAPES, bolsa de doutorado direto – Demanda Social.

Dedicatória

Ao meu querido marido Marcelo, pelo seu amor, companheirismo e apoio em todos os momentos.

À minha família, em especial, aos meus pais Iris e Adailton, pelo amor incondicional e incentivo ao aprimoramento constante.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, pela inteligência e pelos caminhos que se abriram na minha trajetória.

À Dra. Michelle P. Rocha, médica preceptora da minha residência em endocrinologia, por possibilitar o meu primeiro contato com a minha orientadora.

À minha orientadora, Dra. Regina M. Martin, pela oportunidade, confiança, dedicação e carinho na orientação desta tese.

À Profa. Dra. Berenice B. Mendonça, pela acolhida, incentivo e inspiração.

Ao Dr. Pedro Henrique S. Corrêa, pelos ensinamentos no ambulatório de doenças ósseas e pelas sugestões e considerações no exame de qualificação.

À Dra. Luciani R. S. de Carvalho, pelo auxílio antes da entrega do projeto.

À colega Luiza S. Rodrigues, pela disponibilidade em auxiliar ao longo da execução do trabalho.

À amiga Rosana B. Silva, pela amizade, apoio e dicas desde antes da matrícula na pós-graduação.

À amiga Marcela P. Ferraz, pela companhia e ajuda nas tarefas do grupo de doenças ósseas.

Ao colega Guido P. Colares Neto, pela ajuda nas tarefas do grupo de doenças ósseas e pela análise estatística.

À amiga Fernanda Corrêa, pelas caronas e conversas carinhosas.

Aos demais colegas do LIM-42, pela troca de experiências e amigável convívio.

Aos pacientes e familiares que participaram deste estudo, pela confiança e disponibilidade.

Às secretárias Nilda Oliveira, Rosângela e Cida, pelo carinho, disponibilidade e auxílio.

Aos funcionários do LIM-42: Andresa, Cidinha, Cris Rossi, Fran, Gislene, Helena, Mariana, Mirian Nishi, Neide, Ricardo, Rosana Midori, pela ajuda na bancada e na realização dos exames laboratoriais.

Aos funcionários do ambulatório de endocrinologia: Francisca, Sr. Góes, Marilda, Milena, Renata e Roseli, pela ajuda explícita.

Aos demais funcionários do LIM-42 e do ambulatório de endocrinologia, pela ajuda implícita.

À Dra. Amaryllis Avakian, pelas avaliações oftalmológicas.

À banca de qualificação: Dr. Bruno Ferraz e Dr. Sérgio Maeda, pelas sugestões e considerações no exame de qualificação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao meu marido Marcelo, grande amor da minha vida, pelo amor, companheirismo, dedicação, incentivo e, principalmente, pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus pais, Adailton e Iris, pelo carinho, apoio e incentivo na busca dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Abilio e Adriana, pelo carinho e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus cunhados Daniel e Melissa, pelos bons momentos vividos e compartilhados.

Às minhas sobrinhas Olívia e Sofia, fontes de inspiração e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus tios e primos: tia Yonne, tia Ziza, tio Chico, Gabriela, Abilio Jorge e Juliana, pela torcida à distância.

À minha nova família: Anady, Priscila, Marcelo, Paulo Victor e Ana Beatriz, por me acolherem e me apoiarem.

À Dona Carmen, à Mari e a todos do Cantinho de Luz Maria de Nazaré, pelo apoio espiritual.

Muito obrigada a todos!!!

Normalização Adotada

Esta dissertação ou 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 e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. As proteínas G e a subunidade α da proteína G estimulatória.....	2
1.2. O locus do <i>GNAS</i> humano: sua regulação e seus produtos.....	4
1.3. O pseudo-hipoparatireoidismo e o pseudopseudo-hipoparatireoidismo.....	8
2. OBJETIVOS.....	15
3. MÉTODOS.....	17
3.1. Considerações éticas.....	18
3.2. Casuística.....	18
3.3. Avaliação genotípica dos pacientes com PHP e PPHP.....	18
3.3.1. Extração de DNA genômico a partir de sangue total, de raspado de mucosa oral ou de cordão umbilical.....	19
3.3.2. Pesquisa de mutações de ponto, microdeleções e microinserções na região codificadora da $G_s\alpha$ por PCR e sequenciamento automático.....	19
3.3.3. Pesquisa de deleções em heterozigose na região codificadora da $G_s\alpha$ e avaliação do padrão de metilação das DMRs do <i>GNAS</i> através da técnica de MS-MLPA.....	22
3.3.4. Controles.....	28
3.4. Avaliação fenotípica dos pacientes com PHP e PPHP.....	29
3.4.1. Caracterização clínica.....	29
3.4.2. Avaliação laboratorial.....	29
3.4.3. Avaliação por exames de imagem.....	31

3.5. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Avaliação genotípica dos pacientes com PHP e PPHP.....	34
4.1.1. Mutações envolvendo a região codificadora da $G_s\alpha$	34
4.1.2. Alterações no padrão de metilação das DMRs do <i>GNAS</i>	40
4.2. Avaliação fenotípica dos pacientes com PHP e PPHP.....	44
4.2.1. Diagnóstico do PHP e avaliação de repercussões da hipocalcemia e/ou hiperfosfatemia crônicas.....	49
4.2.2. Estigmas da AHO.....	51
4.2.3. Resistência ao PTH.....	51
4.2.4. Resistência ao TSH.....	53
4.2.5. Outras resistências hormonais.....	54
5. DISCUSSÃO.....	56
5.1. Avaliação genotípica dos pacientes com PHP e PPHP.....	57
5.2. Avaliação fenotípica dos pacientes com PHP e PPHP.....	59
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS.....	69

Listas

Lista de Abreviaturas e Símbolos

25OHD	25-hidroxivitamina D
AC	Adenilil ciclase
Ac	Anticorpos
Ac antiTg	Anticorpo antitireoglobulina
Ac antiTPO	Anticorpo antitireoperoxidase
AD-PHP1b	Pseudo-hipoparatireoidismo tipo 1b forma autossômica dominante
AHO	Osteodistrofia hereditária de <i>Albright</i>
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AS	<i>Antisense</i>
β	Beta
Ca	Cálcio total
Cai	Cálcio iônico
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CH ₃	Metilado
CTx	Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1
DMR	Região diferencialmente metilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenoamino tetra-acético
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio folículo-estimulante
γ	Gama
g	Grama
GDP	Difosfato de guanosina
GH	Hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio liberador de hormônio do crescimento
GNAS	<i>Guanine nucleotide-binding alpha-subunit</i>

GPCR	Receptor acoplado à proteína G
G _s	Proteína G estimulatória
G _s α	Subunidade alfa da proteína G estimulatória
GTP	Trifosfato de guanosina
HC	Hospital das Clínicas
IC	Intervalo de confiança
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGFBP-3	Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 3
IMC	Índice de massa corporal
Kb	Quilobases
LH	Hormônio luteinizante
LIM	Laboratório de investigação médica
mcg	Micrograma
mg	Miligrama
Mg	Magnésio
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MS-MLPA	<i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NESP55	<i>Neuroendocrine secretory protein 55</i>
nt	Nucleotídeos
P	Fósforo
P1NP	Propeptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo 1
PatUPD20q	Dissomia uniparental paterna do cromossomo 20q
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHP	Pseudo-hipoparatireoidismo
PHP1a	Pseudo-hipoparatireoidismo tipo 1a
PHP1b	Pseudo-hipoparatireoidismo tipo 1b
PHP1c	Pseudo-hipoparatireoidismo tipo 1c
PHP2	Pseudo-hipoparatireoidismo tipo 2
PKA	Proteína quinase A
PPHP	Pseudopseudo-hipoparatireoidismo
Proteína G	Proteína de ligação ao nucleotídeo da guanina
PTH	Paratormônio
R	Repressor
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro

RX	Radiografias
S	Sequência silenciadora
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
sporPHP1b	Pseudo-hipoparatireoidismo tipo 1b forma esporádica
STX16	Gene da syntaxina 16
TC	Tomografia computadorizada
TSH	Hormônio tireotrófico
T4L	Tiroxina livre = T4 livre
U	Unidade
VR	Valor de referência
vs	<i>Versus</i>
XL	<i>Extra large</i>
XL α s	<i>Extra large alpha stimulatory protein</i>
Z	Desvio padrão para a mesma faixa etária e sexo

Lista de Figuras

Figura 1 – Transdução do sinal desencadeado por agonista e ativação/inativação das proteínas G heterotriméricas através de receptor acoplado à proteína G (GPCR).....	3
Figura 2 – Representação dos 13 éxons da região codificadora da $G_s\alpha$ com as regiões responsáveis pelos seus domínios funcionais em destaque.....	4
Figura 3 – O locus do <i>GNAS</i> humano, padrões esperados de metilação das DMRs, regiões promotoras e geração de transcritos alternativos.....	5
Figura 4 – Regulação da expressão da $G_s\alpha$ em diferentes tecidos segundo o modelo proposto por <i>Liu et al.</i>	7
Figura 5 – Estigmas genéticos da Osteodistrofia hereditária de <i>Albright</i>	10
Figura 6 – Patogênese molecular do PHP1b.....	13
Figura 7 – Representação esquemática das etapas da reação de MS-MLPA.....	24
Figura 8 – Representação esquemática de parte do cromossomo 20 com destaque para a localização das sondas de MLPA utilizadas para a pesquisa de deleções em heterozigose na região codificadora da $G_s\alpha$	26
Figura 9 – Representação esquemática de parte do cromossomo 20 com destaque para a localização das sondas de MS-MLPA utilizadas para a avaliação do padrão de metilação das DMRs do <i>GNAS</i>	26
Figura 10 – Padrão de eletroforese capilar da reação de MS-MLPA proveniente de amostra de indivíduo controle: avaliação do padrão de metilação das DMRs do <i>GNAS</i>	27
Figura 11 – Sinal do metacarpiano na avaliação de braquidactilia.....	32

Figura 12 – Heredograma da família I.....	35
Figura 13 – Eletroferogramas com destaque para as mutações identificadas no <i>GNAS</i> nos pacientes com PHP1a ou PPHP.....	35
Figura 14 – Heredograma da família VI.....	42
Figura 15 – Estratificação de calcificações em SNC.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Uniformização da nomenclatura para denominação das DMRs, principais transcritos e proteínas oriundos do <i>GNAS</i>	5
Tabela 2 – Sequência dos <i>primers</i> para a avaliação da região codificadora da $G_s\alpha$	20
Tabela 3 – Programas de PCR para amplificação da região codificadora da $G_s\alpha$	21
Tabela 4 – Exames laboratoriais: metodologia e coeficientes de variação intraensaio e interensaio.....	30
Tabela 5 – Defeitos moleculares detectados na região codificadora da $G_s\alpha$ em 14 pacientes com PHP1a ou PPHP.....	36
Tabela 6 – Alinhamento filogenético entre $G_s\alpha$ de diferentes espécies com destaque para a conservação da glicina que ocupa a posição 52 na $G_s\alpha$ humana.....	38
Tabela 7 – Alterações no padrão de metilação das DMRs do <i>GNAS</i> e avaliação da deleção do <i>STX16</i> em 15 pacientes com PHP1b.....	41

Tabela 8 – Genotipagem dos 11 microssatélites em torno do locus do <i>GNAS</i> em nove pacientes com PHP1b.....	43
Tabela 9 – Caracterização fenotípica dos quatro pacientes com PPHP.....	43
Tabela 10 – Quadro clínico inicial e repercussões crônicas da hipocalcemia e/ou hiperfosfatemia em 25 pacientes com PHP.....	45
Tabela 11 – Dados antropométricos e características da osteodistrofia hereditária de <i>Albright</i> de 25 pacientes com PHP.....	46
Tabela 12 – Perfil de resistência ao PTH ao diagnóstico e tratamento de 25 pacientes com PHP.....	47
Tabela 13 – Perfil de resistência ao TSH e tratamento com levotiroxina em 25 pacientes com PHP.....	48

Resumo

Reis MTA. *Avaliação fenotípica e de defeitos moleculares no GNAS em pacientes com pseudo-hipoparatiroidismo (PHP) e pseudopseudo-hipoparatiroidismo (PPHP)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: A primeira doença humana atribuída à resistência hormonal foi o pseudo-hipoparatiroidismo (PHP), uma doença rara caracterizada por hipocalcemia, hiperfosfatemia e níveis elevados de hormônio paratireoidiano (PTH) na presença de função renal normal, quadro condizente com resistência ao PTH. A classificação original do PHP leva em consideração a osteodistrofia hereditária de *Albright* (AHO): presente no PHP1a e ausente no PHP1b. Na medida em que as bases moleculares do PHP têm sido compreendidas, uma classificação baseada no genótipo tem surgido. Segundo ela, pacientes com PHP1a apresentam mutações na região codificadora da $G_{s\alpha}$ do *GNAS* e o padrão de herança é autossômico dominante relacionado à transmissão materna. Por outro lado, o PHP1b é caracterizado por alterações nas regiões diferencialmente metiladas (DMRs) do *GNAS* por mecanismos não completamente esclarecidos, limitando a previsão do seu padrão de herança. Pacientes que apresentam a AHO na ausência de resistência hormonal têm o diagnóstico de pseudopseudo-hipoparatiroidismo (PPHP) e seu padrão de herança é autossômico dominante relacionado à transmissão paterna de mutações na região codificadora da $G_{s\alpha}$ do *GNAS*. **OBJETIVOS:** Classificar 25 pacientes com PHP com base em defeitos no *GNAS* e caracterizar seu fenótipo. Pesquisar mutações no *GNAS* nos quatro pacientes com PPHP e também caracterizar seu fenótipo. **MÉTODOS:** A avaliação fenotípica incluiu análise das resistências hormonais, pesquisa de repercussões crônicas da hipocalcemia/hiperfosfatemia (calcificações em sistema nervoso central:

SNC e catarata) e identificação da AHO. A análise do *GNAS* foi feita por sequenciamento automático e MLPA (região codificadora da $G_s\alpha$) e por MS-MLPA (região regulatória: DMRs). RESULTADOS: Resistência ao PTH foi identificada nos 25 pacientes com PHP e resistência ao TSH em 17/25. Calcificações em SNC e catarata estiveram presentes em 18 e 10 pacientes com PHP, respectivamente. A AHO foi caracterizada por: face arredondada (n=18), braquidactilia (n=11), baixa estatura (n=8), ossificações subcutâneas (n=6), obesidade (n=9) e retardo mental (n=3). Identificamos oito mutações (cinco novas) na região codificadora da $G_s\alpha$ em 10 pacientes com PHP1a e quatro pacientes com PPHP. Quinze pacientes apresentaram alteração no padrão de metilação das DMRs (genótipo: PHP1b). O fenótipo dos pacientes foi semelhante nos dois grupos. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO: Nenhuma das classificações do PHP foi capaz de prever gravidade ou o curso clínico da doença. Porém, o diagnóstico do PHP1a baseado no genótipo possibilitou a identificação precoce de uma paciente, a exclusão de PHP1a na filha de outra paciente e o aconselhamento genético em duas famílias. O diagnóstico de PHP1b em uma paciente só foi possível graças ao genótipo, visto que seu perfil laboratorial osteometabólico era inconclusivo. Com base no fenótipo, 8/15 pacientes com PHP1b seriam classificados como PHP1a considerando a presença de dois ou mais estigmas da AHO, podendo levar a falhas no aconselhamento genético. Portanto, concluímos que a classificação do PHP baseada na análise do *GNAS* é mais informativa do que a baseada no fenótipo, permitindo o diagnóstico precoce e o aconselhamento genético de casos familiares de PHP1a. A identificação do PHP1b deve ser promissora na medida em que seus mecanismos de transmissão forem mais bem entendidos.

Descritores: pseudo-hipoparatiroidismo, pseudopseudo-hipoparatiroidismo, proteína *GNAS* humana, proteína-G estimuladora G_s , osteodistrofia hereditária de *Albright*, hipocalcemia, hiperfosfatemia, hormônio paratireóideo.

Summary

Reis MTA. *Evaluation of the phenotype and molecular defect in GNAS in patients with pseudohypoparathyroidism (PHP) and pseudopseudohypoparathyroidism (PPHP)* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

BACKGROUND: The first human disease attributed to hormone resistance was pseudohypoparathyroidism (PHP), a rare disease characterized by hypocalcemia, hyperphosphatemia and elevated parathyroid hormone (PTH) levels in the presence of normal renal function, consistent picture of PTH resistance. The original classification of PHP takes into account the Albright hereditary osteodystrophy (AHO): present in PHP1a and absent in PHP1b. As the molecular bases of PHP have been understood, a classification based on genotype has emerged. According to it, PHP1a patients present mutations in the $G_s\alpha$ coding region of the *GNAS* and the pattern of inheritance is autosomal dominant related to maternal transmission. On the other hand, PHP1b is characterized by alterations in differentially methylated regions (DMRs) of the *GNAS* by mechanisms not completely clear, limiting the prediction of the pattern of inheritance. Patients who present AHO in the absence of hormone resistance have the diagnosis of pseudopseudohypoparathyroidism (PPHP) and their pattern of inheritance is autosomal dominant related to paternal transmission of mutations in the $G_s\alpha$ coding region of the *GNAS*. **OBJECTIVE:** To classify 25 patients with PHP based on *GNAS* molecular defects and to characterize their phenotype. To search for *GNAS* mutations in four patients with PPHP and also to characterize their phenotype. **METHODS:** The phenotypic evaluation included analysis of hormone resistances, research of chronic repercussions of hypocalcemia/hyperphosphatemia (calcifications in central nervous system: CNS and cataract) and identification of AHO. The analysis of the

GNAS was done by automated sequencing and MLPA ($G_s\alpha$ coding region) and by MS-MLPA (regulatory region: DMRs). RESULTS: PTH resistance was identified in 25 patients with PHP and TSH resistance in 17/25. Calcifications in CNS and cataract were present in 18 and 10 patients with PHP, respectively. AHO was characterized by: rounded face (n=18), brachydactyly (n=11), short stature (n=8), subcutaneous ossifications (n=6), obesity (n=9) and mental retardation (n=3). We identified eight mutations (five novels) in the $G_s\alpha$ coding region in 10 patients with PHP1a. Fifteen patients presented alterations in the methylation pattern of DMRs (genotype: PHP1b). The phenotype of patients was similar in both groups. DISCUSSION AND CONCLUSION: None of the PHP classifications was able to predict the severity or clinical course of the disease. However, the diagnosis of PHP1a based on genotype allowed the early identification of one patient, the exclusion of PHP1a in the daughter of another patient and genetic counseling in two families. The PHP1b diagnosis in one patient was only possible due to the genotype, as her bone metabolism profile was inconclusive. Based on phenotype, 8/15 PHP1b patients would have been classified as PHP1a considering the presence of two or more AHO stigmas, being able to lead to failures in genetic counseling. Therefore, we conclude that the PHP classification based on *GNAS* analysis is more informative than that based on phenotype, allowing the early diagnosis and the genetic counseling for familial cases of PHP1a. The identification of PHP1b may be promising as its transmission mechanisms are better clarified.

Descriptors: pseudohypoparathyroidism, pseudopseudohypoparathyroidism, *GNAS* protein/human, G-Protein/Stimulatory G_s , Albright hereditary osteodystrophy, hypocalcemia, hyperphosphatemia, parathyroid hormone.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As proteínas G e a subunidade α da proteína G estimulatória

As proteínas G (proteínas de ligação ao nucleotídeo da guanina) propagam os sinais de mais de 1.000 receptores a diferentes efetores intracelulares, como enzimas e canais iônicos, e são compostas de uma subunidade α , a qual está fracamente ligada a um dímero composto por uma subunidade β e uma subunidade γ . Diferentes proteínas $G\alpha$ definem diferentes trímeros da proteína G (G_s , G_q , G_i , G_t , entre outros), sendo cada uma delas responsável por vias distintas de sinalização celular (1, 2).

A proteína G estimulatória (G_s), como as demais proteínas G, apresenta uma estrutura heterotrimérica que se liga ao nucleotídeo da guanina através da sua subunidade α , além de se acoplar a receptores específicos e efetores intracelulares (3). Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são receptores de membrana que transmitem o sinal extracelular quando interagem com seus respectivos agonistas. Após a ligação do agonista, os GPCRs expõem sítios intracelulares envolvidos na interação com a subunidade α da proteína G_s . Esta ligação catalisa a dissociação do difosfato de guanosina (GDP) ligado à subunidade α e promove a substituição do mesmo pelo trifosfato de guanosina (GTP), havendo, então, a dissociação entre a subunidade α e o dímero $\beta\gamma$ (4). O complexo $G\alpha$ -GTP ativa efetores, como a enzima adenilil ciclase (AC), necessária à geração intracelular hormônio-estimulada de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O término do sinal se dá através da hidrólise do GTP a GDP e da religação da subunidade α ao dímero $\beta\gamma$ (1, 3) - **Figura 1**.

Figura 1 – Transdução do sinal desencadeado por agonista e ativação/inativação das proteínas G heterotriméricas através de receptor acoplado à proteína G (GPCR)

(A) Proteína G heterotrimérica no seu estado inativo: subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$ associadas e o GDP ligado à subunidade $G\alpha$ ($G\alpha$ -GDP). **(B) Ativação da proteína G e transdução de sinal desencadeado por agonista:** ligação entre o agonista e o GPCR cuja conformação é alterada, havendo dissociação das subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$; o GDP é deslocado pelo GTP que se liga à subunidade $G\alpha$ ($G\alpha$ -GTP) de modo que este último pode interagir com o seu efetor (AC) e transmitir o sinal intracelular. **(C) Hidrólise do GTP e término da ativação da proteína G:** após a transdução do sinal e resposta celular, a subunidade $G\alpha$ hidrolisa o GTP em GDP e fosfato inorgânico (P_i) por meio de sua atividade GTPase, a atividade da proteína G é finalizada com a restituição do complexo $G\alpha\beta\gamma$. Adaptado de Tuteja (5).

O AMPc é o principal segundo mensageiro na via de sinalização da $G_s\alpha$ e medeia seus efeitos biológicos através da ligação direta e estimulação de diversas moléculas, tais como a proteína quinase A (PKA) (6, 7).

O gene que codifica a $G_s\alpha$ é o *GNAS* (*guanine nucleotide-binding alpha-subunit*). Trata-se de um gene bastante complexo capaz de produzir pelo menos cinco transcritos distintos dos quais o mais importante é o que dá origem à $G_s\alpha$. A região codificadora da $G_s\alpha$ possui 13 éxons, seis dos quais participam da formação dos domínios funcionais da proteína: os éxons 1 e 2 codificam o domínio com atividade GTPase, os éxons 4 e 5 codificam o domínio de interação com a adenilil ciclase e os éxons 12 e 13 codificam o domínio de interação com os GPCRs - **Figura 2**. Este transcrito dá origem a uma sequência única de 394 aminoácidos (8).

Figura 2 – Representação dos 13 éxons da região codificadora da $G_s\alpha$ com as regiões responsáveis pelos seus domínios funcionais em destaque
Adaptado de Lania et al. (8).

1.2. O locus do *GNAS* humano: sua regulação e seus produtos

O locus do *GNAS* humano está localizado no final do braço longo do cromossomo 20 (20q13.32). Sua regulação é bastante complexa pela presença de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) e de múltiplos promotores. Para cada uma das quatro DMRs (NESP55, AS, XL e A/B), existe uma região promotora correspondente capaz de controlar a expressão de seus respectivos transcritos que recebem denominação homônima (9) - **Figura 3**. Na literatura médica, o nome das DMRs e dos transcritos gerados pelo *GNAS* varia de acordo com o texto em questão de modo que, para fins didáticos, procuramos uniformizar a nomenclatura conforme o conteúdo da **Tabela 1**.

Figura 3 – O locus do *GNAS* humano, padrões esperados de metilação das DMRs, regiões promotoras e geração de transcritos alternativos

As caixas representam éxons e as setas correspondem às diferentes regiões promotoras indicando o sentido da transcrição gênica. p: alelo paterno; m: alelo materno; +: DMR metilada; -: DMR não metilada; cen: centrômero; tel: telômero. Adaptado de *Bastepe et al.* (10).

Tabela 1 – Uniformização da nomenclatura para denominação das DMRs, principais transcritos e proteínas oriundos do *GNAS*

Regiões regulatórias	Transcritos (sinonímia)	Proteína
DMR NESP55	NESP55 (NESP)	NESP55
DMR AS	AS (NESPAS)	Não é traduzido
DMR XL	XL (GNAS-XL)	XL _s α
DMR A/B	A/B (éxon A/B, éxon 1A)	Não é traduzido
Promotor da G _s α	G _s α (GNAS*)	G _s α

AS: *antisense*; XL: *extra large*. *evitamos esta denominação para não causar confusão com a designação do gene.

Os transcritos NESP55, XL, A/B e $G_s\alpha$ do *GNAS* se distinguem entre si pela presença de primeiros éxons específicos seguidos pelos mesmos éxons 2 a 13. Diferentemente dos demais transcritos, a transcrição do AS ocorre em sentido oposto aos demais de modo a não incorporar os éxons 2 ao 13. Apesar de compartilharem parte da mesma região codificadora (éxons 2 ao 13) – **Figura 3**, os transcritos NESP55, XL e $G_s\alpha$ dão origem a proteínas distintas funcional e estruturalmente. Embora os transcritos AS e A/B não originem proteínas, acredita-se que exerçam papéis regulatórios (3, 7).

Usualmente, regiões genômicas ricas em ilhas CpG correspondem a regiões regulatórias gênicas e são sensíveis à metilação. As ilhas CpG são regiões altamente ricas em guanina e citosina (GC) com 1.000 a 3.000 pares de bases e uma frequência relativamente alta de dinucleotídeos CpG (3). A metilação é um mecanismo de controle da transcrição gênica através do qual, regiões regulatórias são silenciadas (*imprinting* genômico) (11). No locus do *GNAS*, as regiões NESP55, AS, XL e A/B são diferencialmente metiladas de acordo com a origem parental alélica. Assim, em indivíduos saudáveis, espera-se que a região NESP55 encontre-se metilada no alelo paterno, mas não metilada no alelo materno; este padrão de metilação é consistente com a expressão do transcrito NESP55 exclusivamente pelo alelo materno visto que o paterno está silenciado por *imprinting* genômico. Analogamente, o padrão de metilação esperado para as regiões AS, XL e A/B é que estejam metiladas no alelo materno e não metiladas no alelo paterno; de acordo com este padrão, a expressão dos transcritos AS, XL e A/B depende exclusivamente do alelo paterno (7) - **Figura 3**.

Além das regiões regulatórias NESP55, AS, XL e A/B, merece destaque o promotor da $G_s\alpha$ que se encontra imediatamente à montante de seu éxon 1. Esta região promotora não é diferencialmente metilada de modo que, diferentemente dos outros transcritos, espera-se que a expressão da $G_s\alpha$ seja bialélica. No entanto, particularmente no córtex renal, já se demonstrou que a expressão da $G_s\alpha$ é monoalélica e depende exclusivamente do alelo materno visto que o alelo paterno encontra-se silenciado (12, 13).

Para explicar esta discrepância, *Liu et al.* sugerem um modelo no qual o padrão de metilação da DMR A/B interfere na expressão da $G_s\alpha$. Segundo estes autores, a DMR A/B deve conter uma sequência silenciadora (S) sujeita à ligação de um repressor (R) produzido de modo tecido-específico (14).

A maioria dos tecidos que expressam a $G_s\alpha$ não produzem este R e, portanto, independente do estado de metilação da DMR A/B, ambos os alelos materno e paterno são igualmente expressos. Em tecidos como o córtex renal, a produção de um R permite sua ligação com a S apenas no alelo não metilado, isto é, no alelo paterno e esta interação reprime a transcrição da $G_s\alpha$ (*imprinting* do alelo paterno). Quando a DMR A/B é metilada, como no caso do alelo materno, a S também o é, de modo que o R não consegue interagir com a S e não há repressão da transcrição da $G_s\alpha$; em outras palavras, a expressão da $G_s\alpha$ no córtex renal depende exclusivamente do alelo materno (14) - **Figura 4**.

Figura 4 – Regulação da expressão da $G_s\alpha$ em diferentes tecidos segundo o modelo proposto por *Liu et al.* (14)

Mat: alelo materno; Pat: alelo paterno; +: região metilada; S: sequência silenciadora; R: repressor.

Adicionalmente, provavelmente por mecanismo semelhante, sabe-se que a expressão da $G_s\alpha$ na linhagem somatotrófica da hipófise, na tireoide e nas gônadas depende preferencialmente do alelo materno (14, 15) - **Figura 3**.

1.3. O pseudo-hipoparatireoidismo e o pseudopseudo-hipoparatireoidismo

Em 1942, *Fuller Albright* e colaboradores descreveram a primeira doença humana atribuída à resistência hormonal, sendo a mesma denominada de pseudo-hipoparatireoidismo (PHP) (13, 16). Esta denominação abrange um conjunto de anormalidades caracterizado por achados clínicos e laboratoriais compatíveis com hipoparatireoidismo, exceto pelos níveis do paratormônio (PTH), os quais estão elevados, tendo sido excluídas insuficiência renal crônica e deficiência de magnésio (17). Assim, a fisiopatologia do PHP e do hipoparatireoidismo verdadeiro difere em relação à secreção do PTH, a qual está preservada, mas com resistência em órgãos-alvo no primeiro caso e prejudicada no segundo grupo (18).

O PTH é um hormônio secretado pelas paratireoides em resposta a quedas nas concentrações plasmáticas de cálcio ionizado, visando conservar a normocalcemia. Os níveis séricos de cálcio são mantidos dentro de uma faixa estreita de normalidade à custa das ações do PTH, que envolvem: (a) reabsorção óssea, com liberação de cálcio a partir do reservatório esquelético; (b) reabsorção renal de cálcio e excreção de fósforo e (c) aumento indireto da absorção intestinal de cálcio através da produção renal do metabólito ativo da vitamina D (1,25-di-hidroxivitamina D ou calcitriol) (19).

O PHP constitui um grupo de doenças nas quais há resistência renal ao PTH, resultando em hipocalcemia e hiperfosfatemia. Antigamente, a resistência ao PTH era confirmada pelo teste de *Ellsworth-Howard* que analisa a excreção urinária de AMPc e de fosfato após a infusão de PTH bovino (20). De acordo com esta resposta, o PHP pode ser classificado em tipo 1, quando ambas as excreções de AMPc e fósforo estão prejudicadas e em tipo 2, quando a excreção de AMPc é normal, mas a resposta fosfatúrica está alterada. Historicamente, o tipo 1 foi subdividido em 1a, 1b e 1c, levando-se inicialmente em consideração características fenotípicas e,

posteriormente, dados referentes à atividade da proteína $G_s\alpha$ e à sua patogênese molecular (21).

Indivíduos com PHP1a apresentam resistência renal ao PTH podendo ao não estar associadas a outras resistências hormonais tais como: ao TSH, às gonadotrofinas (LH e FSH) e ao GHRH. Isto ocorre porque nos tecidos onde estes hormônios atuam, a transdução de sinal intracelular desencadeada pelo agonista é mediada pela $G_s\alpha$ cuja expressão é exclusiva (córtex renal) ou majoritariamente (tireoide, gônadas e linhagem somatotrófica hipofisária) dependente do alelo materno e, é justamente este alelo que alberga mutações inativadoras em sua região codificadora (7). Por outro lado, se a mesma mutação é oriunda do alelo paterno, como este se encontra naturalmente silenciado por mecanismo de *imprinting* e, a expressão da $G_s\alpha$ é dependente do alelo materno que se encontra íntegro, nenhuma resistência hormonal é reconhecida e, por isso, deu-se o nome de pseudopseudo-hipoparatiroidismo (PPHP) aos indivíduos portadores deste tipo de mutação. Em comum, ambos os pacientes (com PHP1a e PPHP) compartilham estigmas genéticos, tais como: baixa estatura, face arredondada, braquidactilia, obesidade, ossificações subcutâneas e retardo mental, os quais receberam a designação de osteodistrofia hereditária de *Albright* (AHO) (10) - **Figura 5**.

Acredita-se que a AHO é decorrente de defeito na sinalização celular em certas células e tecidos, nos quais metade da expressão da $G_s\alpha$ (dependente do alelo paterno íntegro nos casos de PHP1a ou dependente do alelo materno íntegro nos casos de PPHP) não é suficiente para manter as funções celulares normais, resultando em haploinsuficiência (10).

Figura 5 – Estigmas genéticos da osteodistrofia hereditária de Albright (AHO)
(A) Ossificação subcutânea em crânio vista à ectoscopia (seta); **(B)** Reconstrução de imagem de tomografia computadorizada de crânio mostrando ossificações subcutâneas na calota craniana, apontadas por setas; **(C)** Paciente portador de PHP1a apresentando baixa estatura e face arredondada; **(D)** Braquidactilia em mãos vista à ectoscopia, a seta destaca o encurtamento do quarto quirodáctilo; **(E)** Radiografia de mãos mostrando braquidactilia, as setas destacam os metacarpianos encurtados; **(F)** Braquidactilia em pés vista à ectoscopia, a seta destaca o encurtamento do quarto pododáctilo; e **(G)** Radiografia de pés mostrando braquidactilia, as setas destacam os metatarsianos encurtados.

A classificação do PHP1b foi inicialmente criada para agrupar pacientes que se distinguiam do PHP1a pela ausência dos estigmas da AHO, conservação da atividade da $G_s\alpha$ e ausência de mutações na região codificadora da $G_s\alpha$. Em um paciente com estas características, a ausência de resistência óssea ao PTH, com base no seu histórico (lesões líticas em tíbia) e em estudos *in vitro*, sustentou a noção de que este grupo de pacientes seria portador de alterações esqueléticas semelhantes àsquelas encontradas em indivíduos com hiperparatireoidismo (22). No entanto, a

seguir, o mesmo grupo descreve outra paciente com PHP, estigmas da AHO, redução de atividade da $G_s\alpha$, cuja cultura de osteoblastos também mostrava responsividade ao PTH (23). Dessa forma, conclui-se que pacientes com PHP nem sempre apresentam resistência óssea ao PTH e que este critério não deve ser utilizado para discriminar o PHP em tipos 1a e 1b. Isto ocorre porque expressão da $G_s\alpha$ no tecido ósseo é bialélica, randômica e assimétrica (24, 25).

Na tentativa de esclarecer o defeito molecular em pacientes com PHP1b, *Liu et al.* (26) conduziram um estudo emblemático no qual o achado comum para todos os casos foi a perda de metilação na DMR A/B. Os autores teorizam como esta perda de metilação levaria à redução crítica da expressão da $G_s\alpha$ em tecidos como o córtex renal (resistência renal ao PTH), justificando o fenótipo de PHP sem comprometer a atividade da $G_s\alpha$ *in vitro* e na ausência de mutações na região codificadora da $G_s\alpha$. Este achado foi considerado como uma alteração epigenética visto que o mecanismo responsável pela perda de metilação ainda não havia sido elucidado.

Em 2003, pela primeira vez, *Bastepe et al.* (27) relatam a deleção de 3 kb em heterozigose em uma região localizada cerca de 220 kb à montante do *GNAS* compreendendo parte do gene *STX16* em pacientes com PHP1b, mas não em indivíduos normais, associada à hipometilação da DMR A/B e transmitida via materna. Os autores postulam que esta deleção corromperia a integridade de um elemento de controle *cis* crucial para o estabelecimento da metilação no éxon A/B explicando sua hipometilação. Posteriormente, outras deleções em heterozigose no mesmo gene *STX16* (12, 28) ou comprometendo parte do NESP55 (29) foram descritas exibindo o mesmo padrão de hipometilação da DMR A/B – **Figura 6**.

Em 2005, o mesmo grupo (30) identifica deleções de 4 e 4,7 kb, em duas famílias distintas, envolvendo toda a DMR NESP55 e os éxons 3 e 4 da DMR AS, resultando em perda de todos os *imprints* maternos. Assim, os autores inferem que estas regiões também devam conter um elemento de controle *cis* crucial para o estabelecimento da metilação no alelo materno.

Mais recentemente, estes mesmos pesquisadores descrevem outra deleção de 4,2 kb envolvendo os mesmos éxons 3 e 4 da DMR AS, mas sem comprometer o NESP55, com impacto semelhante no padrão de metilação das DMRs do *GNAS* (31). No caso de transmissão materna, a deleção causa perda de todos os *imprints* maternos do *GNAS* e ganho parcial da metilação do NESP55 resultando em PHP1b – **Figura 6**. No caso de transmissão paterna, a deleção gera perda parcial da metilação do NESP55 e ganho parcial da metilação da DMR A/B prevenindo o desenvolvimento do PHP1b.

Apesar de todas estas evidências, ainda resta serem identificados os elementos responsáveis pela metilação das DMRs do *GNAS*. Por outro lado, todo este conhecimento tem permitido agrupar os pacientes com estes achados como pacientes PHP1b com herança autossômica dominante (AD-PHP1b).

Embora os mecanismos responsáveis pelos casos esporádicos de PHP1b (sporPHP1b) sejam mais obscuros, ainda que raro, um mecanismo já foi identificado. Trata-se da dissomia uniparental paterna da região cromossômica 20 q (patUPD20q) compreendendo o locus do *GNAS*, que faz com que a DMR NESP55 exiba padrão de hipermetilação (ambos os alelos são metilados), enquanto as DMRs AS, XL e A/B exibam padrão não metilado tal qual ocorre normalmente no alelo paterno (32) – **Figura 6**.

Cerca de 80 a 85% desses casos de sporPHP1b cursam com perda extensa de *imprinting* no locus do *GNAS*, incluindo a perda de metilação na DMR A/B e perda de *imprinting* afetando, pelo menos, uma DMR adicional (ganho de metilação na NESP55, perda de metilação na AS e/ou XL) sem as deleções envolvendo o *STX16* ou as DMR NESP55 e AS (33-35) e ainda não se conhece ao certo o que leva a estas alterações de metilação – **Figura 6**. Especula-se ainda que possam ser resultantes de eventos pós-zigóticos, suportados pela observação de uma perda parcial de *imprinting* em alguns pacientes (34).

Figura 6 – Patogênese molecular do PHP1b

Representação esquemática de trecho do cromossomo 20q onde estão localizados o gene *STX16* (caixa preta = região codificadora sem a representação por éxons) e o locus do *GNAS*. O *STX16* localiza-se cerca de 220 kb à montante do locus do *GNAS*. Destaque é dado para a região regulatória do *GNAS* composta pelas DMRs: NESP55, AS, XLαs e A/B e para a região codificadora da G_sα (caixas amarelas). As setas representam o sentido da transcrição gênica; as setas acima das caixas indicam transcrição a partir do alelo materno (m) e as setas abaixo das caixas, transcrição a partir do alelo paterno (p); as barras pretas indicam as deleções já identificadas no *STX16* e no *GNAS*, com seus respectivos tamanhos. A tabela mostra diferentes padrões de metilação, que foram numerados de 1 a 7 para fins didáticos, descritos em pacientes com PHP1b associados ou não a deleções gênicas e o padrão de herança associado. CH₃: região metilada; -: região não metilada. Ref.: referência.

Finalmente, a categoria PHP1c foi criada para contemplar os casos de PHP que se comportavam fenotipicamente como os PHP1a, mas que não tinham redução de atividade da G_sα (36). Este padrão é resultado de mutações na região carboxiterminal da G_sα com prejuízo da transmissão do sinal entre seu respectivo GPCR e a G_sα. Como a interação entre a G_sα e a adenilil ciclase não é prejudicada, *in vitro*, a atividade da G_sα pode estar preservada desde que seja medida através da geração de AMPc oriunda da interação G_sα-adenilil ciclase independente da interação GPCR-G_sα (37). Por isso, hoje em dia admite-se que os casos de PHP1c devam ser classificados como PHP1a e que a categoria PHP1c seja extinta (38).

Os pacientes portadores de PHP2 apresentam fenótipo clínico incomum, resposta urinária normal do AMPc e resposta fosfatúrica diminuída à administração de PTH. Estes achados sugerem que a atividade da $G_s\alpha$ seja normal, mas que o AMPc gerado ou o comprometimento de outra via intracelular (por exemplo, via proteína Gq) sejam incapazes de ativar alvos que resultem na internalização dos transportadores de sódio e fosfato. Até o momento, não foi identificada base genética ou padrão de herança familiar para o PHP2 e, como indivíduos com deficiência de vitamina D podem apresentar quadro clínico e bioquímico semelhante, alguns autores acreditam que a maioria dos casos de PHP2 represente casos de deficiência de vitamina D não suspeitada (17, 39).

A classificação do PHP levando em consideração critérios fenotípicos implica em considerar pacientes com estigmas da AHO como pacientes com PHP1a enquanto sua ausência conduz ao diagnóstico de PHP1b.

No entanto, com base na patogênese molecular do PHP, diante do exposto, podemos classificar o PHP em PHP1a quando decorre de mutações na região codificadora da $G_s\alpha$ levando à produção de uma proteína defeituosa e, em PHP1b, quando resulta de alterações no padrão de metilação das DMRs do *GNAS* com consequente perda de metilação na DMR A/B conduzindo a uma redução crítica da expressão da $G_s\alpha$. Com base nesta classificação, estigmas da AHO têm sido identificados em ambos os tipos (21, 40-42).

Por este motivo, neste estudo, propusemo-nos a identificar a base molecular de 25 pacientes com PHP para então correlacioná-los com o seu respectivo fenótipo. Mostramos também o seguimento ambulatorial de 21 destes pacientes com ênfase no diagnóstico e tratamento das resistências hormonais e destaque para as complicações crônicas relacionadas à hipocalcemia e/ou hiperfosfatemia. Adicionalmente foi realizada a caracterização fenotípica e identificada a base molecular de quatro pacientes com PPHP.

2.OBJETIVOS

- Classificar 25 pacientes com PHP baseado nos defeitos moleculares do *GNAS* e correlacionar estes achados com o fenótipo.
- Pesquisar mutações no *GNAS* nos quatro pacientes com PPHP e caracterizar os seus fenótipos.
- Apresentar o seguimento ambulatorial de 21 pacientes com PHP.

3.MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas (HC) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), protocolo número 0420/10 (registro *online* número 6022). Foi obtido consentimento por escrito de todos os pacientes ou responsáveis antes do início dos procedimentos da pesquisa.

3.2. Casuística

Os pacientes foram provenientes do ambulatório de Doenças Osteometabólicas do HC-FMUSP ou encaminhados do Instituto da Criança do HC-FMUSP. A casuística compreendeu 25 pacientes com PHP e quatro pacientes com PPHP.

O diagnóstico de PHP foi feito com base: nas manifestações clínicas de hipocalcemia (parestesias, contraturas musculares, convulsões), presença dos estigmas da AHO e alterações laboratoriais (hipocalcemia, hiperfosfatemia e níveis de PTH elevados na presença de função renal normal e ausência de hipomagnesemia) anteriores ao tratamento. Os casos de PPHP foram identificados dentro do contexto familiar. Também foram selecionados parentes em primeiro grau de pacientes com resistência ao PTH.

3.3. Avaliação genotípica dos pacientes com PHP e PPHP

O estudo molecular foi executado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do HC-FMUSP.

3.3.1. Extração de DNA genômico a partir de sangue total, de raspado de mucosa oral ou de cordão umbilical

Foram coletados 10 mL de sangue, de cada paciente, em dois tubos contendo anticoagulante EDTA a partir dos quais o DNA genômico foi extraído. A identificação de familiares afetados também pôde ser realizada através de amostra de sangue, de raspado de mucosa oral ou de cordão umbilical.

A extração de DNA de sangue e de raspado de mucosa oral foi realizada segundo o procedimento padronizado pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, baseado na técnica *salting out* adaptada de *Miller et al* (43).

A extração de DNA a partir de cordão umbilical foi realizada através do *Wizard® Genomic DNA purification kit* (Promega Corp., Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.2. Pesquisa de mutações de ponto, microdeleções e microinserções na região codificadora da $G_s\alpha$ por PCR e sequenciamento automático

A partir do DNA genômico de cada paciente, a região codificadora da $G_s\alpha$ foi amplificada através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). De acordo com a sequência selvagem da região codificadora da $G_s\alpha$ depositada no *Ensembl* (*Transcript* ENST00000371085), foram desenhados *primers* específicos flanqueando os éxons 1 ao 13. As sequências de todos os *primers* e os tamanhos dos respectivos *amplicons* esperados estão descritos na **Tabela 2**.

Para a amplificação de cada fragmento, foram preparadas reações com um volume final de 25 μ L, utilizando-se: cerca de 100 ng de DNA genômico, 200 μ mol/L de cada desoxinucleotídeo, 10 pmol de *primer F* e 10 pmol de *primer R* referente ao(s) éxon(s) de interesse, 1 unidade (U) da enzima *Taq DNA* polimerase (5 U/ μ L) (Promega Corporation, WI, EUA), tampão 5x de reação *Green Go Taq™* fornecido pelo fabricante da enzima e água

ultrapura para completar o volume. Particularmente no caso da amplificação do éxon 1, acrescentou-se 1 µL de dimetilsulfóxido (Sigma, St Louis, MO, EUA) por reação em função do alto conteúdo GC da sequência alvo.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* para a avaliação da região codificadora da $G_{s\alpha}$

Éxons	Nome dos <i>primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho esperado do <i>amplicon</i> (pb)
1	1 F	5' CGCTCCTTGCCGAGGAGCCGA 3'	450
	1 R	5' CCGAATCCGCGCCCCTGGGT 3'	
2	2 F	5' AAAATGCCTCCTTCATAACCTGA 3'	195
	2 R	5' GCCCACCTATACTTCCTAAAG 3'	
3	3 F	5'ATGGTTGAGGAATGTAGAGAGACTG3'	197
	3 R	5' CAGTATGATCTTCATGTTTGTTTG 3'	
4-5	4 F	5' ATGAAAGCAGTACTCCTAACTGA 3'	429
	5 R	5' TGGATGCTCCTGCCCATGTG 3'	
6	6 F	5' ATCACACCAAGTGTCGGTCA 3'	294
	6 R	5' CTTTCAAAGCAGGATCACAGG 3'	
7-8	7 F	5' TGCTGCATAACTGTGGGACG 3'	425
	8 R	5' AGAAACCATGATCTCTGTTATA 3'	
9-10	9 F	5' ACAGAGATCATGGTTTCTTG 3'	413
	10 R	5' AACAGTGCAGACCAGGGCCTCCTG 3'	
10-11	10 F	5' TGTTAGGGATCAGGGTCGCTG 3'	498
	11 R	5' AGAACCACCGCAATGAACAGCC 3'	
12	12 F	5' AGACTTCAGGAGCTACAGAGA 3'	195
	12 R	5' AGAGGAGGAACAAGAGAGGAA 3'	
13	13 F	5' CATCAGAGGCTGGCTGACAGC 3'	282
	13 R	5' AAGGCTTTAATTAAATTTGGG 3'	

De acordo com o éxon a ser amplificado, as reações foram submetidas a diferentes protocolos de PCR em termociclador automático *Mastercycler* (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) ou *Veriti 96 Thermal Cycler* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) - **Tabela 3.**

Tabela 3 – Programas de PCR para amplificação da região codificadora da G_sα

Éxons	Programa de PCR
1	(98°C 2 min)x1 + (98°C 30 s 68°C 2 min)x35 + (68°C 10 min)x1
2 ao 12	(94°C 3 min)x1 + (94°C 30s 56°C 30s 72°C 1 min)x35 + (72°C 10 min)x1
13	(94°C 3 min)x1 + (94°C 30s 58°C 30s 72°C 1 min)x35 + (72°C 10 min)x1

O tamanho e a concentração dos *amplicons* foram determinados através da comparação com fragmentos do marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA), de concentração conhecida, após eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) preparado com tampão TAE 1x (Tris 0,004 mol/L; ácido acético glacial; EDTA 0,001 mol/L pH 8,0) e corado com brometo de etídio (Sigma, St Louis, MO, EUA) ou corante fluorescente *SYBR Safe DNA Stain* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e observadas em transiluminador ultravioleta.

Após confirmação da amplificação, cerca de 30 ng dos produtos de PCR foram purificados com 10 U das enzimas exonuclease I e *shrimp alkaline phosphatase* do kit EXO-SAP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) por meio de incubação a 37°C por 15 minutos seguida por inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos.

Os produtos purificados foram sequenciados com o kit *ABI Prism™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Utilizaram-se 30 ng de produto de PCR purificado, 1 µL de *BigDye Terminator*, 3 µL de tampão de sequenciamento, 5 pmol de um dos *primers* específicos para cada éxon (**Tabela 2**) e água ultrapura para completar o volume de 10 µL. Todas as reações de sequenciamento foram realizadas nos termocicladores citados anteriormente e seguiram o mesmo protocolo de amplificação independente do éxon em questão: 25 ciclos sendo cada ciclo constituído por uma etapa de

desnaturação a 96°C por 10 minutos, hibridação a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

O material resultante da reação de sequenciamento foi transferido para uma placa de 96 poços (*MicroAmp optical 96-well Reaction Plate*, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e precipitado seguindo o protocolo de isopropanol/etanol (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após a adição de 15 µL de formamida (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em cada poço da placa, o produto foi submetido a uma eletroforese capilar no equipamento *ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa *Sequencher v.4.8* (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA) e as sequências obtidas foram comparadas com as descritas no *Ensembl* (*Transcript ENST00000371085*).

Quando foi identificada alguma mutação conhecida, a mesma foi confirmada através de uma nova reação de PCR e de sequenciamento automático. Variantes alélicas não descritas na literatura foram rastreadas em um grupo de 100 indivíduos normais (200 alelos) a fim de descartar a possibilidade de se tratar de um SNP (*single nucleotide polymorphism*) sem significado funcional. Além disso, elas foram pesquisadas no site <http://www.1000genomes.org/>, onde estão registradas inúmeras variantes alélicas humanas.

3.3.3. Pesquisa de deleções em heterozigose na região codificadora da $G_{s\alpha}$ e avaliação do padrão de metilação das DMRs do *GNAS* através da técnica de MS-MLPA

Nos casos em que não foram encontradas mutações na região codificadora da $G_{s\alpha}$, foi realizada a pesquisa de deleção em heterozigose desta mesma região através da técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

Para este estudo, foi utilizado o *kit SALSA MLPA ME031-A1 GNAS* (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) que permite a avaliação simultânea de alterações no número de cópias da região codificadora da $G_{s\alpha}$ (MLPA) e avaliação da taxa de metilação das DMRs do GNAS (MS-MLPA: *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Por este motivo, consideramos que a reação de MS-MLPA já engloba a etapa da reação de MLPA.

A reação de MLPA foi descrita inicialmente em 2002 por *Schouten et al.* e é capaz de detectar variações no número de cópias de um ou mais éxons, genes inteiros ou regiões cromossômicas importantes (44). Por sua vez, a reação de MS-MLPA é uma modificação da técnica de MLPA que possibilita a avaliação da taxa de metilação de regiões específicas com o emprego de até 40 sondas distintas em uma única reação (45).

Para a interpretação do número de cópias da região codificadora da $G_{s\alpha}$, o *kit* disponibiliza oito sondas específicas complementares a esta região e 21 sondas de referência (externas ao locus do GNAS). No que se refere à avaliação do padrão de metilação das DMRs do GNAS, são disponíveis, adicionalmente, 12 sondas complementares às DMRs do GNAS (NESP55, AS, XL e A/B), duas sondas para o éxon 1 da $G_{s\alpha}$ e cinco sondas referentes ao *STX16*.

Para cada ensaio de MS-MLPA, foram incluídas, no mínimo, três amostras de DNA de indivíduos controle. Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA genômico de cada amostra (pacientes ou indivíduos controle) e a reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Todas as etapas da reação de MS-MLPA estão esquematizadas na **Figura 7**.

Figura 7 – Representação esquemática das etapas da reação de MS-MLPA

(A) A porção superior da figura representa os componentes de uma “sonda padrão”. Cada “sonda padrão” é formada por dois fragmentos de olinucleotídeos. Enquanto o fragmento menor contém parte de uma sequência específica complementar ao DNA alvo (sonda 1a) e sequência específica complementar à região que pode ou não estar metilada (região quadriculada) no DNA alvo, o fragmento maior contém a outra parte de uma sequência específica complementar ao DNA alvo (sonda 1b) e uma sequência “stuffer” responsável por garantir que os produtos amplificados por

PCR tenham tamanhos distintos que permitam sua identificação. A reação de MLPA avalia o número de cópias de uma determinada região gênica e segue as seguintes etapas: 1. hibridação das sondas com seus respectivos DNAs alvo; 2. reação de ligase: caso haja 100% de hibridação entre os dois fragmentos de uma determinada sonda com seu DNA alvo, estes fragmentos serão unidos pela enzima ligase; 3. amplificação das sondas por PCR *multiplex*: as sondas hibridadas e ligadas são amplificadas por PCR com a utilização de *primers* “universais”. A reação de MS-MLPA avalia a taxa de metilação de uma determinada região gênica e segue as seguintes etapas: 1. hibridação das sondas com seus respectivos DNAs alvo; 2. reações simultâneas de ligase e digestão com *HhaI*: caso o DNA alvo seja não seja metilado, ele será digerido pela *HhaI* independente da reação de ligase; 3. amplificação das sondas por PCR *multiplex*: as sondas hibridadas, ligadas e que não sofreram digestão pela *HhaI* são amplificadas por PCR com a utilização de *primers* “universais”. **(B)** Enfoque na etapa da reação de MS-MLPA onde ocorre a digestão do DNA alvo não metilado e de sua respectiva sonda; desta forma, não há amplificação desta sonda na etapa de PCR. **(C)** Enfoque na etapa da reação de MS-MLPA ilustrando a hibridação dos dois fragmentos de uma determinada sonda com seu DNA alvo; como o DNA alvo encontra-se metilado, não há digestão do híbrido DNA-sonda permitindo a amplificação da sonda em questão na etapa de PCR.

Os produtos resultantes foram detectados e quantificados por eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e analisados pelo programa *Coffalyser.NET* (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) fornecido pelo fabricante.

Para a pesquisa do número de cópias da região codificadora da $G_s\alpha$, o *kit* de MS-MLPA dispõe de 14 sondas de MLPA para o cromossomo 20 e 17 sondas de MLPA dispersas nos cromossomos: 1, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21. Das 14 sondas para o cromossomo 20, seis sondas encontram-se à montante do locus do *GNAS* (uma sonda na região 20p12, uma sonda para o gene *NNAT* e quatro sondas complementares aos éxons 3, 5, 6 e 8 do gene *STX16*) e oito sondas estão na região codificadora da $G_s\alpha$ (éxons 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11 e 13) – **Figura 8**.

Figura 8 – Representação esquemática de parte do cromossomo 20 com destaque para a localização das sondas de MLPA utilizadas para a pesquisa de deleções em heterozigose na região codificadora da G_{α}

As setas representam as sondas. O *kit* de MS-MLPA dispõe de 14 sondas de MLPA para o cromossomo 20 (setas na figura) e 17 sondas para outros cromossomos (sondas de referência).

Para a avaliação do padrão de metilação das DMRs do *GNAS*, o *kit* de MS-MLPA apresenta 16 sondas de MS-MLPA para o cromossomo 20 e uma sonda de MS-MLPA para o cromossomo 3. Das 16 sondas para o cromossomo 20, uma sonda encontra-se à montante do locus *GNAS* (gene *STX16*), 12 sondas estão nas DMRs do *GNAS* (três sondas para a região *NESP55*, três sondas para a região *AS*, quatro sondas para a região *XL* e duas sondas para a região *A/B*), duas sondas para o éxon 1 da região codificadora da G_{α} e uma sonda localiza-se à jusante do locus *GNAS* (gene *TH1L*) – **Figura 9**.

Figura 9 – Representação esquemática de parte do cromossomo 20 com destaque para a localização das sondas de MS-MLPA utilizadas para a avaliação do padrão de metilação das DMRs do *GNAS*

As setas representam as sondas. O *kit* de MS-MLPA dispõe de 14 sondas de MS-MLPA para o locus do *GNAS* (setas na figura) e três sondas de referência: Duas delas localizadas no cromossomo 20 (setas na figura: genes *STX16* e *TH1L*) e uma sonda para o cromossomo 3.

Durante a reação de MS-MLPA, as sondas podem ou não ser digeridas pela enzima *HhaI*; caso uma determinada sonda X seja digerida (DNA alvo não metilado), esta não será amplificada na etapa de PCR e não gerará sinal

após eletroforese capilar; contudo, se a mesma sonda X não for digerida (DNA alvo metilado), ela será amplificada por PCR e gerará um pico que poderá ser analisado após eletroforese capilar. Alternativamente, o DNA alvo para a hipotética sonda X pode ser híbrido (por exemplo, um alelo metilado e o outro alelo não metilado) e, neste caso, teoricamente, 50% da sonda X será digerida enquanto os outros 50% estarão disponíveis para amplificação por PCR. Então, após a eletroforese capilar, nesta condição, espera-se que o pico emitido pela sonda X seja metade do pico gerado pela mesma sonda quando o DNA alvo é metilado. A **Figura 10**, ao exibir o padrão de eletroforese capilar de uma amostra de DNA de indivíduo controle, exemplifica o resultado de uma reação de MS-MLPA.

Figura 10 – Padrão de eletroforese capilar da reação de MS-MLPA proveniente de amostra de indivíduo controle: avaliação do padrão de metilação das DMRs do *GNAS*

(A) Resultado da etapa de MLPA (DNA não digerido). (B) Resultado da etapa de MS-MLPA (DNA submetido à digestão com a *HhaI*). As setas contínuas apontam para os picos obtidos pela amplificação de sondas de MS-MLPA presentes tanto nas reações de MLPA como nas de MS-MLPA. As setas tracejadas apontam para os picos gerados por sondas específicas de MS-MLPA nas reações de MLPA, mas que desaparecem completamente após as reações de MS-MLPA. Destas cinco sondas, três são sondas de referência e o seu desaparecimento completo após a reação de MS-MLPA indica que a digestão pela *HhaI* foi completa. Já o desaparecimento completo após reação de MS-MLPA das sondas de tamanho 220 e 335 nt indica que as mesmas foram totalmente digeridas e que a metilação das regiões genômicas correspondentes deve estar abolida; isto é, as regiões genômicas em questão não estão metiladas. *sondas de referência.

Vale lembrar que a utilização de sondas de MLPA para o *STX16* também permite a pesquisa do número de cópias deste gene e este resultado é de particular interesse quando se avalia o padrão de metilação das DMRs do *GNAS*.

Os ensaios foram considerados válidos apenas quando os controles eram diploides para as sondas de MLPA analisadas e as amostras também apresentavam duas cópias na maioria das sondas de MLPA de referência. Todas as reações nas quais foram detectadas alterações no número de cópias dos genes em estudo ou alterações no padrão esperado metilação foram repetidas para fins de confirmação.

Os casos suspeitos de deleção em heterozigose de 3 kb do *STX16* foram verificados através de PCR e eletroforese em gel de agarose. Os *primers* e as condições de PCR foram descritos anteriormente (27, 42).

Para a avaliação de patUPD20, foi realizada a análise de microssatélites usando 11 marcadores polimórficos em torno do locus do *GNAS*, usando o *kit ABI PRISM Linkage Mapping Set v2.5* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.3.4. Controles

Duzentos indivíduos adultos brasileiros, de ambos os sexos, originários de um banco de DNA de controles do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do HC-FMUSP, foram rastreados para as variantes

alélicas encontradas no *GNAS*. Os controles utilizados para os ensaios de MS-MLPA também foram oriundos do mesmo banco de DNA.

3.4. Avaliação fenotípica dos pacientes com PHP e PPHP

3.4.1. Caracterização clínica

A caracterização clínica dos pacientes com PHP e PPHP incluiu a avaliação dos estigmas da AHO e, apenas para os pacientes com PHP, a avaliação de catarata, visto que se trata de complicação potencial relacionada ao diagnóstico tardio e/ou tratamento inadequado do PHP.

Os estigmas da AHO considerados foram: face arredondada, braquidactilia, ossificações subcutâneas, retardo mental, baixa estatura e obesidade. Como alguns dos estigmas podem ser subjetivos (ex. face arredondada) ou inespecíficos de PHP/PPHP (ex. obesidade e baixa estatura), seguimos a recomendação do diagnóstico clínico da AHO baseado na presença de, pelo menos, duas das seis manifestações citadas (46).

Consideramos baixa estatura, valores iguais ou inferiores a dois desvios padrão para a mesma faixa etária e sexo (Z de estatura ≤ -2). Foram classificados como obesos, os adultos com índice de massa corpórea (IMC) igual ou superior a 30 kg/m^2 e as crianças com IMC igual ou superior ao percentil 95 para idade e sexo. Os cálculos foram realizados de acordo com as curvas de crescimento do CDC de 2000 (<http://www.cdc.gov/growthcharts/>).

A avaliação de catarata foi realizada por uma única oftalmologista (Dra. Amaryllis Avakian) do Serviço de Oftalmologia do HC-FMUSP.

3.4.2. Avaliação laboratorial

Para a avaliação laboratorial, realizou-se a coleta de sangue venoso periférico no período matutino. As dosagens bioquímicas e hormonais foram

realizadas no Laboratório Central e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do HC-FMUSP.

Os exames realizados, bem como a metodologia empregada e seus respectivos coeficientes de variação intraensaio e interensaio, estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Exames laboratoriais: metodologia e coeficientes de variação intraensaio e interensaio

Analito	Método	Variação intraensaio	Variação interensaio
Cálcio total	Colorimétrico automatizado	< 3,1%	< 3,5%
Cálcio iônico	Eletrodo íon seletivo	< 0,7%	< 0,3%
Fósforo	Colorimétrico enzimático	< 3,0%	< 4,4%
Magnésio	Colorimétrico automatizado	< 2,1%	< 2,4%
Creatinina	Colorimétrico cinético	< 3,2%	< 2,3%
Fosfatase alcalina	Cinético automatizado	< 2,1%	< 1,8%
P1NP	Eletroquimioluminométrico	< 7,0%	< 5,1%
Osteocalcina	Eletroquimioluminométrico	< 7,0%	< 4,3%
CTx	Eletroquimioluminométrico	< 10,0%	< 4,3%
PTH	Imunoquimioluminométrico	< 15%	< 6,7%
25OHD	Químioimunoensaio	< 3,2%	< 7,6%
TSH	Imunofluorimétrico	< 1,9%	< 3,4%
T4 livre	Fluoroimunoensaio	< 2,6%	< 3,0%
Ac anti Tg	Fluoroimunoensaio indireto	< 2,8%	< 4,2%
Ac anti TPO	Fluoroimunoensaio indireto	< 9,3 %	< 5,7%
IGF-1	Imunoquimioluminométrico	< 9,0 %	< 7,8 %
LH	Eletroquimioluminométrico	< 5%	< 5%
FSH	Eletroquimioluminométrico	< 5%	< 5%
Testosterona	Eletroquímioimunoensaio	< 5%	< 5%
Estradiol	Eletroquímioimunoensaio	< 5%	< 5%
Inibina B	Enzimaimunoensaio	< 15%	< 15%

Nos pacientes com suspeita de PPHP, foram dosados: cálcio total (Ca), cálcio iônico (Cai), fósforo (P), PTH, magnésio (Mg), creatinina e 25-hidroxivitamina D (25OHD) a fim de se verificar a ausência de resistência ao PTH.

Nos pacientes com PHP, a avaliação laboratorial consistiu na caracterização dos perfis de resistência hormonais antes e durante o tratamento. Para a avaliação de resistência ao PTH, foram analisados: Ca, P, PTH, Mg, creatinina, 25OHD e os marcadores ósseos (fosfatase alcalina, osteocalcina, P1NP e CTx). Quanto à resistência ao TSH, foram dosados: TSH, T4 livre, Ac antiTg e Ac antiTPO. Em relação às demais resistências hormonais, foram solicitadas dosagens de: IGF-1, LH, FSH e inibina B; para os homens, testosterona e, para as mulheres, estradiol.

3.4.3. Avaliação por exames de imagem

Os exames de imagem foram feitos pelo Instituto de Radiologia (InRad) do HC-FMUSP.

Radiografias (RX) de mãos e pés com carga foram realizadas para a detecção de braquidactilia tanto nos pacientes com PHP como nos pacientes com PPHP. Para a detecção de casos mais sutis de braquidactilia em mãos, utilizou-se a pesquisa do sinal do metacarpiano, que consiste em se traçar uma linha imaginária tangencial à circunferência das cabeças (extremidades distais) do quarto e do quinto metacarpianos. Se a extensão desta linha passar distalmente à cabeça do terceiro metacarpiano, o sinal é negativo. No caso da linha passar tangencialmente à circunferência da cabeça do terceiro metacarpiano, o sinal é limítrofe. Ao passo que, se a linha passar através da extremidade distal do terceiro metacarpiano, o sinal é positivo e indica o encurtamento do quarto metacarpiano (47) - **Figura 11**.

Tomografias computadorizadas (TC) de crânio sem contraste foram realizadas apenas para os pacientes com PHP a fim de se avaliar calcificações em sistema nervoso central (SNC), outra complicação potencial relacionada ao diagnóstico tardio e/ou tratamento inadequado do PHP.

Figura 11 – Sinal do metacarpiano na avaliação de braquidactilia

(A) RX da mão esquerda da paciente 22: sinal do metacarpiano negativo. **(B)** RX da mão esquerda do paciente 25: sinal do metacarpiano negativo, porém um pouco menos evidente do que o da paciente 22. **(C)** RX da mão esquerda da paciente 26: sinal do metacarpiano positivo.

3.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *SPSS Statistics software versão 22.0* (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk* para os dados de cada variável quantitativa estudada. Para valores das variáveis com distribuição normal, os dados foram descritos como médias e fornecidos seus intervalos de confiança (IC). Para valores das variáveis com distribuição não normal, os dados foram descritos como medianas com os valores mínimo e máximo. Segundo o tipo de distribuição, as diferenças entre grupos foram testadas quanto à significância através dos testes *t* de *Student* (distribuição normal) e *Mann-Whitney* (distribuição não normal).

Para as variáveis qualitativas, foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher* de acordo com as frequências esperadas.

A significância foi considerada pelo valor de $p < 0,05$.

4.RESULTADOS

4.1. Avaliação genotípica dos pacientes com PHP e PPHP

4.1.1. Mutações envolvendo a região codificadora da $G_s\alpha$

Foram identificadas oito mutações em heterozigose na região codificadora da $G_s\alpha$ nos pacientes com PHP1a (n = 10) e PPHP (n = 4), das quais cinco ainda não foram descritas na literatura médica (PubMed) ou nos dois principais bancos de dados públicos: HGMD (*Human Gene Mutation Database* - <http://www.hgmd.org/>) e GNAS LOVD (*Leiden Open Variation Database* 3.0 - http://chromium.liacs.nl/LOVD2/home.php?select_db=GNAS)

– **Tabela 5.**

A mutação p.Asp189MetfsX14 foi a causa de PHP1a nos pacientes 1 e 2 e de PPHP na mãe deles (paciente 3), membros da família I - **Figura 12**. Esta mutação causa a deleção de 4 pb (nucleotídeos 565 a 568 do cDNA da $G_s\alpha$) localizados no éxon 7 da $G_s\alpha$ (**Figura 13**) e implica na formação de um *frameshift* e de um códon de parada prematuro 14 códons após a deleção. Foi descrita pela primeira vez em 1995 por Yu *et al.* (48) e tem sido encontrada como uma causa recorrente de PHP/PPHP (49). Tanto o diagnóstico clínico como o diagnóstico molecular da paciente 2 foram realizados antes da mesma ficar grávida permitindo o aconselhamento genético (risco de 50% de gerar uma criança com PHP). A paciente teve uma filha e com o cordão umbilical da criança foi possível obtermos DNA genômico a partir do qual se realizou o rastreamento precoce da mutação p.Asp189MetfsX14. O estudo mostrou que o bebê não era afetado, dispensando a realização de exames laboratoriais para investigação de PHP - **Figura 12.**

Figura 12 – Heredograma da família I

Figura 13 – Eletroferogramas com destaque para as mutações identificadas no *GNAS* nos pacientes com PHP1a ou PPHP

(A) Mutação p.Asp189MetfsX14 detectada nos pacientes 1, 2 e 3 (família I); os nucleotídeos enquadados foram deletados no alelo mutado. (B) Mutação c.312+5G>A apresentada pelas pacientes 4 e 5 (família II); os primeiros nucleotídeos do íntron 4 foram representados por letras minúsculas e o quadrado destaca a substituição na posição +5 do sítio de *splicing*. (C) Mutação p.Gln267ArgfsX4 exibida pelos pacientes 8 e 9 (família IV); o quadrado engloba o nucleotídeo deletado no alelo mutado. (D) Mutação p.Gln236X revelada na paciente 12, a letra T enquadrada representa a substituição no alelo mutado. (E) Mutação p.Gly52Asp revelada no paciente 13, a letra A enquadrada representa a substituição no alelo mutado. (F) Mutação p.X395Gln revelada no paciente 14, a letra C enquadrada representa a substituição no alelo mutado.

Tabela 5 – Defeitos moleculares detectados na região codificadora da $G_s\alpha$ em 14 pacientes com PHP1a ou PPHP

Família	Paciente	Diagnóstico	Tipo de mutação	Defeitos moleculares no $GNAS$		Ref.
				Mudança de nucleotídeo	Mudança de aminoácido	
I	1*	PHP1a	<i>Frameshift</i>	c.565_568delGACT	p.Asp189MetfsX14	(48)
	2	PHP1a				
	3	PPHP				
II	4*	PHP1a	Mutação em sítio de <i>splicing</i>	c.312+5G>A	Não aplicável	(50)
	5					
III	6*	PHP1a	<i>Missense</i>	c.318T>C	p.Ile106Thr	(51)
	7					
IV	8*	PPHP	<i>Frameshift</i>	c.800delA	p.Gln267ArgfsX4	Nova
	9					
V	10*	PHP1a	Deleção ampla	Deleção da DMR A/B e região codificadora da $G_s\alpha$		Nova
	11	PPHP				
Esporádico	12	PHP1a	<i>Nonsense</i>	c.708C>T	p.Gln236X	Nova
Esporádico	13	PHP1a	<i>Missense</i>	c.155G>A	p.Gly52Asp	Nova
Esporádico	14	PHP1a	Perda do códon de parada	c.1183T>C	p.X395Gln	Nova

*Caso índice.Ref.: referência

A análise do DNA da paciente 4 (caso índice da família II) revelou a mutação c.312+5G>A, causada pela substituição de uma guanina por uma adenina no quinto nucleotídeo do íntron 4 da $G_s\alpha$ - **Figura 13**. Esta substituição foi descrita em um paciente francês em 2008 (50) e, de acordo com um programa de predição de sítio de *splicing*, apresenta efeito deletério sendo considerada causa de PHP. À semelhança da paciente 2, a paciente 4 teve uma filha (paciente 5) que também foi rastreada precocemente para a mutação c.312+5G>A. Devido ao resultado positivo, o bebê foi diagnosticado com PHP1a quando era assintomático e ainda normocalcêmico.

O genótipo responsável pelo PHP1a nos pacientes 6 e 7 (família III) foi a mutação p.Ile106Thr. Este resultado já foi previamente documentado como causa da doença por nós (51).

As mutações novas p.Gln267ArgfsX4 (localizada no éxon 10) e p.Gln236X (localizada no éxon 9) foram consideradas deletérias visto que levam a uma proteína truncada com perda do domínio de interação com o receptor acoplado à proteína G (GPCR), que é codificado pelos éxons 12 e 13 – **Figuras 2 e 13**. Isto explica o fenótipo de PPHP nos pacientes 8 e 9 (família IV) e o fenótipo de PHP1a na paciente 12, respectivamente.

O paciente 13 veio referido para o nosso serviço como um caso esporádico de PHP. Seu genótipo revelou a nova variante alélica p.Gly52Asp, devida à substituição de uma guanina por uma adenina no códon 52, localizado no éxon 2 da $G_s\alpha$ - **Figura 13**. Esta variante alélica não foi identificada no *1000 Genomes Project database* (<http://www.1000genomes.org/>) e também não foi detectada em 200 alelos controle; o que indica não se tratar de um SNP (*single nucleotide polymorphism*). Ela também foi pesquisada no DNA dos pais do paciente 13 e, por não ter sido identificada, foi considerada uma mutação *de novo*. Como a mãe do paciente 13 não possuía a mutação, foi possível excluir o risco de 50% de ter uma nova criança com PHP1a.

Adicionalmente, esta substituição não sinônima ocorre no aminoácido 52 (glicina) que é altamente conservado filogeneticamente (**Tabela 6**); este

indício favorece a hipótese de ser a causa da doença. Outro indício é sua localização no éxon 2, o qual, juntamente com o éxon 1, codifica o domínio funcional da $G_s\alpha$ com atividade GTPase; logo mutações nesta região podem afetar a habilidade de ligação ao GTP ou a habilidade de hidrólise do GTP (52) – **Figura 2**. Além do mais, a fim de predizer seu efeito funcional, foram utilizados os programas de bioinformática *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) (53), *SNAP* (www.rostlab.org/services/snap/) (54) e o *Mutation taster* (<http://www.mutationtaster.org/>) (55) que foram concordantes ao considerar que a variante alélica p.G52D apresenta provável efeito deletério.

Tabela 6 – Alinhamento filogenético entre $G_s\alpha$ de diferentes espécies com destaque para a conservação da glicina que ocupa a posição 52 na $G_s\alpha$ humana

Espécie	Nome comum	Accession number	Sequência de diferentes $G_s\alpha$
<i>Homo sapiens</i>	Homem	P63092	LLLGAGES G KSTIVKQMR
<i>Bos taurus</i>	Boi	1AZT_B	LLLGAGES G KSTIVKQMR
<i>Mus musculus</i>	Rato	1ZCA_B	LLLGAGES G KSTFLKQMR
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Baiacu	CAG08423	LLLGTGES G KSTFIKQMR
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mosca da fruta	P20353	LLLGAGES G KSTIVKQMK
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Verme	NP_501921	LLLGAGES G KSTILKQMR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Agrião	P18064	LLLGAGES G KSTIFKQIK
<i>Coprinellus congregatus</i>	Cogumelo	P30675	LLLGAGES G KSTVLKQMK
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Ameba	P16051	LLLGAGES G KSTISKQMK

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>.

A nova variante alélica p.X395Gln foi encontrada no paciente 14, que é outro caso esporádico de PHP1a - **Figura 13**. A mesma não foi identificada como variante conhecida pelo *1000 Genomes Project database*. Também não foi considerada SNP ou mutação herdada após seu rastreamento e não detecção em 200 alelos normais e no DNA dos pais, respectivamente. Por estar localizada no códon de parada da $G_s\alpha$, não foi possível a aplicação do *PolyPhen-2* ou *SNAP* para a predição do seu efeito funcional. Apesar do *Mutation taster* a ter considerado como não deletéria, ela causa a troca de

uma timina por uma citosina, em heterozigose, no nucleotídeo 1183 localizado no éxon 13 da $G_s\alpha$ e determina a substituição do códon de parada por uma glutamina. Teoricamente, isto permite a incorporação de mais sete códons ao seu transcrito com consequente alongamento da proteína devido à adição de sete aminoácidos, o que pode perturbar ou prejudicar seriamente a habilidade da $G_s\alpha$ de se acoplar aos GPCRs. Mesmo situada no final da extremidade carboxiterminal da proteína, este mecanismo é possível devido ao códon 395 pertencer ao domínio de interação com o GPCR, além de ser altamente conservado – **Figura 2**. Outras mutações já foram descritas neste domínio (p.Leu388Arg, p.Leu388Pro, p.Tyr391X, p.Glu392Lys e p.Glu392X) e foram provadas como causa de PHP (56, 57). Além do mais, estudos realizados com anticorpos específicos voltados para os últimos 10 aminoácidos da $G_s\alpha$ demonstraram redução da atividade da adenilil ciclase provavelmente por causa da interrupção da interação GPCRs- $G_s\alpha$ (37).

A PCR e o sequenciamento automático da região codificadora da $G_s\alpha$ dos pacientes 10 e 11 (família V) não detectou mutações. Por outro lado, o MLPA mostrou uma redução de cerca de 50% na altura dos picos relativos aos produtos de amplificação das sondas correspondentes à DMR A/B e toda a região codificadora da $G_s\alpha$, indicando uma deleção ampla em heterozigose deste locus. Baseado nos fenótipos e no padrão de herança, a paciente 11 foi classificada como PPHP e seu filho (paciente 10) como PHP1a. Digno de nota, a paciente 11 referia que seu irmão também apresenta braquidactilia, sugerindo que o mesmo também tenha PPHP. Infelizmente, não possuímos o DNA do pai da paciente 11 nem de seu irmão a fim de caracterizá-los como PPHP.

4.1.2. Alterações no padrão de metilação das DMRs do GNAS

Foram realizadas reações de MS-MLPA, para as amostras de DNA dos pacientes 15 ao 29, com o intuito de avaliar o padrão de metilação das DMRs do GNAS.

Quatro padrões distintos e anormais de metilação das DMRs foram obtidos com este método os quais foram classificados conforme numeração arbitrária mencionada na **Figura 6**. Este resultado conduziu ao diagnóstico de PHP1b em todos eles (n = 15) como mostrado na **Tabela 7**.

O padrão de metilação 1 foi encontrado nos pacientes 15 a 17 (famílias VI e VII) e na paciente 18 que foi a única fora de contexto familiar (caso esporádico), visto que sua mãe não apresenta a deleção do *STX16* nem alterações de metilação e a paciente ainda não possui filhos – **Tabela 7** e **Figura 14**. O paciente 17 foi considerado como caso familiar, pois sua mãe apresenta a deleção no *STX16*; entretanto, não exibe a hipometilação da DMR A/B, sendo considerada apenas como carreadora. Em relação às sondas capazes de avaliar o número de cópias do *STX16*, houve redução de sinal das sondas complementares aos éxons 5 e 6, mas manutenção do número de cópias para as demais sondas relacionadas a este gene (éxons 1, 3 e 8). Este padrão é consistente com o AD-PHP1b associado a uma deleção de 3 kb envolvendo os éxons 4, 5 e 6 do *STX16* (27) - **Figura 6**.

Para a confirmação da deleção em heterozigose de 3 kb do *STX16* nestes quatro pacientes e na mãe carreadora, foram realizadas PCRs utilizando-se *primers* flanqueando os éxons 4 e 6 do *STX16* e o DNA genômico dos envolvidos. Após eletroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados, a constatação do padrão em heterozigose (fragmento de 1,3 kb correspondente ao alelo com a deleção e fragmento de 4,3 kb correspondente ao alelo normal) permitiu a confirmação da nossa hipótese. Por sua vez, o padrão em homozigose (amplificação apenas do fragmento de 4,3 kb), apresentado pela mãe da paciente 18, permitiu excluí-la como carreadora desta mesma deleção.

Tabela 7 – Alterações no padrão de metilação das DMRs do *GNAS* e avaliação da deleção do *STX16* em 15 pacientes com PHP1b

Família	Paciente	Diagnóstico	STX16 (deleção 3 kb)	Metilação das DMRs do <i>GNAS</i>				Padrão de metilação**
				NESP55 (m/p)	AS (m/p)	XL α s (m/p)	A/B (m/p)	
VI	15*	PHP1b	Presente	-/CH ₃	CH ₃ /-	CH ₃ /-	-/-	1
VII	17*	PHP1b	Presente	-/CH ₃	CH ₃ /-	CH ₃ /-	-/-	1
	Mãe	Carreadora	Presente	-/CH ₃	CH ₃ /-	CH ₃ /-	CH ₃ /-	Não aplicável
Esporádico	18	PHP1b	Presente	-/CH ₃	CH ₃ /-	CH ₃ /-	-/-	1
Esporádico	19	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	20	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	21	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	22	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	23	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	24	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	25	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	26	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	27	PHP1b	Ausente	CH ₃ /CH ₃	-/-	-/-	-/-	3
Esporádico	28	PHP1b	Ausente	-/CH ₃	-/-	-/-	-/-	6
Esporádico	29	PHP1b	Ausente	-/CH ₃	CH ₃ /-	CH ₃ /-	-/-	7

*Caso índice; m: alelo materno; p: alelo paterno; CH₃: metilado; -: não-metilado. **Na figura 6 (seção Introdução), estão mencionados diferentes padrões de metilação das DMRs do *GNAS* já descritos na literatura que foram numerados arbitrariamente a título de comparação.

Figura 14 – Heredograma da família VI

O padrão de metilação 3 foi observado nos pacientes 19 a 27 como sporPHP1b e não foram caracterizadas deleções no *STX16*. Com o intuito de se saber se o mecanismo responsável por este padrão era por patUPD20q, foi realizada a genotipagem de 11 microssatélites ao redor do locus do *GNAS*. O resultado deste estudo descartou patUPD20q em oito deles e, apenas na paciente 26, não foi possível confirmar patUPD20q porque a paciente é filha adotiva e o DNA de seus pais biológicos não era disponível - **Tabela 8**.

O padrão de metilação 6 foi encontrado apenas na paciente 28, aparentemente uma forma esporádica de PHP1b, já que o DNA de seus pais não estava disponível para o estudo. Por fim, o paciente 29 apresentou o padrão de metilação 7 sem transmissão materna.

Tabela 8 – Genotipagem dos 11 microssatélites em torno do locus do *GNAS* em nove pacientes com PHP1b

Microssatélites	Localização	Paciente 19		Paciente 20		Paciente 21		Paciente 22		Paciente 23		Paciente 24		Paciente 25		Paciente 26		Paciente 27	
D20S117	20p13	170	172	160	174	150	174	170	180	160	170	152	178	172	178	178	178	168	170
D20S889	20p13	97	97	97	105	97	99	97	97	97	97	89	103	89	103	99	99	91	97
D20S115	20p12.3	238	240	238	240	242	242	242	242	240	240	240	240	238	240	242	242	242	248
D20S112	20p12.1	211	225	213	227	221	225	215	227	213	225	221	229	213	225	223	223	223	223
D20S107	20q12	210	214	214	216	210	214	214	216	206	220	212	214	216	218	212	212	210	214
D20S119	20q13.1	109	109	109	109	113	119	109	109	111	119	117	119	109	119	109	109	111	113
D20S178	20q13.1	187	187	185	195	183	189	193	193	181	183	185	189	185	185	183	183	189	191
D20S196	20q13.1	271	283	279	283	287	287	269	275	263	289	279	289	289	289	269	269	287	291
D20S100	20q13.2	220	224	222	222	220	220	222	226	220	224	220	222	220	222	220	220	222	228
D20S171	20q13.3	139	141	139	147	139	141	135	135	139	145	139	141	139	145	139	139	137	143
<i>GNAS</i>	20q13.3																		
D20S173	20q13.3	128	174	176	184	176	178	176	176	178	186	176	178	176	176	186	186	128	174

Tabela 9 – Caracterização fenotípica dos quatro pacientes com PPHP

Família	Paciente	Sexo	Idade ao diagnóstico	Estigmas da AHO	Razão para suspeita clínica
I	3	F	55 anos	Baixa estatura ($Z = -3,4$)	Mãe de dois filhos com PHP
IV	8*	M	2 anos	Ossificações subcutâneas	Fenótipo do paciente e do seu pai
	9	M	30 anos	Braquidactilia e ossificações subcutâneas	Fenótipo do paciente e de seu filho
V	11	F	29 anos	Braquidactilia e baixa estatura ($Z = -2,0$)	Mãe de um filho com PHP

*Caso índice; F: feminino; M: masculino.

4.2. Avaliação fenotípica dos pacientes com PHP e PPHP

A caracterização fenotípica dos quatro pacientes com PPHP encontra-se na **Tabela 9**. As pacientes 3 (família I) e 11 (família V) foram selecionadas devido à presença de outro parente com PHP: pacientes 1 e 2 para a família I e paciente 10 para a família V. Por outro lado, os pacientes 8 e 9 (família IV) foram considerados suspeitos pela presença dos estigmas da AHO, bem como evidência de transmissão paterna (do paciente 9 para o paciente 8). Estes quatro pacientes foram submetidos à avaliação do metabolismo ósseo, que excluiu resistência ao PTH.

A caracterização fenotípica dos pacientes com PHP envolveu diversos aspectos, tais como: descrição dos sinais e sintomas mais marcantes e idade à apresentação inicial, bem como a idade ao diagnóstico (**Tabela 10**); avaliação de calcificações em SNC e de catarata como complicações de hipocalcemia e hiperfosfatemia crônicas (**Tabela 10**); dados antropométricos e características da AHO (**Tabela 11**); perfis de resistência ao PTH (**Tabela 12**) e ao TSH (**Tabela 13**) e seus respectivos tratamentos.

Tabela 10 – Quadro clínico inicial e repercussões crônicas da hipocalcemia e/ou hiperfosfatemia em 25 pacientes com PHP

PHP	Família	Paciente	Sexo	Quadro clínico inicial	Idade (anos)			Calcificações em SNC	Catarata
					SS iniciais	Dx	Atual		
1a	I	1*	M	Convulsão hipocalcêmica	7	16	27	++++	×
		2	F	Convulsão hipocalcêmica	10	19	30	++++	×
	II	4*	F	Parestesia e baixa estatura	12	14	23	+	×
		5	F	Assintomática		1	2	ND	ND
	III	6*	F	Parestesia	18	18	-	+	ND
		7	M	Obesidade e baixa velocidade de crescimento	<1	1,5	-	ND	ND
	V	10*	M	Ossificações subcutâneas	<1	1,8	-	ND	ND
	Esporádico	12	F	Convulsão hipocalcêmica	10	11	19	ND	✓
	Esporádico	13	M	Convulsão febril e ossificações subcutâneas	3	3	7	×	×
	Esporádico	14	M	Convulsão hipocalcêmica	14	16	31	++	×
1b	VI	15*	M	Convulsão hipocalcêmica	10	15	22	++	×
		16	F	Convulsão hipocalcêmica	15	39	45	++++	Cirurgia
	VII	17*	M	Convulsão hipocalcêmica	15	37	41	++++	Cirurgia
		18	F	Mal estar, sonolência e ganho de peso	7	9	10	×	×
	Esporádico	19	M	Câimbras e tetania	10	34	44	++++	Cirurgia
	Esporádico	20	M	Convulsão hipocalcêmica e atraso puberal	12	16	31	++++	✓
	Esporádico	21	F	Câimbras e tetania	5	5	16	+++	×
	Esporádico	22	F	Convulsão hipocalcêmica	3	27	39	++++	✓
	Esporádico	23	F	Parestesia e câimbras	9	23	48	++++	✓
	Esporádico	24	F	Câimbras	12	17	-	+++	ND
	Esporádico	25	M	Convulsão hipocalcêmica	11	11	25	+++	×
	Esporádico	26	F	<i>Genu valgum</i> e dificuldade de aprendizado	11	12	18	++	×
	Esporádico	27	M	Parestesia e câimbras	12	30	32	++	✓
	Esporádico	28	F	Hipocalcemia sintomática durante quadro febril	33	33	36	×	✓
	Esporádico	29	M	Convulsão hipocalcêmica	7	7	12	++	✓

SS: sinais e sintomas; Dx: Diagnóstico; SNC: sistema nervoso central; *caso índice; M: masculino; F: feminino; ✓: presente; ×: ausente.

ND: não disponível; -: pacientes que perderam o acompanhamento.

Tabela 11 – Dados antropométricos e características da osteodistrofia hereditária de *Albright* de 25 pacientes com PHP

PHP	Família	Paciente	Altura (Z)	IMC (kg/m ²)	Características da osteodistrofia hereditária de <i>Albright</i>					
					Face arredondada	Braquidactilia	Ossificações subcutâneas	Retardo mental	Baixa estatura	Obesidade
1a	I	1*	-3,4	22,0	✓	✓	✓	x	✓	x
		2	-3,9	32,4	✓	✓	x	x	✓	✓
	II	4*	-3,7	22,5	x	x	x	x	✓	x
		5	-0,6	[p75]	x	x	x	x	x	x
	III	6*	-3,7	ND	✓	✓	x	x	✓	x
		7	-1,0	[p81]	x	x	x	x	x	x
	V	10*	-0,4	ND	✓	✓	✓	x	x	x
	Esporádico	12	-1,6	38,6	✓	✓	✓	x	x	✓
	Esporádico	13	-0,9	[p95]	✓	✓	✓	✓	x	✓
	Esporádico	14	-1,7	25,2	x	✓	x	x	x	x
1b	VI	15*	-1,8	21,2	✓	x	x	x	x	x
		16	-1,6	25,4	✓	x	x	x	x	x
	VII	17*	-0,7	30,4	✓	x	x	x	x	✓
	Esporádico	18	+0,8	[p96]	✓	✓	x	x	x	✓
	Esporádico	19	-1,8	31,4	✓	x	x	x	x	✓
	Esporádico	20	-1,0	25,8	x	x	x	x	x	x
	Esporádico	21	-0,9	[p85]	✓	x	x	x	x	x
	Esporádico	22	-1,7	28,0	✓	x	x	✓	x	x
	Esporádico	23	-2,5	35,3	✓	x	x	x	✓	✓
	Esporádico	24	-2,5	30,2	✓	x	x	x	✓	✓
	Esporádico	25	+0,3	22,8	x	x	x	x	x	x
	Esporádico	26	-1,1	[p18]	x	✓	x	x	x	x
	Esporádico	27	-1,4	33,6	✓	x	x	x	x	✓
	Esporádico	28	-0,2	27,1	✓	x	x	x	x	x
	Esporádico	29	+2,5	[p81]	✓	x	x	✓	x	x

IMC: índice de massa corpórea; *caso índice; ✓: presente; x: ausente; ND: não disponível. O IMC das crianças está expresso em percentil (p) calculado de acordo com as curvas de crescimento do CDC e os valores estão em colchetes.

Tabela 12 – Perfil de resistência ao PTH ao diagnóstico e tratamento de 25 pacientes com PHP

PHP	Família	Paciente	Antes do tratamento				Após o tratamento				Tratamento			
			Idade (anos)	PTH (pg/mL)	Ca (mg/dL)	Cai (mg/dL)	P (mg/dL)	Idade (anos)	PTH (pg/mL)	Ca (mg/dL)	Cai (mg/dL)	P (mg/dL)	Cálcio (g/d)	Calcitriol (mcg/d)
1a	I	1*	16	478	5,4	3,0	8,1	23	404	9,5	4,6	4,5	1,5	0,75
		2	19	527	7,1	3,7	5,6	26	69	9,8	5,1	4,1	1,5	0,75
	II	4*	14	282	6,8	3,5	8,6	16	43	9,4	5,1	5,7	3	0,5
		5	<1	150	10	5,5	5,9	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	III	6*	18	691	7,6	ND	4,6	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		7	1,5	132	9,7	ND	6,3	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	V	10*	1,8	192	10,2	ND	6,5	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Esporádico	12	11	196	5,1	2,6	10,2	18	108	9,0	4,8	5,7	3	2,25
	Esporádico	13	3	650	7,0	3,5	8,7	4	30	9,6	4,8	5,6	1	0,75
	Esporádico	14	16	220	7,7	3,8	7,5	31	98	8,9	5,1	4,5	3	1,25
1b	VI	15*	15	537	5,1	2,9	7,8	17	61	9,9	5,1	3,9	1	0,5
		16	39	533	4,7	2,6	8,4	42	40	9,2	4,3	4,7	3	1,5
	VII	17*	37	292	6,1	3,1	6,7	38	59	8,7	4,9	4,4	2	0,5
	Esporádico	18	9	756	7,5	4,3	7,9	10	42	9,8	4,6	5,4	2	1
	Esporádico	19	34	161	5,5	3,0	6,6	44	31	9,9	5,2	4,3	3	1,5
	Esporádico	20	16	201	5,5	3,2	8,9	31	65	9,8	4,9	4,4	2	0,75
	Esporádico	21	14	539	8,6	3,5	5,8	15	103	9,4	4,4	4,9	3	1,25
	Esporádico	22	27	433	6,8	4,0	7,4	39	53	9,7	5,1	3,9	1,5	0,5
	Esporádico	23	23	302	6,2	3,7	4,7	46	34	9,7	4,8	4,2	1	0,5
	Esporádico	24	17	433	6,9	3,7	5,5	20	59	9,4	5,1	4,5	2	0,5
	Esporádico	25	11	935	7,2	ND	7,3	25	49	9,8	5,1	3,5	2	0,75
	Esporádico	26	12	836	4,9	2,8	9,4	14	65	9,3	5,1	4,2	1	0,5
	Esporádico	27	30	270	5,6	3,0	5,8	32	33	9,3	5,1	3,7	1,5	0,75
	Esporádico	28	33	1.444	8,5	4,1	4,0	35	88	9,4	5,0	3,3	2	0,25
	Esporádico	29	7	695	4,2	ND	ND	11	46	9,6	4,7	5,7	2	0,75
	VR < 1 ano			16-87	9,0-11,0	4,8-5,5	5,0-10,8		16-87	9,0-11,0	4,8-5,5	5,0-10,8		
	VR 1-2 anos			16-87	9,0-11,0	4,8-5,5	3,4-6,2		16-87	9,0-11,0	4,8-5,5	3,4-6,2		
	VR 2-12 anos			16-87	8,8-10,8	4,8-5,5	3,4-6,2		16-87	8,8-10,8	4,8-5,5	3,4-6,2		
	VR > 12 anos			16-87	8,6-10,2	4,6-5,3	2,7-4,5		16-87	8,6-10,2	4,6-5,3	2,7-4,5		

Dx: Diagnóstico; Ca: cálcio total; Cai: cálcio iônico; P: fósforo; * caso índice; ✖: ausente; ✓: presente; ND: não disponível; VR: valores de referência; a:anos

Tabela 13 – Perfil de resistência ao TSH e tratamento com levotiroxina em 25 pacientes com PHP

PHP	Família	Paciente	Idade (em anos)	TSH (μ U/mL)	T4L (ng/dL)	Ac antitireoidianos	Levotiroxina
1a	I	1*	22	6,6	0,70	x	✓
		2	20	24,4	0,43	✓	✓
	II	4*	21	11,7	0,66	✓	✓
		5	1	6,8	1,29	ND	x
	III	6*	8	Alto	ND	ND	✓
		7	<1	16,6	1,06	x	✓
	V	10*	<1	17,9	1,10	x	✓
	Esporádico	12	12	9,9	0,76	x	✓
	Esporádico	13	0	Triagem neonatal positiva		x	✓
	Esporádico	14	18	10,8	0,82	x	✓
1b	VI	15*	16	7,0	0,85	x	x
		16	42	6,6	0,90	x	x
	VII	17*	38	8,4	0,82	x	✓
		18	8	24,2	0,65	✓	✓
	Esporádico	19	43	4,0	1,27	x	x
	Esporádico	20	28	6,3	1,26	x	x
	Esporádico	21	1	8,0	1,13	x	✓
	Esporádico	22	31	5,8	0,82	x	x
	Esporádico	23	47	7,2	1,23	x	✓
	Esporádico	24	20	4,9	1,00	x	x
	Esporádico	25	23	2,6	1,20	x	x
	Esporádico	26	14	4,3	0,85	x	x
	Esporádico	27	30	6,3	0,99	x	x
	Esporádico	28	33	1,4	0,86	✓	x
	Esporádico	29	7	16,1	0,97	x	✓
			VR < 1 ano	0,8-6,3	0,70-1,50		
			VR 1-5 anos	0,7-6,0	0,70-1,50		
			VR 6-10 anos	0,6-5,4	0,70-1,50		
			VR 11-15 anos	0,5-4,9	0,70-1,50		
			VR 16-20 anos	0,5-4,4	0,70-1,50		
			VR > 20 anos	0,4-4,5	0,70-1,50		

Ac: anticorpos; *caso índice; x: ausente; ✓: presente; ND: não disponível; VR: valores de referência.

4.2.1. Diagnóstico do PHP e avaliação de repercussões da hipocalcemia e/ou hiperfosfatemia crônicas

Nos nossos pacientes com PHP, o sintoma marcante mais frequente à apresentação inicial foi convulsão hipocalcêmica (12/25) iniciando-se com idades entre sete e 15 anos; duas exceções foram os pacientes 13 e 22, os quais tiveram convulsões desde os três anos de idade. Apesar da gravidade do sintoma, apenas cinco de 12 pacientes foram diagnosticados até dois anos após. Surpreendentemente, demorou mais de quatro anos para o diagnóstico dos demais, quatro dos quais tinham uma apresentação familiar (pacientes 1, 2, 15 e 16).

Apenas três pacientes foram diagnosticados antes dos dois anos de idade: a paciente 5 baseada na análise molecular e os pacientes 7 e 10 devido ao fenótipo materno. Notadamente, o diagnóstico da paciente 18 foi realizado apenas pela solicitação acadêmica do perfil do metabolismo ósseo e, na paciente 26, a presença de *genu valgum* foi a pista para investigação de doença do metabolismo ósseo. Na última, o tratamento foi capaz de reverter esta anormalidade provavelmente por ser consequência da ação óssea do PTH.

Considerando-se os casos índices e os esporádicos com PHP1a e PHP1b, a idade mediana à apresentação inicial no grupo de PHP1a foi de 10 anos (intervalo: 0-18) enquanto no grupo de PHP1b foi de 10,5 anos (intervalo: 3-33), não havendo diferença estatística ($p = 0,799$). O mesmo foi observado em relação à idade ao diagnóstico: média de 11,4 anos (IC: 5,4-17,4) para o PHP1a versus média de 19,7 anos (IC: 13,5-26,0) para o PHP1b ($p = 0,079$).

Como quase todos os pacientes submetidos à TC de crânio apresentavam calcificações em SNC, resolvemos classificá-los arbitrariamente de acordo com o número de regiões afetadas. Pacientes com apenas uma região afetada: +, pacientes com duas regiões afetadas: ++, pacientes com três regiões afetadas: +++ e pacientes com quatro ou mais regiões afetadas: ++++ conforme mostrado na **Figura 15**.

Figura 15 – Estratificação de calcificações em SNC

(A) Calcificações apenas em núcleos da base: +. **(B)** Calcificações em núcleos da base e região frontal: ++. **(C)** Calcificações em núcleos da base, região frontal, temporal e cerebelar: ++++.

Dezoito de 21 pacientes analisados tinham calcificações em SNC - **Tabela 10**. Não houve diferença estatística entre os pacientes com PHP1a e PHP1b com relação a este item ($p = 1,000$). O grau de calcificações esteve associado a um diagnóstico tardio e/ou baixa aderência ao tratamento. A TC de crânio da paciente 4 foi realizada ao diagnóstico; um novo exame provavelmente mostrará piora das calcificações, visto que seu perfil do metabolismo ósseo tem evidenciado uma baixa aderência ao tratamento nos últimos anos. A ausência de calcificações em SNC nos pacientes 13 e 18 parece estar associada ao diagnóstico precoce e tratamento adequado; na paciente 28, apesar de um diagnóstico tardio, ela sugere que o período de hipocalcemia crônica não foi prolongado e que sua normofosfatemia deve ter sido um fator protetor.

A presença de catarata ou antecedente de cirurgia para catarata ocorreu em 50% (10/20) dos casos de PHP e foi relacionada a um diagnóstico tardio e baixa aderência ao tratamento e alto grau de calcificações em SNC - **Tabela 10**. Apesar de a catarata ter sido mais frequente no grupo do PHP1b (9/14) do que no grupo do PHP1a (1/6), apenas uma tendência favorável ao PHP1b foi observada ($p = 0,141$). É importante mencionar que todos os pacientes têm menos de 50 anos, idade em que a catarata não é comum.

4.2.2. Estigmas da AHO

Analisando cada estigma da AHO separadamente, encontrou-se a seguinte distribuição: face arredondada em 18 pacientes (6 PHP1a vs 12 PHP1b, $p = 0,378$); braquidactilia em 9 pacientes (7 PHP1a vs 2 PHP1b, $p = 0,009$); ossificações subcutâneas em 4 pacientes (todos PHP1a, $p = 0,017$); retardo mental em 3 pacientes (1 PHP1a vs 2 PHP1b, $p = 1,000$); baixa estatura em 6 pacientes (4 PHP1a vs 2 PHP1b, $p = 0,046$), que já havia atingido a estatura final e, finalmente, obesidade foi observada em 9 pacientes (3 PHP1a vs 6 PHP1b, $p = 1,000$) – **Tabela 11**. Por conseguinte, braquidactilia, ossificações subcutâneas e baixa estatura foram os estigmas da AHO que se mostraram estatisticamente diferentes entre PHP1a e PHP1b, sendo mais frequentes no primeiro grupo.

De acordo com o diagnóstico clínico de AHO que leva em conta a presença de, pelo menos, duas das seis manifestações da AHO (46), seis de 10 pacientes com PHP1a e oito de 15 pacientes com PHP1b apresentavam este diagnóstico. A comparação entre os grupos de PHP1a e PHP1b não mostrou diferença estatística ($p = 1,000$) quanto a este quesito.

4.2.3. Resistência ao PTH

Todos os 25 pacientes com PHP tiveram níveis elevados de PTH ao diagnóstico - **Tabela 12**. Até mesmo a paciente 5, que era assintomática e teve seu diagnóstico realizado após a detecção da mutação no *GNAS* aos primeiros meses de vida, tinha níveis elevados de PTH porém com cálcio e fósforo normais. Além dela, os pacientes 7 e 10 também eram normocalcêmicos ao diagnóstico entretanto já apresentavam hiperfosfatemia - **Tabela 12**. Em relação ao paciente 7, seu diagnóstico precoce foi possível porque sua mãe (paciente 6) já tinha o diagnóstico de PHP e, em relação ao paciente 10, foi baseado na história de estigmas da AHO em sua mãe (paciente 11), tio e avô maternos.

Na paciente 28, a presença de níveis elevados de PTH, hipocalcemia, normofosfatemia e níveis de 25OHD > 30 ng/mL levaram ao diagnóstico de hiperparatireoidismo secundário - **Tabela 12**. Contudo, a ausência de sinais de ação óssea do PTH (densidade mineral óssea e marcadores de remodelação óssea normais), ingestão dietética de cálcio suficiente sem histórico de má absorção intestinal e face arredondada foram as razões para suspeitarmos que esta paciente pudesse ter PHP, diagnóstico possível apenas em decorrência do estudo molecular do GNAS - **Tabela 7**.

Não houve diferença estatística entre PHP1a e PHP1b relacionada às medidas de PTH ao diagnóstico (mediana = 251 vs 533 pg/mL; $p = 0,062$).

Uma vez que os valores de cálcio sérico total (Ca), cálcio iônico (Cai) e fósforo (P) variam de acordo com a idade (**Tabela 12**), a fim de se comparar estes dados obtidos ao diagnóstico dos pacientes com PHP1a vs PHP1b, os mesmos foram convertidos de variáveis quantitativas a qualitativas. A presença de níveis de: Ca baixos ($p = 0,052$), Cai baixos ($p = 0,350$) e P elevados ($p = 1,000$) ao diagnóstico de PHP não foi estatisticamente suficiente para diferenciar os grupos de PHP1a e PHP1b. Apesar de a presença de níveis baixos de Ca mostrar uma tendência a ser mais frequente no grupo de PHP1b, é necessário destacar o viés dos níveis normais de Ca nos pacientes 5, 7 e 10 (grupo do PHP1a) que tiveram um diagnóstico precoce devido à apresentação familiar.

Na **Tabela 12**, estão descritas as doses mínimas de cálcio elementar (fornecido sob a forma de carbonato de cálcio) e calcitriol administradas aos pacientes com PHP para a normalização dos níveis de PTH, Ca, Cai e P. Catorze de 21 pacientes atingiram este objetivo utilizando doses de cálcio elementar entre 1 a 3 g/dia e calcitriol entre 0,5 e 1,5 mcg/dia. Os outros pacientes necessitaram de quantidades semelhantes das medicações, exceto a paciente 12 que precisou de 2,25 mcg/dia de calcitriol devido a uma péssima aderência ao tratamento. Enquanto em alguns pacientes (4 e 16), a normalização do PTH precedeu a correção da hiperfosfatemia; em outros (pacientes 1, 14 e 28), a normofosfatemia ocorreu antes da normalização do

PTH. Notadamente, o paciente 1 nunca atingiu valores normais de PTH mesmo após normalização dos níveis de Ca e P. Neste caso, é difícil dizer se o aumento de PTH é apenas secundário à má aderência ao tratamento ou se há autonomia das paratireoides; contudo o mesmo não apresentou hipercalcemia até o momento.

4.2.4. Resistência ao TSH

Na **tabela 13**, estão catalogados os maiores valores de TSH e os menores valores de T4L para cada paciente e a idade correspondente à época das mensurações e/ou ao início do tratamento. Os Ac antitireoidianos foram avaliados devido ao fato de hipotireoidismo autoimune ser a causa mais comum de elevação do TSH. As pacientes 2, 4 e 18 apresentaram Ac positivos e sinais ultrassonográficos de tireoidite, sugerindo autoimunidade como a razão do hipotireoidismo; contudo, isto não exclui um componente de resistência ao TSH.

Em seis dos 25 pacientes (pacientes 6, 7, 10, 13, 18 e 21), o hipotireoidismo foi diagnosticado e tratado antes do diagnóstico do PHP, todos eles antes dos oito anos de idade (o paciente 13 durante a triagem neonatal) e apenas a paciente 18 possuía sinais óbvios de hipotireoidismo. Em outros seis pacientes (pacientes 1, 12, 14, 17, 23 e 29), níveis elevados de TSH foram detectados após o diagnóstico de PHP e a reposição de levotiroxina foi indicada por conta da manutenção de níveis elevados de TSH e/ou T4L próximos ao limite inferior da normalidade.

Sete pacientes (pacientes 5, 15, 16, 20, 22, 24 e 27) tiveram ao menos um valor elevado de TSH, mas não necessitaram de reposição de levotiroxina devido à redução ou normalização dos níveis de TSH e permanecem sob vigilância. Apenas quatro pacientes (pacientes 19, 25, 26 e 28) nunca apresentaram níveis elevados de TSH durante o acompanhamento, inclusive a paciente 28 que possui Ac antitireoidianos positivos, que podem ser encontrados em até um terço dos indivíduos eutireoidianos (58).

Com o intuito de comparar os grupos de PHP1a e PHP1b quanto à resistência ao TSH, à semelhança do que foi feito para os valores de Ca, Cai e P, também convertimos a variável quantitativa “valores de TSH” em variável qualitativa “presença de TSH normal” e não encontramos diferença estatística: PHP1a (0/8) vs PHP1b (4/14); $p = 0,254$.

4.2.5. Outras resistências hormonais

O perfil hormonal do paciente com resistência ao hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) assemelha-se à deficiência do hormônio do crescimento (GH) cursando com níveis baixos do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (59, 60).

Na faixa etária pediátrica, nossa avaliação levou em consideração a estatura do paciente, sua velocidade de crescimento e, em princípio, dosagens basais de GH e IGF-1. Das seis crianças/adolescentes que estão em acompanhamento, nenhuma apresentou baixa estatura até o momento nem valores de IGF-1 reduzidos.

Na faixa etária adulta, nossa avaliação restringiu-se à medida da estatura final e dosagens basais de GH e IGF-1. De acordo com estes parâmetros, apenas a paciente 23 apresentou valores de IGF-1 no limite inferior da normalidade ou reduzidos (68, 71 e 114 ng/mL; VR: 91–261 ng/mL); e baixa estatura ($Z = -2,5$), podendo ser compatível com resistência ao GHRH.

Em relação à resistência às gonadotrofinas, destacamos os achados a seguir. A paciente 12 relatava desenvolvimento espontâneo dos caracteres sexuais secundários com menarca aos 11 anos. No entanto, aos 19 anos, foram flagrados: níveis de gonadotrofinas altos (LH = 42,1 e 43,8 U/L; FSH = 53,9 e 54,1 U/L), valores baixos de estradiol (< 15 e 19,3 pg/mL) com inibina B normal, sugerindo resistência hormonal, mas na vigência de hipocalcemia. Como a mesma tem uma aderência muito ruim e falta às consultas com frequência, não sabemos se este perfil de resistência persistirá após a normalização da calcemia.

Por sua vez, a paciente 16 referia três gestações (**Figura 14**) sem intercorrências e períodos de amenorreia antes do diagnóstico de PHP provavelmente associados à hipocalcemia. Notadamente, seus ciclos menstruais tornaram-se regulares após a obtenção de normocalcemia. Sua última avaliação foi aos 43 anos de idade, quando estava normocalcêmica e exibia níveis normais de gonadotrofinas, estradiol e inibina B.

Apenas um paciente do sexo masculino (paciente 17) apresentou níveis normais de testosterona com valores de LH oscilando de normal a elevado (7,4 a 13,4 U/L; VR: até 8,4 U/L) na vigência de normocalcemia.

Finalmente, o paciente 20 procurou atendimento médico para puberdade atrasada aos 16 anos e o mesmo já apresentava convulsões hipocalcêmicas desde os 12 anos de idade. Após o diagnóstico de PHP e início do tratamento, ele desenvolveu a puberdade adequadamente sem a necessidade de tratamento específico; seus níveis de gonadotrofinas eram normais e de testosterona aumentaram de acordo com o desenvolvimento puberal.

5.DISSCUSSÃO

5.1. Avaliação genotípica dos pacientes com PHP e PPHP

Este estudo permitiu a determinação da base molecular dos pacientes com PPHP e a classificação de 10 pacientes como PHP1a e de 15 pacientes como PHP1b baseado nos defeitos moleculares - **Tabelas 5 e 7**.

No primeiro grupo (PPHP/PHP1a), foram encontradas oito mutações diferentes na região codificadora da $G_s\alpha$: p.Gly52Asp (éxon 2); c.312+5G>A (íntron 4); p.Ile106Thr (éxon 5); p.Asp189MetfsX14 (éxon 7); p.Gln236X (éxon 9); p.Gln267ArgfsX4 (éxon 10); p.X395Gln (éxon 13) e finalmente, uma ampla deleção acometendo a DMR A/B e toda a região codificadora da $G_s\alpha$ - **Tabela 5**.

Em revisão recente, *Lemos e Thakker* relatam que já foram descritas 176 mutações distintas espalhadas por toda região codificadora da $G_s\alpha$, justificando um estudo completo desta região (61). *Elli et al.* (52), com base no resultado de 128 mutações descritas na região codificadora da $G_s\alpha$, relataram que o éxon 1 é o sítio mais frequente de mutações no *GNAS*, abrigando 16% de todas as mutações, seguido pelo éxon 10 (13%), éxon 13 (11%) e éxons 4 e 5 (9% cada); no nosso trabalho, não foram encontradas mutações nos éxons 1 e 4.

De acordo com o mecanismo de mutação, foram encontradas: duas mutações em *frameshift* causadas por deleção (25%), duas mutações *missense* (25%), uma mutação *nonsense* (12,5%), uma mutação em sítio de *splicing* (12,5%), uma mutação de perda do códon de parada (12,5%) e uma deleção ampla (12,5%). De todas estas, apenas a perda do códon de parada foi reconhecida como causa de PHP1a pela primeira vez.

Os pacientes 1, 2 e 3 (família I) apresentam a mutação c.565_568delGACT ou p.Asp189MetfsX14, que é a única já relatada em diversos pacientes com AHO de diferentes populações (16), inclusive alguns

autores consideram o éxon 7 como uma região de *hot spot* (16, 52, 62). Esta mutação envolve a deleção de quatro nucleotídeos nos códons 189 e 190, resultando em um *frameshift*, na formação de um códon de parada prematuro no códon 202 e em uma redução na expressão do RNAm do alelo mutado (16). Os achados fenotípicos decorrentes desta mutação já descritos na literatura são bastante variáveis, há relatos de casos incluindo uma paciente com ganho excessivo de peso desde o primeiro mês de vida com subsequente surgimento de nódulos subcutâneos aos três meses e hipotireoidismo leve aos seis meses (63); uma paciente portadora de PPHP e braquidactilia (16); além de vários pacientes com o quadro de AHO bem característico (16, 49).

A mutação c.312+5G>A, encontrada na família II (pacientes 4 e 5), foi descrita em 2008 em um paciente francês do sexo masculino, que apresentava baixa estatura, braquidactilia e retardo mental (50). Estes casos, assim como os anteriores, ilustram que um mesmo genótipo pode apresentar ampla variabilidade fenotípica.

Poucos artigos identificaram deleções amplas como responsáveis pela etiologia do PPHP/PHP1a. *Fernandez-Rebollo et al.* (64) descreveram uma deleção que se estendia desde a região intrônica entre os éxons XLas e A/B (região regulatória do *GNAS*) até o íntron 5 (região codificadora da $G_s\alpha$), resultando numa perda aparente da metilação da DMR A/B e os autores chamam a atenção para um potencial erro diagnóstico como PHP1b. Analogamente ao paciente de *Fernandez-Rebollo*, o paciente 10 poderia ser erroneamente diagnosticado como PHP1b. Por sua vez, *Mitsui et al.* (65) localizaram uma deleção maior de 850 kb englobando todo o locus do *GNAS* (incluindo ambas as regiões regulatória e codificadora) e outros oito genes: um à montante e sete à jusante do locus do *GNAS*. Mais recentemente, *Cho et al.* (66) descreveram outra deleção ampla restrita a toda a região codificadora da $G_s\alpha$ em um paciente coreano, tal como a família V que tem ascendência coreana. Em todos estes casos, bem como na família V (pacientes 10 e 11), deleções amplas em heterozigose podem passar

despercebidas ao utilizarmos PCR e sequenciamento automático visto que o alelo não afetado é amplificado normalmente. Por esta razão, optou-se pela realização do MLPA como um método adicional capaz de detectar deleções amplas.

No segundo grupo (PHP1b), nós identificamos quatro padrões distintos e anormais de metilação das DMRs do *GNAS* – **Tabela 7**.

Quatro pacientes (pacientes 15, 16, 17 e 18) apresentaram o padrão de metilação 1 referente à perda isolada de metilação no éxon A/B e associada à deleção de 3 kb no *STX16* que é de transmissão materna. À semelhança de um caso descrito em 2007 por *Mantovani et al.* (67), nossa paciente 18 trata-se de um caso aparentemente esporádico, por não ter herdado a deleção do *STX16* de sua mãe mas possui 50% de chance de transmitir o PHP1b para a sua prole.

Por sua vez, o padrão de metilação 3 poderia ser explicado por patUPD20q (32) a qual pode ser a causa de PHP1b na paciente 26, mas não nos demais oito pacientes de acordo com a análise dos microssatélites - **Tabela 8**. Outros mecanismos genéticos responsáveis pelo padrão de metilação 3 e pelos demais padrões de metilação 6 e 7 não puderam ser desvendados por este estudo, o que impede a predição sobre a herança; esforços neste sentido têm sido realizados (68).

5.2. Avaliação fenotípica dos pacientes com PHP e PPHP

O presente trabalho consistiu na avaliação fenotípica e molecular de 25 pacientes com PHP e quatro pacientes com PPHP.

Em todos os nossos pacientes com PPHP, foi possível a determinação do defeito na $G_s\alpha$ envolvido. Nas pacientes 3 e 11, a presença de um familiar com PHP1a foi essencial para o diagnóstico correto de PPHP. Por outro lado, os pacientes 8 e 9 (família IV) foram considerados suspeitos devido à presença dos estigmas de AHO bem como pela evidência de transmissão paterna (do paciente 9 para o paciente 8). Entretanto, deve-se

ênfatizar que apenas a presença de um ou dois estigmas de AHO sem a resistência ao PTH e sem um familiar com PHP1a é um critério fraco para a indicação do estudo molecular do *GNAS*. Isto ocorre porque os estigmas da AHO podem ser encontrados em muitas outras síndromes, tais como a síndrome braquidactilia retardo mental (ou síndrome AHO-símile) e a acrodisostose (69).

Apesar da classificação dos pacientes em PHP1a e PHP1b baseada nos defeitos moleculares no *GNAS*, não se detectou correlação com a idade à apresentação inicial ($p = 0,799$) nem com a idade ao diagnóstico ($p = 0,079$) quando se compararam apenas os casos índices e os esporádicos dos dois grupos (7 com PHP1a vs 14 com PHP1b); contudo, houve uma tendência para um diagnóstico mais tardio no PHP1b.

Na maioria dos pacientes de ambos os grupos, os sinais e sintomas mais marcantes começaram antes dos 15 anos de idade e, apesar de todos os pacientes com PHP1a terem sido diagnosticados antes dos 19 anos, sete dos 15 pacientes com PHP1b foram diagnosticados após os 19 anos. Ao contrário da literatura, onde as diferenças na idade ao diagnóstico são usualmente atribuídas à gravidade da doença (46), no nosso contexto, acreditamos que o baixo *status* socioeconômico dos pacientes e médicos despreparados para reconhecer esta doença rara são as razões principais para o longo tempo entre as manifestações iniciais e o diagnóstico de PHP.

Calcificações em SNC e catarata são classicamente mencionadas tanto em PHP como em hipoparatiroidismo relacionadas ao curso insidioso da doença, diagnóstico tardio e/ou baixa adesão ao tratamento (70) como demonstrado nos nossos pacientes - **Tabela 10**. Curiosamente, não se observou a presença de catarata nos pacientes 1 e 2 (PHP1a), os quais tiveram um diagnóstico tardio, além de apresentarem baixa aderência ao tratamento e alto grau de calcificações em SNC. Adicionalmente, catarata foi encontrada em três pacientes com PHP1b que tinham baixo grau (pacientes 27 e 29) ou ausência de calcificações em SNC (paciente 28). Estas observações sugerem que o mecanismo das calcificações em SNC e da

catarata deve envolver outros aspectos além da hipocalcemia e hiperfosfatemia crônicas.

Como observado por outros autores (40-42, 71), na nossa casuística, a classificação de PHP1a e PHP1b baseada nos defeitos moleculares no *GNAS* resultou numa sobreposição clínica das características da AHO visto que elas estão presentes em ambos os grupos. Mesmo quando a presença de qualquer característica da AHO é substituída pelo diagnóstico clínico da AHO, nenhum destes critérios foi suficiente para prever a base molecular do PHP - **Tabelas 5, 7 e 11**.

Além disso, características como a obesidade podem mudar ao longo da vida e a baixa estatura pode mudar ao longo do desenvolvimento. Além do mais, a baixa estatura pode ser listada como característica da AHO inclusive no PPHP (sem resistência hormonal) bem como ser resultante da resistência ao GHRH. Das seis crianças/adolescentes (até 18 anos) sob nosso acompanhamento médico, nenhuma apresenta baixa estatura, porém quatro delas (pacientes 13, 18, 21 e 29) têm avanço da idade óssea que potencialmente pode resultar em baixa estatura na idade adulta. Notadamente, a queixa da paciente 4 (mãe da paciente 5) ao procurar assistência médica foi baixa estatura. Quando esta paciente tinha 14 anos de idade, sua idade óssea era compatível com 17 anos. Este fato já foi mencionado na literatura em pacientes com PHP, explicando porque a baixa estatura é mais prevalente em adultos em comparação com as crianças (59). Portanto, a fusão prematura das epífises dos ossos longos e a ausência do estirão puberal podem contribuir para a baixa estatura na idade adulta (63).

Dos estigmas da AHO, face arredondada foi o achado mais frequente na nossa casuística, acometendo 18 dos 25 pacientes com PHP, não tendo sido encontrada nos pacientes com PPHP. Entretanto, trata-se de uma característica subjetiva e inespecífica que pode estar presente na população normal e em várias síndromes genéticas (21).

Por outro lado, a coexistência de ossificações subcutâneas e braquidactilia é muito mais específica da AHO (21) e esteve pouco presente na nossa casuística (16% dos pacientes com PHP e 25% com PPHP) – **Tabelas 9 e 11**. Não foram encontradas ossificações subcutâneas nos nossos pacientes com PHP1b, o que causou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de PHP1a e PHP1b ($p = 0,017$). Braquidactilia foi encontrada em 9 pacientes com PHP (7 PHP1a vs 2 PHP1b, $p = 0,009$), sendo encontrada apenas nos pés da paciente 2, fato que chama a atenção para a importância do exame dos pés e não só das mãos dos pacientes com PHP e PPHP. Outro fato digno de nota, é que a braquidactilia encontrada nos pacientes com PPHP e PHP1a foi logo detectada ao exame clínico (achado clínico visual) ao passo que a braquidactilia detectada nas duas pacientes com PHP1b foi um achado radiológico (sinal do metacarpiano positivo), que passaria despercebido apenas ao exame físico. Portanto, na nossa casuística, a braquidactilia foi um achado estatisticamente mais comum nos pacientes com PHP1a ($p = 0,009$) e aparentemente mais grave nestes mesmos pacientes em relação aos pacientes com PHP1b.

O primeiro parâmetro alterado na resistência ao PTH é a elevação dos seus níveis. Tipicamente, hipocalcemia e hiperfosfatemia não estão presentes até os cinco anos de idade, porém a elevação dos níveis de PTH pode ser documentada anteriormente (18). Este aumento nos níveis de PTH num estágio precoce e “latente” da doença pode apontar para uma perturbação na regulação da secreção do PTH no PHP. Sua causa é uma questão de especulação, os níveis elevados de PTH podem ter resultado de quedas pequenas e não observáveis da concentração sérica de cálcio (72). Na série de pacientes apresentada por *Donghi et al.*, as alterações do metabolismo ósseo só apareceram após os 10 anos de idade. Assim, estes autores afirmam que as manifestações clínicas iniciais podem estar relacionadas à hipocalcemia grave levando a convulsões ou síncope, e que a hipocalcemia pode tornar-se clinicamente evidente apenas durante o estirão puberal, quando as necessidades de cálcio são maiores (73). Na

nossa casuística, a paciente 5 teve o diagnóstico com menos de um ano de idade e ainda não apresenta hipocalcemia nem hiperfosfatemia, apesar de níveis elevados de PTH, o que está de acordo com o exposto acima. Mais três pacientes tiveram o diagnóstico antes dos cinco anos de idade (pacientes 7, 10 e 13); destes, apenas o paciente 13 já apresentava hipocalcemia e hiperfosfatemia aos três anos. Os pacientes 7 e 10 ainda eram normocalcêmicos apesar de já apresentarem hiperfosfatemia e níveis elevados de PTH. Mais três pacientes (pacientes 18, 21 e 29) tiveram o diagnóstico antes dos 10 anos de idade e estes já apresentavam o perfil completo de resistência ao PTH (hipocalcemia, hiperfosfatemia e elevação dos níveis de PTH). Vale a pena destacar que, dentre estes sete pacientes diagnosticados com menos de 10 anos, apenas os pacientes 21 e 29 apresentaram sintomas hipocalcêmicos (**Tabela 10**), os pacientes 10 e 13 apresentaram ossificações subcutâneas, que não são manifestações hipocalcêmicas, mas podem ser a pista para o diagnóstico de PHP1a na infância (63). Todos os pacientes diagnosticados após os 10 anos de idade apresentaram manifestações hipocalcêmicas, com exceção da paciente 26.

O objetivo do tratamento do PHP é a normalização dos níveis de cálcio e fósforo, visando minimizar a ocorrência de complicações como calcificações em SNC e catarata. Recomenda-se ainda a normalização dos níveis de PTH, mesmo que o paciente já esteja normocalcêmico, a fim de protegê-lo contra a perda óssea causada pelo excesso de PTH nos casos sem resistência óssea ao PTH, além de se evitar a autonomia das paratireoides (23, 74, 75). Na nossa casuística, o primeiro parâmetro a se normalizar com o uso de cálcio e calcitriol foi a calcemia levando a uma melhora rápida dos sintomas. Já a correção dos níveis de fósforo e PTH demandou mais tempo e uma boa aderência ao tratamento.

Os pacientes portadores de PHP podem apresentar uma resistência ao TSH que cursa com níveis de TSH discreta ou moderadamente elevados, níveis de T4L no limite inferior da normalidade ou reduzidos, Ac antitireoidianos negativos e ausência de bócio (15). De acordo com *Liu et al.*,

valores de TSH superiores a 10 $\mu\text{U/mL}$ são mais consistentes com o diagnóstico de PHP1a, ao passo que valores inferiores a 10 $\mu\text{U/mL}$ podem estar presentes tanto em casos de PHP1a como de PHP1b (15).

Na nossa casuística, 18 dos 25 pacientes (pacientes 1, 5 – 7, 10, 12 – 17, 20 – 24, 27 e 29) com PHP foram caracterizados como portadores de hipotireoidismo por resistência ao TSH (perfil laboratorial compatível e Ac antitireoidianos negativos).

A paciente 2 iniciou o quadro de hipotireoidismo sem a positividade dos Ac antitireoidianos, porém a mesma já apresentava alteração textural da tireoide ao ultrassom e evoluiu com positividade dos Ac apenas 10 anos após a alteração inicial da função tireoidiana. Já no caso das pacientes 4 e 18, o diagnóstico de hipotireoidismo tem um componente claro de autoimunidade uma vez que ambas apresentam positividade dos Ac antitireoidianos, alteração textural da tireoide e hipotireoidismo franco; entretanto, isto não exclui um componente de resistência ao TSH nestas três pacientes.

Nossos achados foram concordantes com a observação de *Liu et al.*, exceto pelo paciente 29 que é portador de PHP1b e apresentou níveis de TSH acima de 10 $\mu\text{U/mL}$. As únicas pacientes a apresentar hipotireoidismo franco tinham um componente de autoimunidade (pacientes 2, 4 e 18). Apenas dois pacientes (pacientes 1 e 12), sem componente de autoimunidade, tiveram a dosagem de T4L no limite inferior da faixa da normalidade (valores entre 0,70 e 0,80 ng/dL) e ambos eram portadores de PHP1a.

Hipotireoidismo congênito já foi reportado como a manifestação inicial do PHP (76-78), tal como no nosso paciente 13. Além do paciente 13, outros cinco pacientes (pacientes 6, 7, 10, 18 e 21) tiveram um diagnóstico de hipotireoidismo anterior ao diagnóstico de PHP. Estes casos ilustram que a apresentação inicial do PHP não necessariamente deve envolver alterações do metabolismo de cálcio e fósforo (resistência ao PTH), mas podem ser resultado de outras resistências hormonais (52).

A elevação do TSH em algum momento do acompanhamento do PHP é muito comum (84% dos nossos pacientes), mas não são todos os pacientes que necessitam de tratamento. O melhor momento para se iniciar a reposição de levotiroxina, quando o T4L ainda é normal, está aberto para discussão. De qualquer forma, são indicadas as mensurações de TSH e T4L como parte do monitoramento dos pacientes com PHP.

Hipogonadismo em decorrência de resistência gonadal no PHP é extremamente variável e tem sido pouco explorado, tanto em homens quanto em mulheres. Quando há a sua presença, geralmente se manifesta por maturação sexual atrasada ou incompleta, amenorreia ou oligomenorreia e/ou infertilidade (79). Na nossa casuística, consideração especial foi dada a este tópico e, embora tenhamos detectado pacientes com gonadotrofinas elevadas, nenhum deles precisou de reposição hormonal. Também nos chamou a atenção o fato de, apesar da documentação de resistência às gonadotrofinas após o diagnóstico de PHP, a paciente 16 não ter tido dificuldade para engravidar mesmo sem tratamento para o PHP.

6.CONCLUSÕES

Quanto ao genótipo dos 29 pacientes diagnosticados com PHP e PPHP da nossa casuística:

- Embora nenhuma das classificações do PHP (fenótipo vs genótipo) tenha sido capaz de prever a gravidade ou o curso clínico da doença, encorajamos a classificação baseada nos achados moleculares, uma vez que é mais informativa.
- As técnicas de biologia molecular empregadas permitiram o reconhecimento de 14 casos de PHP1a/PPHP, nos quais foram identificadas oito mutações envolvendo a região codificadora da G_{α} , sendo cinco inéditas, o que contribuiu para aumentar o espectro de mutações detectadas no *GNAS*.
- Ainda que restrita a centros de pesquisa, a identificação de anormalidades no *GNAS*, quando as mesmas determinam a causa do PHP, permite o rastreamento de outros casos familiares e aconselhamento genético para a família dos doentes com PHP1a, PPHP e AD-PHP1b.
- O reconhecimento de padrões anormais de metilação nas DMRs levou ao diagnóstico de PHP1b em 15 pacientes, tendo sido essencial para o diagnóstico da paciente 28, que tinha o perfil do metabolismo ósseo inconclusivo. Além disto, permitiu o diagnóstico correto de oito pacientes com PHP1b, que talvez tivessem sido classificados como PHP1a baseando-se apenas no diagnóstico clínico da AHO, levando a uma potencial falha no aconselhamento genético.

Em relação aos achados fenotípicos dos 25 pacientes diagnosticados com PHP da nossa casuística:

- O diagnóstico tardio bem como a má aderência ao tratamento contribuiu para o desenvolvimento de complicações crônicas do PHP tais como as calcificações em SNC e a catarata.
- A ausência de calcificações em SNC foi rara e pareceu estar relacionada à precocidade do diagnóstico e seu devido tratamento.
- Depois da resistência ao PTH, a resistência ao TSH foi a segunda resistência hormonal mais observada, devendo ser investigada sempre.
- O tratamento adequado do PHP compreende a normalização dos níveis de cálcio e fósforo, bem como dos níveis de PTH, visando à prevenção de complicações da hipocalcemia/hiperfosfatemia crônicas e à proteção contra os efeitos deletérios do PTH no osso, e impedindo a autonomia das paratireoides.

7.REFERÊNCIAS

1. Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med*. 1999 Apr 1;340(13):1012-20.
2. Hauache OM. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. [Revisão]. 2001 junho 2001;45(3):228-39.
3. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocr Rev*. 2001 Oct;22(5):675-705.
4. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Feb;7(2):79-94.
5. Tuteja N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav*. 2009 Oct;4(10):942-7.
6. Weinstein LS, Xie T, Zhang QH, Chen M. Studies of the regulation and function of the Gs alpha gene Gnas using gene targeting technology. *Pharmacol Ther*. 2007 Aug;115(2):271-91.
7. Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004 Dec;145(12):5459-64.
8. Lania A, Mantovani G, Spada A. G protein mutations in endocrine diseases. *Eur J Endocrinol*. 2001 Nov;145(5):543-59.
9. Bastepe M. The GNAS Locus: Quintessential Complex Gene Encoding Gsalpha, XLalphas, and other Imprinted Transcripts. *Curr Genomics*. 2007 Sep;8(6):398-414.
10. Bastepe M, Juppner H. GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res*. 2005;63(2):65-74.
11. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet*. 1997;31:493-525.
12. Linglart A, Gensure RC, Olney RC, Juppner H, Bastepe M. A novel STX16 deletion in autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib

redefines the boundaries of a cis-acting imprinting control element of GNAS. *Am J Hum Genet.* 2005 May;76(5):804-14.

13. Bastepe M, Juppner H. Editorial: Pseudohypoparathyroidism and mechanisms of resistance toward multiple hormones: molecular evidence to clinical presentation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Sep;88(9):4055-8.

14. Liu J, Chen M, Deng C, Bourc'his D, Nealon JG, Erlichman B, et al. Identification of the control region for tissue-specific imprinting of the stimulatory G protein alpha-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 12;102(15):5513-8.

15. Liu J, Erlichman B, Weinstein LS. The stimulatory G protein alpha-subunit Gs alpha is imprinted in human thyroid glands: implications for thyroid function in pseudohypoparathyroidism types 1A and 1B. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Sep;88(9):4336-41.

16. De Sanctis L, Romagnolo D, Olivero M, Buzi F, Maghnie M, Scire G, et al. Molecular analysis of the GNAS1 gene for the correct diagnosis of Albright hereditary osteodystrophy and pseudohypoparathyroidism. *Pediatr Res.* 2003 May;53(5):749-55.

17. Maeda SS, Fortes EM, Oliveira UM, Borba VC, Lazaretti-Castro M. Hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Aug;50(4):664-73.

18. Levine MA. Pseudohypoparathyroidism: from bedside to bench and back. *J Bone Miner Res.* 1999 Aug;14(8):1255-60.

19. Rose B, Post T. Chapter 6F: Hormonal regulation of calcium and phosphate balance. *Up to Date.* 2009.

20. Sohn HE, Furukawa Y, Yumita S, Miura R, Unakami H, Yoshinaga K. Effect of synthetic 1-34 fragment of human parathyroid hormone on plasma adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) concentrations and the diagnostic criteria based on the plasma cAMP response in Ellsworth-Howard test. *Endocrinol Jpn.* 1984 Feb;31(1):33-40.

21. Mantovani G, Elli FM, Spada A. GNAS epigenetic defects and pseudohypoparathyroidism: time for a new classification? *Horm Metab Res.* 2012 Sep;44(10):716-23.

-
22. Murray TM, Rao LG, Wong MM, Waddell JP, McBroom R, Tam CS, et al. Pseudohypoparathyroidism with osteitis fibrosa cystica: direct demonstration of skeletal responsiveness to parathyroid hormone in cells cultured from bone. *J Bone Miner Res.* 1993 Jan;8(1):83-91.
 23. Ish-Shalom S, Rao LG, Levine MA, Fraser D, Kooh SW, Josse RG, et al. Normal parathyroid hormone responsiveness of bone-derived cells from a patient with pseudohypoparathyroidism. *J Bone Miner Res.* 1996 Jan;11(1):8-14.
 24. Mantovani G, Bondioni S, Locatelli M, Pedroni C, Lania AG, Ferrante E, et al. Biallelic expression of the Gsalpha gene in human bone and adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec;89(12):6316-9.
 25. Michienzi S, Cherman N, Holmbeck K, Funari A, Collins MT, Bianco P, et al. GNAS transcripts in skeletal progenitors: evidence for random asymmetric allelic expression of Gs alpha. *Hum Mol Genet.* 2007 Aug 15;16(16):1921-30.
 26. Liu J, Litman D, Rosenberg MJ, Yu S, Biesecker LG, Weinstein LS. A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type 1b. *J Clin Invest.* 2000 Nov;106(9):1167-74.
 27. Bastepe M, Frohlich LF, Hendy GN, Indridason OS, Josse RG, Koshiyama H, et al. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS. *J Clin Invest.* 2003 Oct;112(8):1255-63.
 28. Elli FM, de Sanctis L, Peverelli E, Bordogna P, Pivetta B, Miolo G, et al. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b: a novel inherited deletion ablating STX16 causes loss of imprinting at the A/B DMR. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Apr;99(4):E724-8.
 29. Richard N, Abeguile G, Coudray N, Mittre H, Gruchy N, Andrieux J, et al. A new deletion ablating NESP55 causes loss of maternal imprint of A/B GNAS and autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 May;97(5):E863-7.
 30. Bastepe M, Frohlich LF, Linglart A, Abu-Zahra HS, Tojo K, Ward LM, et al. Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of

maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type Ib. *Nat Genet.* 2005 Jan;37(1):25-7.

31. Chillambhi S, Turan S, Hwang DY, Chen HC, Juppner H, Bastepe M. Deletion of the noncoding GNAS antisense transcript causes pseudohypoparathyroidism type Ib and biparental defects of GNAS methylation in cis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug;95(8):3993-4002.

32. Bastepe M, Lane AH, Juppner H. Paternal uniparental isodisomy of chromosome 20q--and the resulting changes in GNAS1 methylation--as a plausible cause of pseudohypoparathyroidism. *Am J Hum Genet.* 2001 May;68(5):1283-9.

33. Liu J, Nealon JG, Weinstein LS. Distinct patterns of abnormal GNAS imprinting in familial and sporadic pseudohypoparathyroidism type IB. *Hum Mol Genet.* 2005 Jan 1;14(1):95-102.

34. Linglart A, Bastepe M, Juppner H. Similar clinical and laboratory findings in patients with symptomatic autosomal dominant and sporadic pseudohypoparathyroidism type Ib despite different epigenetic changes at the GNAS locus. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Dec;67(6):822-31.

35. Zazo C, Thiele S, Martin C, Fernandez-Rebollo E, Martinez-Indart L, Werner R, et al. Gsalpha activity is reduced in erythrocyte membranes of patients with pseudohypoparathyroidism due to epigenetic alterations at the GNAS locus. *J Bone Miner Res.* 2011 Aug;26(8):1864-70.

36. Al-Salameh A, Despert F, Kottler ML, Linglart A, Carel JC, Lecomte P. Resistance to epinephrine and hypersensitivity (hyperresponsiveness) to CB1 antagonists in a patient with pseudohypoparathyroidism type Ic. *Eur J Endocrinol.* 2010 2010;162(4):819-24.

37. Wu WJ, Schwindinger WF, Aparicio LF, Levine MA. Selective resistance to parathyroid hormone caused by a novel uncoupling mutation in the carboxyl terminus of G alpha(s). A cause of pseudohypoparathyroidism type Ib. *J Biol Chem.* 2001 Jan 5;276(1):165-71.

38. Mantovani G. Clinical review: Pseudohypoparathyroidism: diagnosis and treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):3020-30.

-
39. Rubin MR, Levine MA. Hypoparathyroidism and Pseudohypoparathyroidism. In: Rosen CJ, Compston JE, Lian JB, editors. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*: ASBMR; 2008.
 40. de Nanclares GP, Fernandez-Rebollo E, Santin I, Garcia-Cuartero B, Gaztambide S, Menendez E, et al. Epigenetic defects of GNAS in patients with pseudohypoparathyroidism and mild features of Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;92(6):2370-3.
 41. Mariot V, Maupetit-Mehouas S, Sinding C, Kottler ML, Linglart A. A maternal epimutation of GNAS leads to Albright osteodystrophy and parathyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Mar;93(3):661-5.
 42. Unluturk U, Harmanci A, Babaoglu M, Yasar U, Varli K, Bastepe M, et al. Molecular diagnosis and clinical characterization of pseudohypoparathyroidism type-Ib in a patient with mild Albright's hereditary osteodystrophy-like features, epileptic seizures, and defective renal handling of uric acid. *Am J Med Sci*. 2008 Jul;336(1):84-90.
 43. 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.
 44. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57.
 45. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(14):e128.
 46. Fernandez-Rebollo E, Lecumberri B, Gaztambide S, Martinez-Indart L, Perez de Nanclares G, Castano L. Endocrine profile and phenotype-(epi)genotype correlation in Spanish patients with

- pseudohypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 May;98(5):E996-1006.
47. Archibald RM, Finby N, De Vito F. Endocrine significance of short metacarpals. *J Clin Endocrinol Metab.* 1959 Oct;19:1312-22.
48. Yu S, Yu D, Hainline BE, Brenner JL, Wilson KA, Wilson LC, et al. A deletion hot-spot in exon 7 of the Gs alpha gene (GNAS1) in patients with Albright hereditary osteodystrophy. *Hum Mol Genet.* 1995 Oct;4(10):2001-2.
49. Mantovani G, Romoli R, Weber G, Brunelli V, De Menis E, Beccio S, et al. Mutational analysis of GNAS1 in patients with pseudohypoparathyroidism: identification of two novel mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Nov;85(11):4243-8.
50. Lietman SA, Goldfarb J, Desai N, Levine MA. Preimplantation genetic diagnosis for severe albright hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Mar;93(3):901-4.
51. Reis MT, Cattani A, Mendonca BB, Correa PH, Martin RM. A novel GNAS mutation in an infant boy with pseudohypoparathyroidism type Ia and normal serum calcium and phosphate levels. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010 Nov;54(8):728-31.
52. Elli FM, DeSanctis L, Ceoloni B, Barbieri AM, Bordogna P, Beck-Peccoz P, et al. Pseudohypoparathyroidism Type Ia and Pseudo-Pseudohypoparathyroidism: The Growing Spectrum Of Gnas Inactivating Mutations. *Hum Mutat.* 2013 Dec 21;34(3):411-6.
53. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 2002 Sep 1;30(17):3894-900.
54. Bromberg Y, Rost B. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(11):3823-35.
55. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010 Aug;7(8):575-6.
56. Linglart A, Carel JC, Garabedian M, Le T, Mallet E, Kottler ML. GNAS1 lesions in pseudohypoparathyroidism Ia and Ic: genotype phenotype

relationship and evidence of the maternal transmission of the hormonal resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jan;87(1):189-97.

57. Thiele S, de Sanctis L, Werner R, Grotzinger J, Aydin C, Juppner H, et al. Functional characterization of GNAS mutations found in patients with pseudohypoparathyroidism type 1c defines a new subgroup of pseudohypoparathyroidism affecting selectively Gsalpha-receptor interaction. *Hum Mutat.* 2011 Jun;32(6):653-60.

58. Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P, et al. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Dec;77(6):1700-5.

59. Germain-Lee EL, Groman J, Crane JL, Jan de Beur SM, Levine MA. Growth hormone deficiency in pseudohypoparathyroidism type 1a: another manifestation of multihormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Sep;88(9):4059-69.

60. Mantovani G, Maghnie M, Weber G, De Menis E, Brunelli V, Cappa M, et al. Growth hormone-releasing hormone resistance in pseudohypoparathyroidism type 1a: new evidence for imprinting of the Gs alpha gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Sep;88(9):4070-4.

61. Lemos MC, Thakker RV. GNAS Mutations in Pseudohypoparathyroidism Type 1a and Related Disorders. *Hum Mutat.* 2014 Sep 13.

62. Weinstein LS, Gejman PV, de Mazancourt P, American N, Spiegel AM. A heterozygous 4-bp deletion mutation in the Gs alpha gene (GNAS1) in a patient with Albright hereditary osteodystrophy. *Genomics.* 1992 Aug;13(4):1319-21.

63. Dekelbab BH, Aughton DJ, Levine MA. Pseudohypoparathyroidism type 1A and morbid obesity in infancy. *Endocr Pract.* 2009 Apr;15(3):249-53.

64. Fernandez-Rebollo E, Garcia-Cuartero B, Garin I, Largo C, Martinez F, Garcia-Lacalle C, et al. Intragenic GNAS deletion involving exon A/B in pseudohypoparathyroidism type 1A resulting in an apparent loss of exon A/B

- methylation: potential for misdiagnosis of pseudohypoparathyroidism type 1B. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Feb;95(2):765-71.
65. Mitsui T, Nagasaki K, Takagi M, Narumi S, Ishii T, Hasegawa T. A family of pseudohypoparathyroidism type Ia with an 850-kb submicroscopic deletion encompassing the whole GNAS locus. *Am J Med Genet A.* 2012 Jan;158A(1):261-4.
66. Cho SY, Yoon YA, Ki CS, Huh HJ, Yoo HW, Lee BH, et al. Clinical characterization and molecular classification of 12 Korean patients with pseudohypoparathyroidism and pseudopseudohypoparathyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013 Oct;121(9):539-45.
67. Mantovani G, Bondioni S, Linglart A, Maghnie M, Cisternino M, Corbetta S, et al. Genetic analysis and evaluation of resistance to thyrotropin and growth hormone-releasing hormone in pseudohypoparathyroidism type Ib. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;92(9):3738-42.
68. Fernandez-Rebollo E, Perez de Nanclares G, Lecumberri B, Turan S, Anda E, Perez-Nanclares G, et al. Exclusion of the GNAS locus in PHP-Ib patients with broad GNAS methylation changes: evidence for an autosomal recessive form of PHP-Ib? *J Bone Miner Res.* 2011 Aug;26(8):1854-63.
69. Pereda A, Azriel S, Bonet M, Garin I, Gener B, Lecumberri B, et al. Pseudohypoparathyroidism vs. tricho-rhino-phalangeal syndrome: patient reclassification. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2014 Jun 19.
70. Shoback D. Clinical practice. Hypoparathyroidism. *N Engl J Med.* 2008 Jul 24;359(4):391-403.
71. Mantovani G, de Sanctis L, Barbieri AM, Elli FM, Bollati V, Vaira V, et al. Pseudohypoparathyroidism and GNAS epigenetic defects: clinical evaluation of albright hereditary osteodystrophy and molecular analysis in 40 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Feb;95(2):651-8.
72. Werder EA, Fischer JA, Illig R, Kind HP, Bernasconi S, Fanconi A, et al. Pseudohypoparathyroidism and idiopathic hypoparathyroidism: relationship between serum calcium and parathyroid hormone levels and urinary cyclic adenosine-3',5'-monophosphate response to parathyroid extract. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978 Jun;46(6):872-9.

-
73. Donghi V, Mora S, Zamproni I, Chiumello G, Weber G. Pseudohypoparathyroidism, an often delayed diagnosis: a case series. *Cases J.* 2009;2:6734.
 74. Tamada Y, Kanda S, Suzuki H, Tajima T, Nishiyama T. A pseudohypoparathyroidism type 1a patient with normocalcemia. *Endocr J.* 2008 Mar;55(1):169-73.
 75. Neary NM, El-Maouche D, Hopkins R, Libutti SK, Moses AM, Weinstein LS. Development and treatment of tertiary hyperparathyroidism in patients with pseudohypoparathyroidism type 1B. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Sep;97(9):3025-30.
 76. Levine MA, Downs RW, Jr., Moses AM, Breslau NA, Marx SJ, Lasker RD, et al. Resistance to multiple hormones in patients with pseudohypoparathyroidism. Association with deficient activity of guanine nucleotide regulatory protein. *Am J Med.* 1983 Apr;74(4):545-56.
 77. Lubell T, Garzon M, Anyane Yeboa K, Shah B. A novel mutation causing pseudohypoparathyroidism 1A with congenital hypothyroidism and osteoma cutis. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2009;1(5):244-7.
 78. Weisman Y, Golander A, Spirer Z, Farfel Z. Pseudohypoparathyroidism type 1a presenting as congenital hypothyroidism. *J Pediatr.* 1985 Sep;107(3):413-5.
 79. Mantovani G, Spada A. Resistance to growth hormone releasing hormone and gonadotropins in Albright's hereditary osteodystrophy. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006 May;19 Suppl 2:663-70.