Michele Moreira

Análise do gene *OTX2* em pacientes com deficiência de hormônio de crescimento isolada ou associada a outras deficiências hormonais hipofisárias

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento
e Metabolismo

Orientadora: Luciani Renata Silveira de
Carvalho

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Michele

Análise do gene *OTX2* em pacientes com deficiência de hormônio de crescimento isolada ou associada a outras deficiências hormonais hipofisárias / Michele Moreira. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Luciani Renata Silveira de Carvalho.

Descritores: 1.Hormônio do crescimento/deficiência 2. Hormônio do crescimento/genética 3.Hipopituitarismo/etiologia 4.OTX2 proteína 5.Hipófise/embriologia 6.Neuroipófise/anormalidades 7.Fatores de transcrição

USP/FM/DBD-023/13

DEDICATÓRIA

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um 'não'. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

(Fernando Pessoa)

Dedico este manuscrito em especial a minha filha Julia, razão da minha vida, ao meu marido Denis por estar em todos os momentos ao meu lado me apoiando, ajudando e aguentando os meus momentos de ansiedade e estresse, aos meus pais Carlos e Maria Lourdes que sempre presentes me deram exemplos para acreditar nos ideais e sonhos e isso fez com que eu acreditasse em mim, a minha irmã Mirela por me servir de inspiração em conquistas e me incentivar.

AGRADECIMENTOS

Nesses 3 anos arrisquei-me em uma nova jornada, em um novo aprendizado, em novos amigos. Não sei se o que sinto hoje é diferente de antes... Continuo assombrada pelo medo do novo, mas gostei e muito!

Gostei até de aprender que existem pessoas que se identificam, ou não, que a pesquisa é difícil, mas surpreendente, mas com certeza o que eu mais gostei foi aprender que o esforço vale a pena! Sim, hoje eu sei, e me apaixonei por ciência. De uma maneira geral gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma participaram de alguma das etapas para a realização deste trabalho.

Acredito que qualquer trabalho científico só se realiza com a dedicação de um grupo de pessoas, e este não foi diferente. Muito tenho a agradecer a inúmeras pessoas que tiveram participação na minha formação, em especial a Dra Berenice Bilharinho de Mendonça, que com seu conhecimento admirável, foi a minha grande incentivadora.

Tenho uma imensa gratidão a minha orientadora Dra Luciani Renata Silveira de Carvalho que me ensinou com detalhes a fazer ciência, e um imenso respeito e admiração pelo seu conhecimento. Aprendi quase tudo o que sei sobre questões teóricas e práticas de biologia molecular.

E mesmo sendo provável que nestes três anos de trabalho conjunto eu a tenha decepcionado em algum momento, quero que saiba: o que me ensinou sobre ética profissional, sobre responsabilidade e atitude positiva frente aos desafios muito me ajudou a concluir este trabalho.

As divergências me fizeram crescer. Agradeço ainda a insistência, paciência e confiança que depositou no meu trabalho. Espero sinceramente que possa se orgulhar dele.

Aos professores Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold, Dr. Vinicius Nahyme Brito e Dr Mario Luiz Ribeiro Monteiro eu gostaria de agradecer as sugestões e colaborações no exame de qualificação, que foram fundamentais para o aprimoramento do manuscrito.

Gostaria de agradecer de coração meus colegas de trabalho do laboratório de hormônios e genética molecular, os colegas do LIM 42, e os colegas do laboratório de Hematologia: a Cássia Regina Mazi, Izabel T Nakamura, Gisele Yuri, Camila Reis, Aline LenKzuc, Marcia Ester Paiva, Marcia Rodrigues, Luciana Leopoldino, Fernanda Reis, Poline Leopoldino, Angela Calais, Francineide dos Santos, Gislene Gerbasi, Francinilda de Oliveira, Rosangele Zamboni, Miriam Nishi, Aparecida Medeiros, Andressa Nunes Mariana Reis, Cristina Rossi cuidava dos DNA dos meus pacientes, Dr Marcelo C Batista, Dra Luciana Brito, Dra Valéria Samuel Lando, por sempre me apoiar, a Dra Helena Valassi que me incentivou muito, a Regina Mingroni, Clarinha Morgado, Pascoalina Romano, Cesar Moreira, pelo constante apoio e por me aturar com uma tensão constante, sempre estressada, durante todos estes anos. Todos os momentos de descontração foram fundamentais para que as minhas forças fossem restabelecidas. VOCES SÃO MUITO ESPECIAIS!

Tive o apoio fundamental de algumas pessoas e venho nesse momento agradecer toda paciência que tiveram comigo, no nosso grupo de estudo são elas: Dra Aline Otto, Dra Marcela França, Dra Fernanda Correa, Ricardo Vieira Araujo que me receberam com muito entusiasmo e me deram a oportunidade de desfrutar de agradáveis companhias me ensinando e tirando minhas dúvidas.

Agradeço as secretárias e aos meus amigos da pós graduação, que tiveram um papel importante neste período de 3 anos: Angélica Souza, Rosecler Ferreira, Cíntia Tusset, Thatiana da Silva, Acasio, Daiane Beneduzzi, sempre presentes tirando dúvidas e apoiando muito. Não poderia deixar de agradecer aos pacientes que fizeram parte desse estudo, em especial ao paciente Raul Bezerra com quem sempre pude contar para a realização de vários exames para esclarecer dúvidas científicas.

Ao Denis, que há 8 anos veio tornar minha vida ainda mais feliz, meu companheiro de todas as horas. A ele que por tantas vezes, fez os meus afazeres em casa, segurando a responsabilidade me proporcionando a tranquilidade necessária para a continuidade deste trabalho. OBRIGADO PELO APOIO, AMOR, CARINHO E COMPREENSÃO.

À minha família, pequena de tamanho, mas grande de coração. À minha irmã Mirela, pelo simples fato de que podemos contar uma com a outra, aos meus pais Carlos Alberto Moreira e Maria Lourdes Ralo Moreira, que com muito amor, compreensão e sabedoria formam o alicerce de uma família feliz.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
✓ Organogênese hipofisária.....	2
✓ Padrão de expressão do gene <i>Otx2</i> durante a embriogênese hipofisária.....	2
✓ Caracterização do fenótipo nos camundongos com nocaute no gene <i>Otx2</i>	5
✓ Caracterização do fenótipo do camundongo com nocaute do <i>Otx2</i> tecido específico para adenohipofise e neurohipofise.....	5
✓ Gene <i>OTX2</i> em humanos.....	6
✓ Mutações no gene <i>OTX2</i>	7
2. Objetivo.....	12
3. Casuística.....	14
✓ Considerações éticas.....	15
✓ Pacientes.....	15
✓ Controles.....	16
4. Materiais e métodos.....	17
✓ Avaliação Hormonal.....	18
✓ Estudo molecular.....	19
✓ Extração do DNA genômico	19
✓ Reação de polimerização em cadeia (PCR)	21
✓ Purificação e seqüenciamento automático pelo método de Sanger.....	23
✓ Digestão enzimática.....	23
✓ Análise das variantes alélicas por bioinformática.....	23
5. Resultados.....	25
✓ Achados moleculares.....	27

✓ Quadro clínico do paciente portador de hipopituitarismo com a variante alélica rara c.689A>T, p.H230L em heterozigose, apontada como causadora de doença.....	29
✓ Eletroferograma da variante alélica c.689A>T, p.H230L em heterozigose no paciente portador de hipopituitarismo.....	32
✓ Avaliação da variante alélica c.689A>T pela enzima de restrição Bccl.....	32
✓ Análise da variante alélica c.689A>T, p.H230L na família do paciente e na população normal.....	33
✓ Análise da conservação dos amino ácidos nas diferentes espécies.....	35
6.Discussão.....	36
7. Conclusão.....	42
8. Anexos.....	44
✓ Anexo I.....	45
✓ Anexo II.....	49
9.Referências.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
DGH	Deficiência do Hormônio de crescimento
DGHI	Deficiência do Hormônio de Crescimento Isolado
DHHM	Deficiência Hipofisária Hormonal Múltipla
DNA	Ácido Dexoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo
DP	Desvio Padrão
DPC	dia dos Embriões de Camundongo após coito
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
E2	Estradiol
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
<i>GLI2</i>	<i>GLI-KRUPPEL family member 2</i>
GH	Hormônio de Crescimento
<i>HESX1</i>	<i>Homeobox Embryonic Stem Cell 1</i>
IGF1	Fator de Crescimento Simile à insulina 1
IGFBP3	Proteína ligadora do Fator Crescimento Simile à Insulina 3
LH	Hormônio Luteinizante
<i>LHX4</i>	<i>LIM Homeobox gene 4</i>
<i>LHX3</i>	<i>LIM Homeobox gene 3</i>
NaCl	cloreto de sódio
NHE	Neuroipófise Ectópica
NHT	Neuroipófise Tópica
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
PRL	Prolactina

RM	Ressonância Magnética
Rpm	Rotação por minuto
<i>PROP1</i>	<i>Prophet of Pit 1</i>
<i>POU1F1</i>	<i>POU domain class 1 of transcription factor 1</i> Gene
PNA	Prega neural Anterior
SDHEA	Sulfato de deidroepiandrosterona
SDS	dodecilsulfato de sódio
SOX2	SRY-related HMG-box gene 2
SOX3	SRY-related HMG-box gene 3
Taq	<i>Thermos aquaticus</i> enzima polimerase
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
T4L	Tetraiodotironina Livre
TSH	Hormônio Tireotrófico
TE	Tampão de Tris e EDTA
Tris	Trisaminometano

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Expressão de <i>Otx2</i> na placa neural do camundongo a partir do dia embrionário 7.5	4
Figura 2: Expressão do <i>Otx2</i> no início da embriogênese hipofisária.....	4
Figura 3: Representação gráfica do gene <i>OTX2</i>	6
Figura 4 : Representação esquemática das isoformas do gene <i>OTX2</i>	7
Figura 5: Estrutura do gene e da proteína OTX2 com os principais domínios e a representação gráfica das mutações já descritas.....	8
Figura 6- Deficiência de GH associada a outras deficiências hormonais na casuística estudada.....	26
Figura 7- Ressonância Magnética de Sela túrcica.....	31
Figura 8- Eletroferograma com sequencia normal e com a variante alélica em heterozigose c.689A>T, p.H230L.....	32
Figura 9 - Representação esquemática da escolha da enzima de restrição para rastreamento da variante alélica.....	33
Figura 10A- Gel de agarose a 2% com o produto de PCR de 470 pb após a digestão enzimática com Bccl.....	34
Figura 10B- Heredograma da família com presença da variante alélica em heterozigose em 8 parentes não afetados portadores da alteração molecular.....	34
Figura 11- Alinhamento dos amino ácidos entres as diferentes espécies:.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Mutações descritas no <i>OTX2</i> , fenótipo dos pacientes e padrão de herança familiar.....	9
Tabela 2- <i>Primers</i> para amplificar o gene <i>OTX2</i>	22
Tabela 3- Condições da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	22
Tabela 4- Características fenotípicas, laboratoriais, de imagem e familiar da população estudada.....	26
Tabela 5- Variantes alélicas encontradas na população estudada.....	29
Tabela 6- Dosagens hormonais em diferentes tempos no teste de estímulo combinado com insulina (ITT)+GnRH+TRH.....	31

Resumo

Moreira M, Análise do gene *OTX2* em pacientes com deficiência de hormônio de crescimento isolada ou associada a outras deficiências hormonais hipofisárias [Tese]. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2013, 64p

Introdução: A incidência de baixa estatura devido a deficiência do hormônio do crescimento (DGH) ocorre em 1:4.000-10.000 nascidos vivos. Diversos fatores de transcrição são necessários para a diferenciação dos cinco tipos de células produtoras de 6 hormônios hipofisários. Mutações nos fatores de transcrição *HESX1*, *GLI2*, *LHX3*, *LHX4*, *SOX2*, *SOX3*, *PROP1* e *POU1F1* foram descritas em pacientes com deficiência hormonal hipofisária isolada ou múltipla associada ou não a outras malformações. Mutações no gene *OTX2*, um fator de transcrição responsável pela formação da vesícula ocular e pela hipófise, podem causar malformações oculares tais como anftalmia e microftalmia, isoladamente ou em associação com DGH isolado (DGHI) ou deficiência hipofisária hormonal múltipla (DHMM). Recentemente, dois pacientes não relacionados com DHMM e neuroipófise ectópica, sem anormalidades oculares foram descritos com mutações em heterozigose no *OTX2* sugerindo um papel deste gene na etiologia do hipopituitarismo sem outras características sindrômicas. **Objetivo:** O objetivo desse trabalho foi o de analisar o gene *OTX2* em pacientes com DGHI ou DHMM e correlacionar os achados moleculares com o fenótipo. **Pacientes:** Foram estudados 125 pacientes com DHMM (6 filhos de pais consanguíneos e 33 com parentes com baixa estatura) e 33 com DGHI (7 filhos de pais consanguíneos e 8 com parentes com baixa estatura). **Materiais e métodos:** Amostras de DNA dos pacientes foram submetidas à reação de polimerização em cadeia utilizando-se *primers* intrônicos desenhados para amplificar os 3 exons e as regiões flangeadoras do gene *OTX2*. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pelo método de Sanger. **Resultados:** Uma nova variante alélica c.689A>T, p.H230L em heterozigose no exon 5 foi encontrado em um único paciente com deficiência de GH, TSH, LH/FSH e ACTH associada a neuroipófise ectópica, sem malformação ocular. A histidina na posição 230 é altamente conservada em todas as espécies de vertebrados, e a análise *in silico* prediz um efeito prejudicial à estrutura da proteína. A análise da variante na família revelou 8 parentes não afetados como portadores heterozigotos, sugerindo uma doença autossômica dominante com padrão de penetrância incompleta. Esta variante não foi encontrada em 400 alelos de 200 controles brasileiros, porém foi descrito como polimorfismo no banco de dados de SNP em uma população européia americana, com incidência de 1 alelo T, entre 8600 alelos, sendo assim considerado raro. Encontramos também outras quatro variantes alélicas na casuística (c.98-70C> A; c.420G> C, p.P148P; c.435C> T, p.S145S; C * 10G> A), não conservadas entre as espécies. Duas delas levando a troca silenciosa de amino ácidos, sem efeito deletério no sítio *exonic splice enhancer*. **Conclusão** A nossa coorte de 158 pacientes é a maior população rastreada para mutações no

OTX2 e a detecção de uma variante suspeita em heterozigose em um único paciente portador de hipopituitarismo e neuroipófise ectópica sugere que mutações no *OTX2* são uma causa rara de DHHM ou DGHl sem malformação ocular na população estudada. O achado molecular da variante c.689A>T, p.H230L em heterozigose, com padrão de penetrância incompleta é consistente com a observação de que as características fenotípicas de camundongos heterozigotos com perda de função do *Otx2* são fortemente influenciados pela *background* genético, não podendo dessa forma, descartar que outros moduladores genéticos possam ser responsáveis pela penetrância incompleta nessa família. Essa hipótese deverá ser investigada pela análise do exoma do paciente e seus familiares. O fato de a variante estar localizada numa região altamente conservada entre as espécies, sugere que a mesma seja causadora do fenótipo em questão, porém serão necessários os estudos funcionais de transfecção transitória para determinar se se trata de perda de função ou efeito negativo dominante de genes alvos expressos no ectoderme oral ou neural.

Descritores: 1.Hormônio do crescimento/deficiência 2. Hormônio do crescimento/genética 3.Hipopituitarismo/etiologia 4.OTX2 proteína 5.Hipófise/embriologia 6.Neuroipófise/anormalidades 7.Fatores de transcrição

Abstract

Moreira M, Analysis of *OTX2* gene in patients with growth hormone deficiency either alone or associated with other pituitary hormone deficiencies [thesis]. São Paulo, School of Medicine, University of São Paulo 2013. 64p

Introduction: The incidence of short stature due to growth hormone deficiency (GHD) occurs in 1:4.000-10.000 live births. Several transcription factors are required for differentiation of five types of cells producing 6 pituitary hormones. Mutations in the transcription factors *HESX1*, *GLI2*, *LHX3*, *LHX4*, *SOX2*, *SOX3*, *PROP1* and *POU1F1* have been described in patients with isolated pituitary hormone deficiency or multiple associated or not with other malformations. Mutations in *OTX2*, a transcription factor responsible for the formation of the eye vesicle and the pituitary gland, can cause ocular malformations such as anophthalmia and microphthalmia, alone or in association with isolated GHD (IGHD) or combined pituitary hormone deficiency (CPHD). Recently, two unrelated patients with CPHD and ectopic neurohypophysis without ocular abnormalities were described with heterozygous mutations in *OTX2* suggesting a role of this gene in the etiology of hypopituitarism without other syndromic features. **Objective:** The aim of this study was to analyze the *OTX2* gene in patients with GHD or CPHD and correlate the molecular findings with the phenotype. **Patients:** We studied 125 patients with CPHD (6 children of consanguineous parents and 33 relatives with short stature) and 33 with IGHD (7 children of consanguineous parents and 8 relatives with short stature). **Materials and methods:** DNA samples from the patients were subjected to polymerase chain reaction using intronic primers designed to amplify the 3 exons and flanking regions of the gene *OTX2*. The PCR products were purified and sequenced by the Sanger method. **Results:** A new heterozygous allelic variant c.689A> T, p.H230L in exon 5 was found in one patient with deficiencies of GH, TSH, LH / FSH and ACTH associated with ectopic neurohypophysis without ocular malformation. The histidine at position 230 is strongly conserved in all vertebrate species, and *in silico* analysis predicts a detrimental effect on protein structure. The analysis of the variant in the family revealed eight unaffected relatives as heterozygous carriers, suggesting an autosomal dominant pattern with incomplete penetrance. This variant was not found in 400 alleles of 200 Brazilian controls, but it was described as a polymorphism in the SNP database in a European American population, with an incidence of 1 T allele among 8600 alleles, and therefore considered rare. We also found four other allelic variants in the samples (c.98-70C> A; c.420G> C, p.P148P; c.435C> T, p.S145S; C * 10G> A), not conserved between species. Two of them leading to a silent amino acid exchange, without deleterious effect in the exonic splice enhancer site. **Conclusion** Our cohort of 158 patients is the largest population screened for mutations in *OTX2* and the detection of a suspected heterozygous variant in one patient with hypopituitarism and ectopic neurohypophysis suggests that *OTX2* mutations are a rare cause of CPHD/IGHD without ocular malformation in the

studied population. The molecular finding of a heterozygous variant c.689A> T, p.H230L, with incomplete penetrance pattern is consistent with the observation that the phenotypic characteristics of mice with heterozygous loss of function of *Otx2* are strongly influenced by genetic background, suggesting that other genetic modulators may be responsible for the incomplete penetrance in this family. This hypothesis should be investigated by analysis of exoma in the patient and their family. The fact that the variant is located in a region highly conserved among species suggests that it is causing the phenotype in question, but it will require the functional studies with transient transfections to determine whether it is the loss of function or effect of dominant negative target genes expressed in neural or oral ectoderm.

Descriptors: 1. Growth Hormone / deficiency 2. Growth hormone / genetics
3. Hypopituitarism / etiology 4. OTX2 protein 5. Pituitary/embryology
6. Neurohypophysis / abnormalities 7. Transcription factors

1.INTRODUÇÃO

Organogênese Hipofisária

A hipófise, reconhecida como glândula-mestra do sistema nervoso, situa-se na sela túrcica localizada na base do crânio e conecta-se ao hipotálamo através do pedúnculo hipofisário ou infundíbulo. Estudos embriológicos tradicionais demonstram que ela se origina de duas camadas embrionárias distintas: o lobo anterior, a adenoipófise, origina-se do ectoderma oral e o lobo posterior, a neuroipófise, do ectoderma neural (1). A hipófise anterior se diferencia em 5 tipos celulares que são os somatotrofos, tireotrofos, gonadotrofos, lactotrofos e corticotrofos que por sua vez produzem e liberam 6 hormônios, entre eles GH, TSH, LH/FSH, PRL e ACTH, respectivamente (2). A deficiência hipofisária hormonal múltipla (DHHM) ou hipopituitarismo caracteriza-se pela deficiência de um ou mais hormônios da adenoipófise (3). A deficiência do hormônio de crescimento (DGH) é a deficiência hipofisária mais freqüente, nos portadores de doenças hipotálamo-hipofisárias. A probabilidade de DGH severa e permanente é maior quando está associada a outras deficiências hipofisárias (4). O hipopituitarismo congênito pode estar associado a mutações nos fatores de transcrição envolvidos na embriogênese hipofisária como *HESX1*, *LHX4*, *LHX3*, *SOX3*, *SOX2*, *OTX2*, *GLI2*, *PROP1* e *POU1F1* também conhecido como *PIT1*(5). Mutações nesses fatores de transcrição têm sido associadas a deficiência de GH isolado ou associado a outras deficiências hipofisária. O *OTX2* é um gene crítico para o desenvolvimento das vesículas oculares, diencéfalo ventral, adenohipofise e mutações nesse gene foram descritas em casos de malformação ocular associada ou não a DGH isolado ou combinado (6).

Padrão de expressão do gene *Otx2* durante a embriogênese hipofisária

A análise da embriogênese hipofisária dos camundongos evidencia que a parte anterior da placa neural, a prega neural anterior (PNA), originará as estruturas não neurais tais como adenoipófise, ectoderma da cavidade nasal e a placa olfatória, enquanto um tecido da placa neural imediatamente adjacente à PNA, dará origem às estruturas neurais anteriores como hipotálamo, neuroipófise, vesículas ópticas e porção ventral da região anterior do cérebro (7, 8). A adenoipófise origina-se de uma proliferação intensa da região ventral do

ectoderma oral levando a formação de uma vesícula rudimentar que posteriormente sofre uma separação do assoalho oral resultando em uma bolsa definitiva, denominada de bolsa de Rathke. As Células progenitoras da bolsa de Rathke, sob a influência da expressão de diferentes genes que atuam de forma tempo espacial, levam a diferenciação de 5 tipos celulares (somatotrofo, lactotrofo, gonadotrofo, corticotrofo e tireotrofo) produtores de hormônios, sendo assim denominada de adenoipófise (9, 10). Entre esses fatores críticos para a formação e diferenciação da adenoipófise temos o *Otx2* que é um fator de transcrição expresso a partir do dia embrionário 7.5 (e7.5) na placa neural (Figura 1), sendo assim responsável pelo desenvolvimento de vários órgãos sensoriais, como as células olfativas do nariz (11), o gânglio coclear do sistema auditivo (12), as células fotorreceptoras da retina (13) e da placa ótica (14). Em drosófilas, o *Otx2* é necessário para o desenvolvimento do cérebro, olho e formação de antena (15) e para a regulação do desenvolvimento dos fotorreceptores (16). Estudos de expressão ectópica em *Xenopus* sugerem que o *Otx2* se expressa no início do desenvolvimento embrionário, interagindo com uma série de fatores de transcrição na região ocular incluindo *Rx1*, *Pax6* e *Six3* (17). Durante a formação dos olhos, a expressão do OTX2 se inicia na vesícula óptica e se restringe ao epitélio pigmentar da retina. (18-20).

Em camundongos o *Otx1* e o *Otx2* estão expressos durante o desenvolvimento neural nas estruturas sensoriais, incluindo o cérebro, ouvido, nariz e olhos (19, 20). Os mamíferos têm três genes OTX: *OTX1*, *OTX2*, e *CRX* e todos eles são expressos durante o desenvolvimento dos olhos (21-23).

Figura1: Expressão de *Otx2* na placa neural do camundongo a partir e7.5 (24).

Entre e10.5-14.5, sua expressão ocorre no diencéfalo ventral que dará origem a neuroipófise (25) (Figura 2).

Figura 2: Expressão do *Otx2* no início da embriogênese hipofisária (26).

Caracterização do fenótipo nos camundongos com nocaute no gene *Otx2*

O Nocaute em homozigose do *Otx2* leva à morte dos embriões na metade da gestação devido a anormalidades cerebrais graves, sugerindo que o gene tem um papel essencial no desenvolvimento da cabeça (27, 28). No dia embrionário 18,5 (e18,5), os embriões heterozigotos exibem fenótipo variável de acordo com o *background* genético, podendo apresentar desde um fenótipo normal até graves anomalias craniofaciais como microftalmia, anoftalmia, agnatia, micrognatia, holoprosencefalia com narina única, nariz curto e acefalia (27-29). (29).

Caracterização do fenótipo do camundongo com nocaute do *Otx2* tecido específico para adenohipofise e neurohipofise

Camundongos com a perda da função do *Otx2* em estado de heterozigose exibem uma gama de fenótipos que são influenciadas pela variação do *background* genético (27-29). Para compreender o mecanismo pelo qual o OTX2 atua sobre o desenvolvimento da hipófise levando ao quadro de deficiência hipofisária estabeleceu-se o nocaute do *Otx2* tecido-específico. Observou-se que no e10.5 o OTX2 é expresso no diencéfalo ventral, o que dá origem ao lobo posterior (neuro-hipófise), e na bolsa de Rathke, o primórdio da adenoipófise (lobo anterior) e do lobo intermédio (Figura 2). Subsequentemente, a expressão OTX2 se restringe ao lobo posterior e lobo intermédio, não sendo detectada por imunistoquímica na hipófise anterior de camundongos recém-nascidos. Diante disso, *Vesper et al* postularam a hipótese de que a deficiência de OTX2 provocaria a hipoplasia hipofisária por afetar a sinalização indutiva no diencéfalo ventral (35). Para testar essa hipótese foi gerado um camundongo nocaute específico no ectoderma neural cruzando camundongos transgênicos *Otx2flox/flox* (30) com camundongos transgênicos *Nkx2.1-CRE* (31). Observou-se que o animal *Otx2flox/flox*, *Nkx2.1-Cre* apresenta uma invaginação pequena do diencéfalo ventral no e12.5, e a bolsa de Rathke encontra-se menor, sugerindo que a expressão de OTX2 no ectoderma neural é importante para a indução da bolsa de Rathke – sendo assim considerado um efeito extrínseco. O OTX2 está envolvido com a sinalização BMP WNT, FGF em outros tecidos, e

todas essas vias são necessárias no ectoderma neural para o crescimento normal da bolsa de Rathke (32, 33). Para investigar se o OTX2 também tem um papel intrínseco na bolsa de Rathke, foram cruzados os camundongos *Otx2*^{flox/flox} *Pitx2*-cre transgênicos (34) e não se observou alteração no padrão de expressão dos hormônios da adenohipófise, sugerindo que a sua ação na hipófise ocorre de forma extrínseca e não intrínseca (35).

Gene *OTX2* em humanos

O *OTX2* (OMIM 600037), um gene da classe de homeodomínio, é um ortólogo vertebrado do gene da *Drosófila* *Orthodenticle* (*OTD*).

O gene *OTX2* está localizado no braço curto do cromossomo 14 na região 14q22-23. O locus do gene *OTX2* está distribuído em 5 exons sendo os 2 primeiros exons transcritos e não traduzidos e os 3 últimos transcritos e traduzidos. A proteína OTX2 tem três domínios, um homeodomínio (HD), responsável pela ligação ao DNA, um domínio repressor que recruta co-repressores (eh1) e um domínio de transativação (TD) (Figura 3). O gene *OTX2* produz ainda 2 isoformas, a isoforma a com 297aa (Genebank NM 21728.2) e a isoforma b com 289 aa (Genebank NM 172337.1) com 8 aminoácidos a menos devido ao *splicing* alternativo entre o intron 3 e o exon 4 (36) (Figura 4). O *OTX2* é necessário para indução da placa neural anterior, e é expresso durante o desenvolvimento do neuroepitélio, do prosencefalo e do mesencéfalo, incluindo o olho (20).

Figura 3: Representação gráfica do gene *OTX2*: O gene contém 5 exons que traduz uma proteína de 289 aa. A proteína contém a região N- terminal (NTD) e a C- terminal. A região NTD se estende do aa 1 ao 38, o homeodomínio (HD) do aa 38 a 97 e a região C- terminal do aa 97 ao 289 que compreende todo o domínio de transativação (TD) além do domínio SGQFTP do aa 128-133 e do domínio repressor (eh1) do aa 150 a 155.(37)

Figure

97 aa

(Genebank NM 21728.2) e a isoforma b contém 289 aa (Genebank NM 172337.1), com 8 aminoácidos a menos por causa da junção alternativa na fronteira do intron 3 e do exon 4.(37)

Mutações no gene *OTX2*

Até a presente data, foram descritas 29 diferentes mutações em heterozigose no *OTX2* em 32 pacientes não relacionados (Tabela 1, Fig. 5). Os primeiros defeitos genéticos descritos que afetavam o gene *OTX2* foram as deleções intersticiais no cromossomo 14, região 14q22, em associação com anoftalmia e anormalidades hipofisárias (38, 39). Utilizando-se a abordagem de gene candidato, Ragge *et al* (40) rastrearam uma grande coorte de 333 pacientes com microftalmia, anoftalmia e / ou coloboma e identificaram as primeiras oito mutações.

O padrão de herança das mutações no *OTX2* é geralmente descrita como autossômica dominante com fenótipo variável. A penetrância incompleta foi descrita em muitas famílias (40-43) e isso explica a existência de portadores não afetados. Um número relativamente elevado de alterações foram encontradas *de novo*, especialmente em todos os casos com deleções de genes inteiros e translocações (37, 38, 40, 44, 45). A exceção notável a esta é a duplicação 14q22.3 24 que foi herdada do pai afetado e esteve presente em vários membros da família com quadro menos grave no desenvolvimento. No entanto, alguns outros casos adicionam uma complexidade ainda maior a este padrão, como dois casos de herança de mosaicismo gonossomático descrito por Ragge *et al* (40) (Tabela 1: Mutações 1, 25). Além disso, Wyatt *et al* (41) descrevem uma família onde os pais normais sem mutações tiveram dois filhos

afetados com a mesma mutação, mas diferentes fenótipos (Tabela 1: mutação 4); sendo nesse caso excluído o mosaïcismo parental no sangue e nas células bucais.

Vale notar que todas as mutações e deleções encontrados até data são estritamente heterozigóticas, embora vários casos com mutações adicionais em outros genes têm sido descritos (40, 46) (Tabela 1: Mutações 2 e 25).

Existem várias mutações que afetam o mesmo aminoácido, em diversos pacientes não relacionados com fenótipos diferentes (Tabela 1: Mutações 9 e 10, 17 e 18). A maioria das mutações estão localizadas em resíduos conservados, o que sugere uma relevância funcional.

A descrição de mutações no *OTX2* em pacientes com deficiência isolada de GH ou associada a outras deficiências hipofisárias, mesmo sem alterações oculares, nos motivou a estudar este gene na nossa casuística.

Figura 5: Estrutura do gene e da proteína OTX2 com os principais domínios e a representação gráfica das mutações já descritas. (6)

Tabela 1- Mutações descritas no *OTX2*, fenótipo dos pacientes e padrão de herança familiar .

n	cDNA	Proteína	Fenótipo	Herança	Ref
1	c.81delC	p.Ser28ProfsX23	grave MO bilateral	Mosaicismo gonossomal materno (portadora)	(40)
2	c.85G>A	p.Val29Met	Donnai- Barrow (coloboma bilateral da Iris, catarata e alterações na retina)	Pai portador(sem fenótipo)	(41)
3	c.93C>G	p.Tyr31X	MO esquerdo e nistagmo direito	<i>De novo</i>	(41)
4	c.106dupC	p.Arg36ProfsX52	Irmão: i) MO direito e ii) AO direito e coloboma esquerdo	<i>De novo</i>	
5	c.117_118delCC	p.Arg40GlyfsX47	AO bilateral, nervos ópticos pequenos, quiasma fino, hipotelorismo, DD	Mãe portadora de mutação (sem fenótipo)	(40)
6	c.136dupA	p.Thr46AsnfsX42	i) Bilateral MO e grave hipoplasia do nervo óptico, ii) Pai: MO Unilateral, catarata, aplasia do nervo óptico e digenesia segmentar anterior	Pai portador afetado	(47)
7	c.214_217del GCACinsCA	p.Ala72HisfsX15	MO bilateral e estatura normal	<i>De novo</i>	(42)
8	c.221_236del	p.Lys74SerfsX30	AO direito e MO esquerdo, DD, DGH, hipófise hipoplásica e testículos retráteis	<i>De novo</i>	(42)
9	c.265C>G	p.Arg89Gly	MO bilateral, aplasia do nervo óptico, quiasma ausente	<i>De novo</i>	(40)
10	c.265C>T	p.Arg89X	AO bilateral	<i>De novo</i>	(48)
11	c.270A>T	p.Arg90Ser	AO unilateral direito, DGH, hipófise hipoplásica e neuroipófise ectópica	Pai portador (pequeno fenótipo ocular)	(43)
12	c.289C>T	p.Gln97X	Irmãos: i) extrema MO bilateral and ii) coloboma inferior da iris direito and coloboma retina esquerdo	Pai portador (tem visão reduzida em um olho)	(41)
13	c.295C>T	p.Gln99X	MO bilateral, ausência nervo óptico e quiasma, assimetria dos ventrículos laterais e convulsões	Pai portadoer da mutação (sem fenótipo)	(40)
14	c.313C>T	p.Gln105X	AO bilateral, globos displásicos bilateral	<i>De novo</i>	(47)

			and aplasia nervo óptico		
15	c.373_374delAG	p.Ser125TrpfsX11	AO bilateral and DD discreta	Mãe portadora (sem fenótipo)	(41)
16	c.397C>A	p.Pro133Thr	MO direito e catarata, sclerocornea esquerda	Mãe e irmão portadores da mutação	(40)
17	c.400C>G	p.Pro134Ala	AO esquerda, cedo e discreta DD, atenção deficiência e desordem /hiperatividade	<i>De novo</i>	(40)
18	c.401C>G	p.Pro134Arg	DHHM, nervo óptico esquerdo subdesenvolvido, hipófise hipoplásica	Pai portador	(49)
19	c.402dupC	p.Ser135LeufsX2	AO Bilateral, baixa estatura, IGHD parcial; DD	<i>De novo</i>	(37)
20	c.404_405dupCT	p.Ser136LeufsX43	AO bilateral, CPHD, hipófise hipoplásica, neuroipófise ectópica e malformação chiari, DD	<i>De novo</i>	(44)
21	c.413C>G	p.Ser138X	GHD (baixo IGF1 e IGFBP3), alterando com esotropia nistagmo torsão leve	<i>De novo</i>	(50)
22	c.456_457delGAin sAT	p.Trp152X	AO direito e MO esquerdo, hipoplasia bilateral nervo óptico, ausência do quiasma; CPHD; microcefalia; DD	<i>De novo</i>	(47)
23	c.463_464dupGC	p.Ser156LeufsX23	AO direito e MO esquerdo, coloboma da íris e coriorretiniana, deslocamento total da retina a esquerda; agenesia parcial do corpo caloso, ausência direito e esquerdo nervos óptico, quiasma fino; atraso desenvolvimento; DD	<i>De novo</i>	(40)
24	c.532A>T	p.Thr178Ser	DHHM	Os pais se recusaram fazer análise molecular	(42)
25	c.537T>A	p.Tyr179X	Irmão: i) MO bilateral e colobomata; severa DD e convulsões, ii) LCA, sinéquias periféricas bilateral anterior iii) MO, aniridia, microcefalia, e máculas café com leite	Mosaicismo gonossomal materno com retinopatia pigmentar, Pai com LCA	(40)
26	c.553_556dup TATA	p.Ser186IlefsX2	MO bilateral, hipoplasia do nervo óptico, pequeno quiasma óptico; hipófise hipoplásica; microcefalia, e DD	<i>De novo</i>	(47)
27	c.562G>T	p.Gly188X	i) MO bilateral, DHHM, hipófise hipoplásica, e DD ii) MO bilateral, DD, convulsões	Não avaliado	(42)
28	c.674A>G	p.Asn225Ser	i) DHHM, hipoplasia hipofisária ii) DHHM, hipoplasia hipofisária	Não avaliado	(51)
29	c.734C>T	p.Ala245Val	Hipoplasia bilateral do nervo óptico e baixa estatura	Pai portador (fenótipo normal)	(42)

Microdeleção chr 14, 46,XX,del(14Xq22 q23)	Gene inteiro	AO bilateral; ausência da hipófise, nervo óptico, quiasma, e tratos; genitália superdesenvolvida e micrognatia	<i>De novo</i>	
Microdeleção chr 14, 46,XY,del(14q22.1 –q22.3)	Gene inteiro	AO bilateral, micrognatia, hipogonadismo, hipotireoidismo, retard no crescimento,DD e atraso dentário	<i>De novo</i>	
Translocação equilibrada 46,XY, t(3:14)(q28; q23.2)	Gene inteiro	AO, IGHD, hipófise hipoplásica, ausência de nervos ópticos, quiasma, anomalias auriculares, testículos que não desceram , DD	<i>De novo</i>	(45)
Microdeleção Chr 14:53758044–56834649	Gene inteiro	Extrema MO bilateral	<i>De novo</i>	(41)
Microdeleção Chr14:56268037–57541514	Gene inteiro	AO bilateral, DD (Talvez devido ao trauma craniano)	<i>De novo</i>	(41)
Microdeleção Chr14:56006531–58867091 (NC_000014.7)	Gene inteiro	MO direito e AO esquerdo; DD, IGHD e hipoplasia da hipófise	<i>De novo</i>	(42)
Duplicação de 14q22.3–q23.3 inserção no13q21	Gene inteiro	síndrome branchiootorenal e espectro oculoauriculovertebral: atraso de desenvolvimento , microcefalia, micrognatia , do lado direito, hipoplasia do nervo óptico, perda auditiva , DD significativa	Pai	(52)

OTX2, orthodenticle *Drosophila* homolog 2; AO, anoftalmia; MO microftalmia; LCA, amaurose congênita de leber; DD, atraso no desenvolvimento; DGH, Deficiência isolada de GH; DHHM, deficiência hipofisária hormonal múltipla. Descrição das mutações baseia - se na sequência de referência NM_172337.1, seguido pelas recomendações VPM (WWW.hgvs.org/mutnomen). Posição 1 refere-se à posição A do codon de iniciação ATG para o gene. A nomenclatura pode ser diferente da anotação usada na publicação original.

2.OBJETIVOS

- 1-** Analisar a região codificadora do gene *OTX2* em pacientes portadores de DGH isolada ou associada a outras deficiências hormonais.
- 2-** Correlacionar os achados moleculares com o fenótipo dos pacientes afetados, especialmente as características clínicas, os dados hormonais e a descrição da imagem à ressonância magnética da região hipotálamo-hipofisária.
- 3-** Descrever a prevalência das variantes alélicas no gene *OTX2* em pacientes com anormalidades hipofisárias.

3. CASUÍSTICA

Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela comissão de ética para análise de projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº0270/10. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes ou responsáveis antes do início dos procedimentos da pesquisa.

Pacientes

Foram selecionados 158 pacientes com hipopituitarismo congênito sem diagnóstico etiológico estabelecido e sem malformações oculares do tipo micro ou anoftalmia, acompanhados na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os pacientes com mutações nos genes *GH1*, *GHRHR*, *PROP1* ou *HESX1* foram excluídos do estudo, exceto aqueles com mutação em heterozigose e que não explicavam o fenótipo.

Os pacientes foram avaliados clinicamente no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas. A altura dos pacientes foi mensurada através de estadiômetro de precisão milimétrica, e o escore de desvio-padrão (Z) da altura foi calculado usando padrões britânicos de referência (53). O peso foi mensurado em balança digital comum. O grau de desenvolvimento puberal foi avaliado de acordo com a classificação de Tanner.

A idade óssea foi determinada no RX simples de mão e punho de acordo com o método de Greulich & Pyle(54).

Controles

Duzentos indivíduos adultos brasileiros de ambos os sexos, saudáveis e sem histórico de alteração do crescimento ou desenvolvimento, provenientes de um banco de DNA de controles do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular- LIM/42, foram rastreados para as variantes alélicas identificadas no gene *OTX2*.

4.MATERIAIS E METODOS

Avaliação hormonal

As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, utilizando-se o método de radioimunoensaio para dosagem sérica da testosterona (T) e do sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA). As dosagens de estradiol (E2), gonadotrofinas (LH e FSH), T3, T4 total, T4 livre (T4L), TSH, prolactina (PRL) e cortisol foram realizados por ensaio imunofluorométrico com kits AutoDelfia (Wallac, Turku, Finlândia). Inicialmente, a dosagem do GH foi determinada pelo método imunoradiométrico (IRME) e a partir de 1994, pelo método imunofluorimétrico (IFME) com anticorpos monoclonais (AutoDELFIA, Wallac, Turku, Finland). As concentrações de IGF-1 e IGFBP-3 foram determinadas por radioimunoensaio (DSL. Webster, TX, USA) ou ensaio de quimioluminescência (IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA).

A avaliação hormonal hipofisária foi realizada através de dosagens séricas basais e testes dinâmicos. As dosagens basais de IGF-1, IGFBP-3, T (sexo masculino) ou E2 (sexo feminino), LH, FSH, SDHEA, cortisol, PRL, T3, T4, T4L e TSH foram realizadas. O teste de estímulo da secreção de GH com a administração oral de clonidina ($100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ de superfície corporal) com coletas de sangue para dosagem do GH nos tempos basal, 60, 90 e 120 minutos após a administração da medicação. O teste combinado que consiste na administração intravenosa de 0,05-0,1U/kg de peso de insulina regular, 200 μg IV de TRH e 100 μg de GnRH, com coletas de sangue periférico para dosagem de glicemia, GH, cortisol, TSH, PRL, LH e FSH nos tempos -15

minutos e basal, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração das medicações.

Deficiência de GH foi definida pelos valores máximos após os testes de estímulo com clonidina e após hipoglicemia abaixo de 7ng/mL (IRME) e 3,3ng/mL (IFME) (55). Resposta de cortisol após hipoglicemia ou ACTH sintético foi considerada normal quando o pico foi maior ou igual a 18µg/dL. Deficiência de ADH foi considerada nos pacientes com densidade urinária menor que 1010 e volume urinário maior que 50 ml/kg em 24h e/ou naqueles com prova de privação hídrica compatível com diabetes insipidus neurogênico. Deficiência de TSH foi definida como T4L baixo associado a TSH normal ou baixo e cuja resposta no teste possa também ter evidenciado padrão hipotalâmico. Deficiência de gonadotrofinas é definido como T ou E2 baixos associado a LH e FSH normais ou baixos (com idade acima de 13 anos para meninas e 14 anos para meninos).

Estudo Molecular

O estudo molecular foi realizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Extração de DNA genômico

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico ou esfregaço de mucosa oral de pacientes e indivíduos controles pela técnica de *salting out*(56). Para a extração do DNA a partir de leucócitos de sangue periférico, foram coletados 15 mL de sangue venoso em ácido etileno diaminoacético (EDTA). O botão leucocitário foi obtido a partir da

lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se um volume de solução de lise (NH_4Cl a 114 mM, NH_4HCO_3 a 1 mM) duas vezes maior que o volume de sangue, incubado a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 4.000 g, sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido uma vez. O botão de células brancas foi suspenso em 9 mL de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 180 μL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 μL de proteinase K na concentração de 10 mg/mL (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), e incubado a 37°C por 18 horas. Após este período, foi adicionado 3,6 mL de solução saturada de NaCl a 6 M, seguido de agitação vigorosa durante 15 segundos e centrifugação por 15 minutos a 4.000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo. Em seguida, lavado em etanol a 70% durante 5 minutos, repetindo-se a operação por mais três vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto, seguido de secagem por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após o procedimento, o DNA foi ressuspenso em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

Após a coleta de esfregaço da mucosa oral, foi adicionado 200 μL de TES (Tris HCl 10mM pH7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e 5 μL de proteinase K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aos tubos contendo o swab oral (escova) e incubado por 2 horas a 42°C. Após a incubação, a escova foi desprezada, obtendo-se um volume de

±250µL em que foi adicionado 42µL de NaCl saturado e em seguida realizada agitação manual vigorosa e centrifugação por 1 minuto a 15.000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto. Os tubos foram agitados por inversão e centrifugados por 1 minuto a 15.000g. O etanol absoluto foi descartado e foi adicionado 1mL de etanol 70% invertendo-se o tubo diversas vezes para lavar o DNA (pellet). Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000g e desprezado o sobrenadante. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais uma vez e assim como uma lavagem com etanol absoluto. Após desprezar o sobrenadante, os tubos permaneceram abertos por 30 minutos para secagem e evaporação do etanol residual, e a seguir o pellet foi ressuspendido em 60µl de TE (10:0, 1).

A concentração do DNA extraído foi obtida através da leitura em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Foi estabelecido que a relação de 1,8 entre as leituras de 260 e 280 nm como a ideal para a caracterização da pureza do material. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris – acetato 0,004 M , EDTA 0,001 M, pH 8,0) a fim de verificar sua integridade.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A sequência genômica do *OTX2* (genebank NM_172337.1/ Ensembl ID ENST00000408990) possui 5 exons, sendo apenas 3 deles traduzidos (exons 3, 4 e 5). Os exons 1 e 2 são transcritos e não traduzidos. Os *primers* foram desenhados na região intrônica a fim de incluir a região codificadora e as

junções intron-exon dos exons 3, 4 e 5 do *OTX2*, nesse texto denominado como exons 3, 4, 5a e 5b (Tabela 2).

Tabela 2- *Primers* para amplificar o gene *OTX2*

Exons	Primer	Localização dos <i>primers</i> na sequência NM_172337.1	Fragmento (pb)
3	S- TTTAAAAGCCTCTGCCTCG	5374-5892	409
	R- GAACAGGGTGTTCATCC	5768-5782	
4	S-GAGAGCATTGGTAGGCTCC	6580-6598	372
	R-TCTCCACAGTCCCATACTCG	6932-6951	
5a	S-GAGCCATTCTTGTCTTAAGG	8652-8672	451
	R-GAAGCTGGTGATGCATAG	9084-9102	
5b	S- CCACTGTCAGATCCCTTGT	8939-8958	471
	R-AATGCCTGGCTAAACTGG	9391-9409	

S=sense, R= reverse

Para cada reação de PCR, como descrito na tabela 3, foram usados 100 ng DNA genômico amplificado em um volume de 25 ul contendo 10 pmol de primers sense e reverse, 200 µM dNTP, 2,5 U Taq (Promega), 1X buffer (Promega).

Tabela 3- Condições da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Ciclos	Temperatura de <i>Annealing</i>	Tempo	Característica
1X	95C	4 min	denaturação
	95C	30 seg	denaturação,
30 X	55C ou 63*	30 seg	anelamento de <i>primer</i>
	72C	30 seg	extensão
1x	72 C	7 min	extensão final

* exon 1

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% para assegurar visualização da banda específica e/ou a existência de produtos inespecíficos comparados com um marcador padrão 1Kb (Invitrogen).

Purificação e Seqüenciamento automático pelo método de Sanger

Os fragmentos amplificados foram submetidos ao seqüenciamento direto automático pelo método de Sanger (57), que consiste na terminação de cadeia com dNTP modificado com dideoxi utilizando-se o kit *ABI Fsm BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, Inc., Foster City, EUA), com os *primers* descritos na tabela 2. Os produtos de PCR foram analisados no seqüenciador automático de DNA - ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems the Perkin Elmer Corporation CN, Foster City, EUA). Os eletroferogramas foram analisados pelo software Sequencher 4.8 (Ann Arbor, MI, USA)

Digestão Enzimática

Os produtos de PCR de 470 pb selvagem e mutante relativos ao exon 5 foram submetidos a clivagem pela enzima de restrição BclI de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. Dez µl de produto de PCR foram digeridos com a enzima num volume final de 20 µl. Após 16hs em temperatura a 37C o produto de digestão foi corrido em gel de agarose a 2% corado com syberdye (Invitrogen) e visualizado em sistema de captação digital, 3 UV transiluminator, fabricante: Ultra Lum INC, modelo:Ultra Cam A650

Análise das variantes alélicas por bioinformática

Todas as variantes alélicas encontradas foram avaliadas para checar descrição prévia como polimorfismo através da busca em bancos de dados do *Genecards* (www.genecards.org), *1000 Genomes* (browser.1000genomes.org), *NCBI SNP Database* (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/).

A conservação do aminoácido em diferentes espécies através de alinhamento foi avaliado pelo programa *UniProt* (www.uniprot.org/help/sequence-alignments). O potencial deletério da mutação foi avaliado pela ferramenta *Mutation Taster* (www.mutationtaster.org). A avaliação da previsão do sítio de *splicing* pelos programas *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>).

5.RESULTADOS

Estudamos um total de 158 pacientes, sendo 33 com DGHI e 125 pacientes com DHHM. Algumas características clínicas dos pacientes selecionados estão demonstradas na Tabela 4. Observa-se a predominância de pacientes do sexo masculino e uma alta prevalência de NHE.

Tabela 4 – Características fenotípicas, laboratoriais, de imagem e familiar da população estudada

	DGHI n=33	DHMH n= 125
Sexo M:F	21:12	77:44
Z altura inicial	-1,9 a - 8,0	-1,5 a -8,6
Consanguinidade	7	6
Familiares acometidos baixa estatura	8	33
NHE	17	87
Hipoplasia adenohipofise	20	104

A frequência das deficiências hormonais hipofisárias observadas na casuística se encontra na figura 6.

Figura 6 : Deficiência de GH associada a outras deficiências hormonais na casuística estudada

Achados Moleculares

Todos os exons do gene *OTX2* foram adequadamente amplificados nos tamanhos esperados em 158 pacientes.

A variante alélica c.689A>T, p.H230L no exon 5, em heterozigose, foi encontrada em um único paciente com hipopituitarismo. Essa alteração foi descrita como causadora de doença no site *mutation taster*. Também foi descrita no 1000 genome, sob o numero rs144449264. A população avaliada compunha-se de indivíduos europeus_americanos onde a frequência foi de 1 alelo T e 8599 A, que resultou numa frequência do alelo T de 0,000 e do alelo A de 1,000 num total de 8600 alelos, sendo o haplotipo T/T 0,000, T/A 0,000, A/A 1,000.

Oitenta e dois pacientes apresentaram o polimorfismo c.98-70C>A no intron 4 já descritos na literatura como rs2277499. Dezenove pacientes em homozigose e 63 em heterozigose. Esta variação foi validada no 1000 Genomes, assim como no mapeamento Hap Map. O alelo ancestral é o C. A população avaliada compunha-se de indivíduos africanos, americanos e asiáticos. A frequência do alelo C foi de 0,698, do alelo A de 0,308 num total de 2184 alelos (1511 C e 673 A), sendo o haplotipo C/C 0,475, C/A 0,433, A/A 0,092.

A variante alélica c.435C>T foi encontrado em heterozigose em 1 paciente. Essa alteração leva a uma troca silenciosa no exon 5 p.S145S. A análise *in silico* utilizando-se o site *mutation taster* (www.mutationtaster.org) evidenciou essa alteração como um polimorfismo e foi descrito como rs34537598. Esta variação foi validada no 1000 Genomes, assim como no mapeamento Hap Map. O alelo ancestral é o C. A população avaliada compunha-se de indivíduos africanos, americanos, asiáticos e europeus. A frequência do alelo C foi de 0,988, do alelo T de 0,012 num total de 2184 alelos (26 T e 2158 C), sendo o haplotipo T/C 0,024, C/C 0,976.

O polimorfismo c.*10G>A descrito como rs171978 foi encontrado em 12 pacientes em estado de heterozigose. Esta variação foi validada no 1000

Genomes, assim como no mapeamento Hap Map. O alelo ancestral é o G. A população avaliada compunha-se de indivíduos afro-americanos, africanos, americanos, asiáticos e europeus. A frequência do alelo G foi de 0,951 e do alelo A de 0,049 num total de 2184 alelos (2076 G e 108 A), sendo o haplotipo G/G 0,903, G/A 0,095, A/A 0,002.

Dois pacientes apresentavam a variante alélica c.420G>C, em heterozigose, levando a troca silenciosa no exon 5 p. P148P. A análise *in silico* utilizando-se o site *mutation taster* (www.mutationtaster.org) evidenciou que o alelo C encontra-se presente no camundongo, tratando-se portanto, de uma alteração não conservada entre as espécies. A análise *in silico* utilizando o site *human splicing finder* (<http://www.umd.be/HSF/>), não evidenciou alteração no sítio de *exonic splicing enhancer*. Esta variante alélica foi descrita como rs147896150, sendo validada no 1000 Genomes, assim como no mapeamento Hap Map. O alelo ancestral é o G. A população avaliada compunha-se de indivíduos afro-americanos, africanos, americanos, asiáticos e europeus. A frequência do alelo G foi de 1,000 e do alelo C de 0,000 num total de 2184 alelos (2183 G e 1 C), sendo o haplotipo G/G 0,999, G/C 0,001.

Tabela 5- Variantes alélicas encontradas na população estudada

Achados Moleculares		Exon(E)	Estado	Pacientes	rs	Bioinformática
		Intron(I)		n(%)		<i>Mutation taster</i>
cDNA	Proteína					
c.98-70C>A		I4	Hom	19(12%)	rs2277499.	Polimorfismo
c.98-70C>A		I4	Het	63(44%)	rs2277499	Polimorfismo
c.435C>T	p.S145S	E5	Het	1(0,5%)	rs34537598	Polimorfismo
c.*10G>A		E5	Het	12(8%)	rs171978.	Polimorfismo
c.420G>C	p.P148P	E5	Het	2(1,1%)	rs147896150	Polimorfismo
c.689A>T	p.H230L	E5	Het	1(0,5%)	rs144449264	Causadora de doença

Hom=homozigose; Het=heterozigose. Descrição das mutações baseia - se na sequência de referência NM_172337.1, seguido pelas recomendações VPM (WWW.hgvs.org/mutnomen). Posição 1 refere-se à posição A do codon de iniciação ATG para o gene

Quadro Clínico do paciente portador de hipopituitarismo com a variante alélica rara c.689A>T, p.H230L em heterozigose, apontada como causadora de doença

O paciente nasceu de parto pélvico, a termo. Relata a sua genitora que o parto foi difícil e o mesmo apresentou cianose pós natal sendo necessário oxigenioterapia. Apresentou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Aos 10 anos foi observado diminuição na velocidade de crescimento e por isso procurou serviço médico. Seus pais não eram consangüíneos e o pai apresentava estatura de 170 cm, -0,7 DP e a mãe 150 cm, -2,0 DP. O paciente é o filho caçula de uma prole de 6, sendo 2 irmãs e 3 irmãos. Na primeira avaliação no ambulatório de endocrinologia do desenvolvimento, o paciente estava com 15 anos e 2 meses com altura de 130 cm (-4,8 DP) peso de 27,4 Kg e a IO atrasada era compatível com 7 anos. Ao exame físico apresentava genitália pré-púbere e P1 de pêlos axilares. Não apresentava malformação ocular e por negar sintomas de diminuição de acuidade visual não foi

submetido a avaliação oftalmológica detalhada. Na investigação da baixa estatura foi realizado teste combinado de estímulo com ITT insulina + GnRH + TRH e evidenciado deficiência de GH, ACTH, LH, FSH e TSH com padrão de resposta hipotalâmica com T4L basal 0,6 ng/dL (Tabela 6). Diante do diagnóstico de deficiência hormonal múltipla, foi iniciado o tratamento de reposição hormonal com LT4 50mcg/d, acetato de cortisona 5 + 2,5 mg e GH 0,1U/Kg/dia.

A Ressonância magnética da região hipotálamo-hipofisária evidenciou neuroipófise ectópica e transecção de haste (Figura 7).

Durante o primeiro ano de tratamento com GH apresentou velocidade de crescimento de 13 cm/ano. Aos 16 anos e 11 meses, diante da ausência dos caracteres sexuais secundários evidenciando hipogonadismo, foi iniciado reposição de testosterona para induzir a puberdade. Aos 18 anos e 8 meses interrompeu seguimento no ambulatório, interrompendo o tratamento de GH com estatura de 154.8 (- 2.9 DP)

Figura 7 – Ressonância Magnética de Sela túrcica : A- Corte Sagital evidenciando hipoplasia hipofisária (seta curta), haste não visualizada; B- Corte coronal com corte Neurohipofise ectópica.

Tabela 6- Dosagens hormonais em diferentes tempos no teste de estímulo combinado com insulina (ITT)+GnRH+TRH

Tempo (min)	-30	0	15	30	45	60	90
Glicose mg/dL	74	78	27	76	25	84	48
GH ng/mL	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Cortisol mcg/dL	1,8	2,8	4,2	4,8	3,9	2,9	2,6
LH mU/mL	<0,6	<0,6	<0,6	<0,6	<0,6	<0,6	<0,6
FSH mU/mL	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	1,1	1,2	1,3
TSH uU/mL	2,1	2,04	9,04	17,27	18,35	19,61	20,52
PRL ng/mL	29,4	25,1	58,7	72,5	68,3	65,3	57,3

T4L 0,6 ng/dL (VN- 0.60 - 1.54 ng/dL) IGF1 15 ng/mL (VN- 335-802 ng/ml), IGFBP3 1,3 mg/L (VN- 1,49-10,85), SDHEA<36,8 ng/mL(VN- 450 a 1728 ng/mL), T 20 ng/dL (VN- 271 a 965 ng/dL)

Eletroferograma da variante c.689A>T, p.H230L em heterozigose no paciente portador de hipopituitarismo

Observa-se na figura 8 o achado molecular da variante alélica c.689A>T, na seqüência do eletroferograma utilizando o programa sequencher.

Figura 8: Eletroferograma com sequencia normal (painel acima) e com a variante alélica em heterozigose c.689A>T, p.H230L (painel abaixo)

Avaliação da variante c.689A>T, pela enzima de restrição Bccl

A enzima Bccl reconhece o sítio de clivagem (CCAT) na seqüência selvagem (Figura 9), portanto após amplificação de um produto de PCR de 470 pares de bases a enzima gera 2 fragmentos de 249 pb e 221 pb, após digestão. O alelo mutante perde o sítio de restrição e com isso gera apenas 1 fragmento de 470 pb. O fragmento do paciente com a mutação em heterozigose apresenta 1 fragmento de 470 pb (alelo mutado) e 2 fragmentos de 249 pb e 221 relativos ao alelo selvagem (Figura 10A).

Figura 9- Representação esquemática da escolha da enzima de restrição para rastreamento da variante alélica. Em vermelho encontra-se a sequência reconhecida pela enzima BclI (CCATC). A troca de uma base A por T leva a perda do sítio de restrição.

Análise da presença da variante c.689A>T, p.H230L na família do paciente e na população normal

A presença da variante alélica c.689A>T foi avaliada por enzima de restrição nos pais, nos irmãos, tios e primos maternos confirmados por seqüenciamento automático. A segregação da variante alélica na família evidenciou 8 parentes não afetados portadores da alteração molecular – II.5, II.9, II.10, II.12, II.14, III.11, III.13, III.18 (Figura 10B). Os familiares não tinham história de tratamento para deficiência hormonal e eram fenotipicamente normais, exceto o pai (II.4) e o sobrinho (IV.9) que apresentavam polidactilia assim como o paciente (III.16). A variante alélica foi rastreada pela enzima de restrição BclI em 200 controles normais e não foi encontrada em 400 alelos na população brasileira.

A

Figura 10: A- Gel de agarose a 2% com o produto de PCR de 470 pb após a digestão enzimática com Bccl. M: Marcador Peso Molecular, Nnd: Controle normal não digerido, Nd: Controle normal digerido, Mnd: Mutante não digerido.

B

Figura 10: B- Heredograma da família com presença da variante alélica em heterozigose em 8 parentes não afetados portadores da alteração molecular: II.5, II.9, II.10, II.12, II.14, III.11, III.13, III.18, sendo o caso índice III.16 apontado por uma seta.

Análise da conservação dos amino ácidos nas diferentes espécies

Espécie	Alinhamento
Humano	LSPMG TNAVTS H LNQSPASLS T Q G
Mutante	LSPMG TNAVTS L LNQSPASLS T
Chimpanzé	LSPMG TNAVTS H LN
Macaco	LSPMG TNAVTS H LN
Gato	LSP - GTSVVNS H LNQSPASLS T Q
Camundongo	LSPMG TNAVTS H LN
Fungu	LSPMTASSMSG H P H H I S Q S S G H H H H H H H Q
Elegans	PTS H LG - FPSNVG S H
Drosófila	Não Homologo
Galo	Não Homologo
Xenopus	Não Homologo
Zebrafish	Não Homologo

Figura 11: Alinhamento dos amino ácidos entre as diferentes espécies: O aa Histidina é altamente conservado entre as espécies. Site *mutation taster* (www.mutationtaster.org)

6.DISSCUSSÃO

O gene *OTX2*, um ortólogo vertebrado da *Drosófila* Orthodenticle (OTD) no camundongo, gera uma proteína da classe de homeodomínio responsável pelo desenvolvimento hipofisário assim como pelo desenvolvimento de órgãos sensoriais como as células olfativas do nariz (11), o gânglio coclear do sistema auditivo (12), as células da retina fotorreceptora (13) e o domínio anterior da placa ótica (14).

Os primeiros defeitos genéticos descritos que afetam o gene *OTX2* foram deleções intersticiais no cromossomo 14, região 14q22, em associação com anoftalmia e anormalidades hipofisárias, seguida pela publicação de Ragge *et al* (40) que identificaram as primeiras oito mutações após rastreamento de uma coorte de 333 pacientes com microftalmia anoftalmia e / ou coloboma. Nos anos seguintes, vários outros estudos de seqüenciamento do gene *OTX2* foram realizados em pacientes com malformações oculares graves (45, 46). Até a presente data, 29 diferentes mutações no *OTX2*, todas em heterozigose foram descritas em 32 pacientes não relacionados (6). O quadro clínico dos pacientes portadores de mutações no gene *OTX2* é bem variável e pode cursar apenas com malformações oculares (45-47, 53, 58) ou pode estar associado com DGH isolado ou múltiplo, além de hipófise normal ou hipoplásica, neurohipófise tópica ou ectópica (42, 47, 48, 50, 51, 53, 59), sendo apenas a mutação c.674A>G- p.N225S descrita em 2 pacientes distintos portadores apenas de hipopituitarismo e sem alteração ocular (51).

No presente estudo, analisamos o gene *OTX2* em 158 pacientes com deficiência hormonal isolada ou múltipla, sendo 125 pacientes com DHHM, 33 DGH. A análise molecular evidenciou a presença de 5 variantes alélicas já

descritas e validadas no SNP databank. Todas as variantes foram submetidas a análise *in silico* e 4 delas avaliadas como sendo polimorfismo. A variante alélica c.689A>T, p.H230L, em heterozigose, no exon 5, evidenciou na análise *in silico* uma alteração predita como casadora de doença. A análise dessa variante nos familiares evidenciou 8 indivíduos normais carreadores dessa alteração, sugerindo uma herança autossômica dominante com padrão de penetrância incompleta. Outros relatos de padrão de penetrância incompleta, foram descritos em pacientes com mutações em heterozigose no OTX2 em pacientes com malformação ocular associado ou não a deficiência de GH isolado (40, 60). Foram descritos também mutações nos genes *HESX1* e *GLI2* associado a várias deficiências hormonais hipofisárias, presença de displasia séptico óptica, defeitos cerebelares e DHHM, respectivamente (41, 60-63), com padrão de penetrância incompleta. Essa característica já tinha sido observada nos modelos animais, pois embriões de camundongo heterozigotos para o gene *Otx2* analisados no dia embrionário 18.5, exibem fenótipo variável de acordo com o *background* genético podendo apresentar desde fenótipo normal até graves anomalias. Algumas possibilidades para explicar a penetrância incompleta e a expressividade altamente variável da doença nas famílias pode se dever a um padrão complexo de herança combinando múltiplos fatores que tem interações ambientais e genéticas, tais como variantes em outros *loci* ou uma herança digênica como no hipogonadismo (64) .

O paciente do estudo em questão, portador da variante alélica c.689 A> T, p.H230L, apresenta a troca de um aminoácido histidina (aa polar) por uma leucina (aa hidrofóbico) na posição 230 e essa troca é altamente prejudicial para a estrutura da proteína. Essa variante alélica assim como a mutação

encontrada por Diazoc et al (51) c.674A>G, p.N225S localiza-se no domínio de transativação da proteína. Os estudos funcionais dessa mutação no domínio de transativação realizados por Diazoc *et al*, (51), evidenciaram a perda da sua capacidade de ativar o promotor do gene *HESX1*, que por sua vez é um repressor da transcrição e o seu funcionamento adequado está relacionado a diferenciação terminal das linhagens hipofisárias. Vale salientar que os 2 pacientes não relacionados descritos por Diazoc et col. (51) apresentavam uma mutação *de novo*, em heterozigose, associado a um quadro de DHHM, neuroipófise ectópica, com ausência de malformação ocular, sugerindo que essa região da proteína deva ser mais importante na diferenciação celular hipofisária do que no desenvolvimento ocular.

Parece haver uma clara relação entre a localização das mutações relatadas e o fenótipo clínico. As mutações na região o terminal-N associam-se com malformações oculares muito graves sem fenótipo hipofisário, enquanto, as mutações localizadas na extremidade C-terminal são associados a malformação hipofisária e DHHM. Todos os pacientes descritos com DHHM e DGH têm suas mutações no exon 5, exceto a p.Lys74SerfsX30 (K74fs). Embora muitos pacientes tenham retardo do crescimento ou problemas de desenvolvimento durante a infância, a maioria deles são nascidos com peso e comprimento dentro da faixa normal, assim como o nosso paciente. Pacientes com baixa estatura, DHHM, DGH apresentam alterações no domínio da família OTX levando a um sinal de retenção nuclear. Pesquisas adicionais são necessárias para proporcionar uma melhor compreensão das diferentes regiões funcionais de OTX2. As alterações no OTX2 afeta predominantemente o sexo masculino, além disso, não parece haver qualquer relação entre a

localização das mutações e sua herança (herança, paternal ou maternal de novo).

A neuroipófise ectópica (NHE) é um achado comum em pacientes portadores de hipopituitarismo, e pode ser considerado um marcador de disfunção hipofisária apesar de indefinida a sua base fisiopatológica (65, 66). Mutações descritas em fatores de transcrição como HESX1, LHX4, GLI2, SOX3 e SOX2 em pacientes com hipopituitarismo podem estar associadas à NHE (58, 67-70), porém são raras, esclarecendo a base molecular em apenas uma pequena porcentagem destes pacientes (71). Os pacientes portadores de NHE apresentam um espectro clínico bastante variável, que pode cursar desde deficiência de hormônio do crescimento isolada (DGHI) ou associada a outras deficiências hormonais hipofisárias. Um importante fator de confusão na patogênese da NHE consiste na definição da relação causal entre trauma perinatal e hipopituitarismo. Uma das teorias é o trauma perinatal levando a transecção da haste hipofisária, e conseqüentemente NHE e hipopituitarismo, entretanto isto não explicaria todos os casos. A outra teoria é que defeitos durante a embriogênese possam ser responsáveis por alterações na região hipotálamo-hipofisária e ainda por partos complicados (66, 68, 71-74), portanto não podemos definir qual foi o mecanismo que levou ao quadro de NHE no paciente portador da variante alélica rara c. 689 A> T, p.H230L no gene *OTX2* do presente estudo, pois o mesmo apresentou parto traumático com hipoxia perinatal e necessidade de oxigenioterapia e a sua mutação encontra-se numa região importante para o desenvolvimento hipofisário.

Apesar de a variante alélica c.689A>T, p.H230L não ter sido encontrado num total de 400 alelos da população brasileira, a sua descrição no 1000 genome, em

indivíduos europeus_americanos, numa frequência de 1 alelo T em 8600 e nenhuma alteração na população de indivíduos africanos_ americanos, sugere a raridade desse achado e talvez se expandissemos a nossa casuística dos controles, pudéssemos encontrar a mesma alteração.

O fato de a variante estar localizada numa região altamente conservada entre as espécies, sugere que a mesma seja causadora do fenótipo em questão, porém não podemos descartar que outros moduladores genéticos possam ser responsáveis pela penetrância incompleta e por isso será necessário complementar a investigação com o estudo funcional de transfecção transitória para determinar se se trata de perda de função ou efeito negativo dominante de genes alvos expressos em ectoderme oral ou neural, assim como a análise do exoma do paciente.

7.CONCLUSÃO

O estudo molecular para definir a presença de mutações no gene *OTX2* evidenciou:

- 1- A análise da região codificadora do gene *OTX2* em 158 pacientes portadores de DGH isolada ou associada a outras deficiências hormonais evidenciou uma única variante alelica em heterozigose c.689A>T, p.H230L, com residuo altamente consevada entre as diferentes especies e predita como causadora de doenca pela analise in silico, em um único paciente com hipopituitarismo e neurohipofise ectopica, sugerindo que alteracoes no *OTX2* seja uma causa rara de doença na população estudada.
- 2- O padrão de herança autossômica dominante com penetrância incompleta encontrada na familia com a variante alelica em heterozigose c.689A>T, p.H230L assim como no modelo animal com nocaute de *Otx2* sugere que isso se deva a interações gene- gene sugerindo doença de herança digênica.
- 3- Todas as alterações moleculares encontradas na coorte de 158 pacientes com hipopituitarismo foram decritas e validadas como polimorfismo em bancos de dados, sendo que 4 delas foram descritas como polimorfismo sem efeito deleterio na analise in silico.

8.ANEXOS

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DGHI

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto		MRI		Exon		Variante alélica do OTX2	Estado
							Perinatal	Adeno	Neuro	Haste	Intron			
1	M	11,92	-3,3	1,6	CES	ND	PE	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het	
2*	M	11,71	-2,7	-0,9	ND	ND	MEC	H	T	HI	I4	c.98-70C>A	Het	
3	F	7,05	-3,3	-0,9	CES	ND	ND	ND	T	HI	I4	c.98-70C>A	Het	
4	M	7,89	-2,8	0,2	CES	CEF	TPPS	H	E	HI	/	/	/	
5	M	7,55	-3,8	0,4	VAG	CEF	ND	ND	T	HI	Ex5	c.*10G>A	Het	
6	M	1,95	-4,8	ND	VAG	CEF	P	H	T	HI	/	/	/	
7	F	10,35	-8,0	-1,2	ND	ND	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het	
8	F	6,75	-5,8	-0,8	VAG	CEF	ND	H	E	TR	/	/	/	
9	F	1,80	-7,4	ND	CES	CEF	ND	H	T	HI	I4	c.98-70C>A	Hom	
10	M	15,85	-5,0	-0,3	VAG	CEF	HS	H	T	HI	I4	c.98-70C>A	Het	
11	M	15,73	-4,2	0,1	CES	ND	ND	H	T	HI	I4	c.98-70C>A	Het	
12	F	12,47	-4,1	0,0	VAG	CEF	ND	H	T	HI	/	/	/	
13	F	12,22	-5,7	1,8	CES	ND	HS1TG	H	E	NV	/	/	/	
14	M	10,52	-4,9	-2,9	CES	Outros	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Hom	
15	M	9,77	-2,1	1,4	VAG	ND	ND	ND	T	HI	/	/	/	

CES= Cesária; VAG= Vagina; ND= Não Disponível; CEF=Cefálico; PE= Pré-Eclâmpsia; MEC= Mãe Etilista Crônica; TPPS= Trabalho de Parto Prematuro e Sangramento; P=Prematuridade; HS1TG= HAS, Sangramento 1 trim da gravidez; H=Hipopláscia; E= Ectópica; T= Tópica; NV= Não Visualizada; HI= Integra; TR= Transecção; I= Intron; Ex= Exon; Het= Heterozigose; Hom= Homozigose; ;* Displasia sépto óptica;

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DGHI

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto		MRI			Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
							Perinatal	Adeno	Neuro	Haste				
16	M	3,17	-4,0	-1,9	CES	ND	PE	ND	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het	
17	M	10,49	-3,6	-0,2	CES	ND	ND	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Het	
18	F	2,45	-4,0	-0,9	VAG	ND	ND	ND	T	HI	I4	c.98-70C>A	Het	
19	F	5,59	-3,6	-2,0	CES	CEF	O	H	E	A	I4	c.98-70C>A	Het	
20	F	20,90	-4,2	-0,5	VAG	ND	ND	ND	ND	ND	I4	c.98-70C>A	Hom	
21	M	8,30	-4,3	-1,1	VAG	CEF	PP	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het	
22^	M	10,52	-1,9	1,3	CES	ND	ND	ND	ND	ND	/	/	/	
23	M	14,54	-3,7	-3,6	VAG	ND	ND	ND	E	NV	/	/	/	
24	M	2,32	-1,9	0,6	CES	CEF	ND	ND	T	HI	I4	c.98-70C>A	Het	
25	M	10,45	-3,7	0,7	CES	CEF	ND	ND	E	HI	I4	c.98-70C>A	Het	
26	M	11,93	-3,3	-0,3	CES	CEF	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het	
											Ex5	c.*10G>A	Het	
27	M	10,82	-4,8	-0,4	VAG	Outros	IC	H	NV	TR	/	/	/	
28	F	10,30	-4,5	0,5	VAG	ND	ND	ND	T	HI	/	/	/	
29	M	5,13	-3,7	-0,2	VAG	CEF	AP	ND	E	A	I4	c.98-70C>A	Het	

CES= Cesária; VAG= Vagina; c; ND= Não Disponível; CEF=Cefálico , PE= Pré-Eclâmpsia; O= Oligodrâmnio; PP= parto prolongado; IC= Ictericia; H=Hipoplástica; E= Ectópica; T= Tópica; NV= Não Visualizada; HI= Integra; TR= Transecção; A= Afilada; /= sem alteração; I= Intron; Ex= Exon; Het= Heterozigose; Hom= Homozigose;

^Apesar de ter um pequeno desvio, não respondeu no teste de estímulo com pico GH= 1 e a VC primeiro ano foi 12 cm.

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DGHI

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	Adeno	MRI Neuro	Haste	Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
30**	F	31,28	-5,4	-1,4	ND	ND	ND	H	E	A	I4 Ex5	c.98-70C>A c.*10G>A	Het Het
31	M	7,09	-2,9	1,6	CES	ND	ND	H	E	PV	I4	c.98-70C>A	Het
32	F	9,49	-2,0	0,4	VAG	CEF	ND	ND	T	HI	/	/	/
33	M	6,69	-4,5	-0,7	VAG	CEF	ND	H	E	A	I4	c.98-70C>A	Het

CES= Cesária; VAG= Vagina; CEF= Cefálico; ND= Não Disponível; H=Hipopláscica; E= Ectópica; T= Tópica; PV= Parcialmente Visualizada; HI= Integra; TR= Transecção; A= Afilada; PV= Parcialmente Visualizada; /= sem alteração; I= Intron; Ex= Exon; Het= Heterozigose; Hom= Homozigose;

** Redução volumétrica do quiasma e nervo óptico a direita

ANEXO II

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHHM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	Adeno	MRI Neuro	Haste	Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
1	M	17,57	-7,7	-1,7	CES	Outros	AHP	H	E	TR	/	/	/
2	F	12,21	-7,3	1,5	VAG	CEF	ND	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het
3	M	10,69	-4,2	0,2	VAG	Outros	AN/HP	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
4	M	14,98	-2,9	-1,3	VAG	Outros	ND	H	E	A	I4	c.98-70C>A	Het
5	M	16,57	-4,6	-3,2	VAG	Outros	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
6	F	4,64	-4,3	0,0	CES	ND	ND	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het
7 ^{^^}	M	20,56	-1,5	-1,8	VAG	CEF	ND	H	T	HI	I4	c.98-70C>A	Het
8	M	16,21	-6,3	-1,2	ND	Outros	ND	H	E	NV	/	/	/
9	F	7,55	-4,8	-0,9	VAG	Outros	ND	H	E	NV	/	/	/
10	F	6,60	-3,0	1,1	VAG	CEF	ND	H	T	A	I4	c.98-70C>A	Hom
11	F	0,64	-2,9	ND	CES	CEF	C/HIP	H	NV	NV	I4	c.98-70C>A	Het
12	F	6,59	-3,3	1,9	ND	ND	ND	H	E	A	I4	c.98-70C>A	Het
13	M	12,62	-6,2	-2,0	VAG	CEF	ND	H	E	NV	/	/	/
14	M	10,29	-4,3	-0,1	CES	ND	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
15	F	15,89	-2,5	-1,2	CES	CEF	C/HIP	H	E	TR	Ex5	c.435C>T	Het

CES-Cesária; VAG-Vaginal; CEF- Cefálico; ND= Não Disponível; AHP-Aspiração HoraParto; C-Convulsões; HIP- Hipoglicemia; AN- Anóxia; HP- Hipotermia; H- hipoplásica; E- ectópica; T- Tópica; NV= Não Visualizada; TR- Transsecção de Haste; HI - Haste Inteira; A= Afilada; I-Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose; ^^ -Paciente iniciou tratamento em outro serviço e não temos disponível a altura no início do tratamento.

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHMM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	MRI			Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
			Altura Inicial					Adeno	Neuro	Haste			
16*^	F	16,93	-6,4	-1,5	VAG	PEL	AN	H	E	TR	/	/	/
17	F	2,64	-4,1	0,0	CES	CEF	ND	H	E	NV	/	/	/
18	M	1,08	-2,2	-0,61	CES	ND	C/HIP	H	NV	NV	I4	c.98-70C>A	Hom
19	M	14,71	-3,2	-0,9	VAG	CEF	IC/MF	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Het
											Ex5	c.*10G>A	Het
20	F	4,13	-3,1	0,7	CES	CEF	MUSG/IP	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het
21	F	10,80	-4,6	-2,2	CES	Outros	HPO/IC	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het
22	M	6,10	-5,5	1,4	VAG	Outros	GA	H	NV	A	Ex5	c.*10G>A	Het
23	M	7,65	-3,0	2,2	VAG	Outros	FC	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Het
24	M	15,76	-6,2	-3,8	VAG	ND	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
25	F	7,10	-5,1	-0,3	CES	ND	SN	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het
29	F	4,06	-5,3	ND	CES	ND	ND	H	E	NV	/	/	/
30	M	18,67	-6,3	-3,2	VAG	Outros	ND	H	E	A	I4	c.98-70C>A	Het
31	M	9,22	-4,7	ND	VAG	CEF	IC	ND	ND	ND	I4	c.98-70C>A	Hom

CES-Cesária; VAG-Vaginal; CEF- Cefálico; PEL -Pélvico; ND= Não Disponível; AN- Anóxia; C-Convulsões; HIP- Hipoglicemia; IC- Ictericia;MF- Mãe Fumante; MUSG-Mioma uterino,Sangue na gestação; IP- infecção perinatal; HPO- Hipóxia; GA- Genitália Ambigua; FC-Fratura Cravicular; SN- Sêpse Neonatal; H- hipoplásica; E- ectópica; NV- Não visualizada;TR- Transsecção de Haste; HI - Haste Inteira; A= Afilada; I-Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose;

*^procurou serviço com 16ª 11m Altura 124, Z alt=-6,4 sem tratamento prévio de hipopituitarismo

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	Adeno	MRI Neuro	Haste	Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
32	M	11,46	-5,1	-1,6	VAG	Outros	FU D	H	ND	A	I4	c.98-70C>A	Het
33	F	21,89	-3,8	-1,6	VAG	Outros	MI/CI	H	E	TR	/	/	/
34	F	30,33	-7,5	-2,6	AD	AD	ND	ND	T	TR	/	/	/
35	M	12,78	-4,3	-1,4	F	CEF	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
36	M	2,96	-6,7	-0,9	CES	ND	ND	H	E	TR	EX5	c.*10G>A	Het
37	F	21,59	-7,4	-0,7	VAG	CEF	F / GB	H	E	TR	/	/	/
38	M	19,06	-7,2	-2,8	VAG	CEF	ND	ND	E	TR	/	/	/
30	M	28,71	-5,6	0,3	VAG	Outros	IN	H	E	A	/	/	/
40	M	16,45	-5,0	1,0	CES	CEF	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
41	M	1,43	-4,5	ND	VAG	Outros	CI/ FPBE/FUD	ND	NV	HI	I4	c.98-70C>A	Het
42	M	15,09	-5,7	-2,2	VAG	CEF	PD	H	NV	NV	/	/	/
43	M	10,52	-2,0	-1,8	VAG	CEF	ND	H	E	TR	/	/	/
44	M	7,38	-3,7	-0,1	VAG	Outros	CI	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
45	M	12,48	-4,6	-2,4	VAG	Outros	ND	H	E	NV	/	/	/
46	F	12,24	-4,2	-1,0	VAG	CEF	ND	H	ND	HI	/	/	/

CES-Cesária; VAG-Vaginal; AD- Adotada; F- Forceps; CEF- Cefálico; CI- Cianose; FPBE-fratura de plexo braquial esquerdo; FUD - fratura úmero direito; MI- Mioma;
GB- Gemelar Bivitelíneo; IN-infecção Neonatal; ND= Não Disponível; PD- Parto Difícil; H- hipoplásica; T- Tópica; E- ectópica; NV- Não visualizada; TR- Transsecção de Haste;
HI - Haste Inteira; A- Afilada; I-Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose;

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	Adeno	MRI Neuro	Haste	Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
47	F	11,23	-2,8	0,6	VAG	CEF	ND	H	NV	A	/	/	/
48	M	5,92	-4,4	-0,2	F	ND	C	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Hom
49	M	39,82	-4,0	-2,7	ND	ND	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
50	M	18,38	-7,3	-3,2	VAG	CEF	ND	ND	ND	ND	/	/	/
51	F	13,48	-5,3	-1,1	VAG	PEL	FC	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Hom
52	M	8,20	-5,5	-1,4	F	CEF	C	H	E	TR	/	/	/
53	F	16,85	-6,0	-0,1	D	ND	ND	H	T	HI	I4	c.98-70C>A	Hom
54	F	3,01	-4,0	2,0	CES	ND	ND	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Het
55	M	8,26	-2,9	-1,8	VAG	Outros	PE/IN	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het
56	M	15,26	-6,4	ND	VAG	ND	PD	H	E	ND	/	/	/
57	M	9,52	-6,1	0,0	CES	CEF	CI	H	T	A	I4	c.98-70C>A	Het
58	M	11,45	-3,8	-1,7	VAG	Outros	CD/ CI/ MF	H	E	TR	/	/	/
59	M	22,00	-5,7	0,4	VAG	Outros	CI	H	E	TR	/	/	/
60	M	32,66	-3,5	-3,7	VAG	Outros	CP	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het

CES-Cesária; VAG-Vaginal; AD- Adotada; F- Forceps; D- Domiciliar; CEF- Cefálico; PEL -Pélvico; C-Convulsões; CI- Cianose; FC-Fratura Cravicular; PE- Pré Eclâmpsia; IN-infecção Neonata; PD- Parto Difícil; CD- cabeça Derradeira; MF- Mãe Fumante; CP- complicado; H- hipoplásica; NV- Não visualizada; E- ectópica; T- Tópica; ND=Não Disponível; HI - Haste Inteira; TR- Transsecção de Haste; A- Afilada;; I-Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose;

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHHM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	Adeno	MRI Neuro	Haste	Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
61	M	6,79	-3,9	0,7	VAG	Outros	ND	H	E	NV	/	/	/
62	M	18,08	-5,1	-0,4	ND	ND	ND	H	NV	NV	I4	c.98-70C>A	Hom
63	M	34,27	-2,7	0,0	VAG	Outros	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
64	M	24,20	-2,8	-3,3	VAG	Outros	ND	ND	ND	ND	I4	c.98-70C>A	Het
65	M	16,80	-7,4	-1,3	VAG	CEF	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
66	M	4,94	-4,5	-0,8	VAG	ND	ND	H	E	ND	EX5	c.420G>C	Het
67	F	13,52	-5,1	-2,8	VAG	Outros	ND	H	E	TR	/	/	/
68	F	1,77	-4,5	ND	CES	CEF	HIP/ IC/ IN	H	E	TR	EX5	c.*10G>A	Het
69	M	8,87	-3,0	0,5	VAG	Outros	ND	H	E	NV	/	/	/
70	F	10,31	-3,5	-1,4	VAG	Outros	ND	ND	E	NV	/	/	/
71	M	10,76	-4,1	-1,9	VAG	Outros	CI/CC	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
72	F	16,76	-3,5	-3,2	VAG	Outros	ND	H	E	TR	/	/	/
73 ^{^**}	M	5,19	-1,6	2,4	VAG	ND	HIP/HC/CR/MIP	H	E	TR	/	/	/
74	M	33,00	-3,2	-2,2	ND	ND	ND	ND	ND	NV	I4	c.98-70C>A	Het
											EX5	c.*10G>A	Het
75	M	7,67	-6,5	0,5	A	AD	AD	H	E	TR	/	/	/

CES-Cesária; VAG-Vaginal; ND=Não Disponível; CEF- Cefálico; AD- Adotada; HIP- Hipoglicemia; IC- Icterícia; HC -Hipocalcemia; CR- Criptorquidia; MIP- Micropenis; CC-Circular de Cordão; IN-infecção Neonatal; CI- Cianose; H- hipoplásica; E- ectópica; TR- Transsecção de Haste; NV- Não visualizada; I-Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose; Hom= Homozigose;

^{^**} Paciente teve o início de DGH depois de diagnosticado insuf cortisol e TSH

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHHM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	MRI			Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
76	M	15,18	-6,8	-4,1	CES	CEF	IC P	H	E	NV	/	/	/
77	M	16,59	-8,6	-0,1	ND	ND	ND	H	E	TR	/	/	/
78	F	12,72	-5,8	-0,8	VAG	Outros	ND	H	E	TR	/	/	/
79	F	15,22	-7,6	-1,5	VAG	ND	ND	H	E	HI	/	/	/
80	F	9,11	-3,0	0,1	CES	ND	C	H	E	NV	/	/	/
81	M	6,72	-3,1	1,5	VAG	CEF	ND	H	T	TR	/	/	/
82	M	12,97	-5,2	-1,8	VAG	Outros	CI	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het
83	F	9,42	-3,8	-0,4	VAG	Outros	IN	H	E	TR	/	/	/
84	M	15,18	-4,9	-2,0	VAG	Outros	HPO	ND	E	NV	EX5	c.689A>T	Het
85	M	12,07	-4,7	-0,2	VAG	CEF	IC	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
86	M	9,11	-5,9	-1,8	CES	ND	ND	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Hom
87	F	0,72	-3,3	ND	CES	CEF	HIP/C	ND	ND	ND	I4	c.98-70C>A	Het
88	M	7,91	-2,5	0,6	CES	ND	IC	ND	E	HI	/	/	/

CES-Cesária; VAG-Vaginal; CEF- Cefálico; ND= Não Disponível, C-Convulsões; IC- Icterícia; P- Perinatal; CI- Cianose; IN-infecção Neonatal; HPO- Hipóxia; HIP- Hipoglicemia; H- hipoplásica; E- ectópica; T- Tópica; NV- Não visualizada; TR- Transsecção de Haste; HI - Haste Inteira; I-Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose; Hom- Homozigose;

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	Adeno	MRI Neuro	Haste	Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
89	M	14,97	-6,5	-3,6	VAG	Outros	ND	H	E	TR	/	/	/
90	M	9,77	-5,7	-0,9	VAG	Outros	IR/IC	H	E	NV	/	/	/
91	M	10,33	-3,0	1,6	CES	ND	ND	H	E	A	/	/	/
92#	F	22,67	-1,7	-3,5	VAG	CEF	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Hom
93	F	0,60	2,3	ND	CES	ND	ND	ND	ND	ND	I4	c.98-70C>A	Hom
94	M	7,66	-5,3	-2,5	CES	ND	PP/SF	H	T	HI	/	/	/
95	M	16,08	-7,6	-0,5	VAG	Outros	CI	H	E	A	I4	c.98-70C>A	Het
96	M	12,29	-3,8	-1,1	CES	ND	ND	H	T	HI	Ex5	c.*10G>A	Het
97	M	5,80	-4,0	2,0	VAG	Outros	IN/CR	H	NV	HI	/	/	/
98	F	11,77	-3,2	0,1	VAG	ND	PE/F/OP/IGN	ND	ND	ND	I4	c.98-70C>A	Het
99	F	15,98	-5,0	-0,6	VAG	ND	ND	H	NV	A	I4	c.98-70C>A	Het
100	F	11,68	-4,0	-1,4	VAG	Outros	PP/CI	H	NV	A	/	/	/

CES-Cesária; VAG-Vaginal; CEF- Cefálico; ND= Não Disponível; IR- Insuficiência Respiratória; IC- Icterícia; PP- Parto Prolongado; SF-Sofrimento Fetal; CI- Cianose; PE- Pré Eclâmpsia; F= Fórceps, OP= oxigênio no periparto; IGN-Irmã gêmea natimorta; IN-infecção Neonatal; CR- Criptorquidia; PP- Parto Prolongado; * IC/HP/HPI/C/NIS/LL/Holo: IC- Icterícia; HP- Hipotermia; HIP- Hipoglicemia; NIS- Nistagmo; LL-Lábio Leporino; HOLO- Holoprocencefalia;; H- hipoplásica; NV- Não visualizada; E- ectópica; T- Tópica; HI - Haste Inteira; A- Afilada; TR- Transsecção de Haste; I- Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose; Hom- Homozigose; # Antes da primeira consulta no HC, já tinha sido induzida a puberdade, e foi confirmado DGH no teste do HC e nunca tinha usado GH.

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	Adeno	MRI Neuro	Haste	Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
101	M	0,46	-2,1	ND	CES	ND	GA/MIP/CR	H	E	HI/DD	I4 Ex5	c.98-70C>A c.*10G>A	Het Het
102	M	12,92	-3,5	-0,8	VAG	ND	ND	H	E	TR	Ex5	c.*10G>A	Het
103	F	19,86	-7,7	-5,3	VAG	CEF	ND	NI	E	HI	Ex5	c.*10G>A	Het
104	M	17,41	-6,4	-1,3	VAG	ND	UTI	H	E	NV	/	/	/
105	M	14,47	-3,9	-1,0	CES	ND	PE/IC/CR	H	E	TR	/	/	/
106	M	15,16	-3,3	2,2	VAG	CEF	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
107	M	5,71	-3,0	0,8	VAG	CEF	ND	H	NV	NV	/	/	/
108	M	9,51	-5,1	0,3	VAG	Outros	ND	H	NV	ND	/	/	/
109	F	6,19	-3,3	0,3	CES	ND	ND	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Het
110	M	24,82	-6,7	-2,6	F	Outros	SF	H	E	A	/	/	/
111	M	7,28	-3,2	0,6	VAG	CEF	ND	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Hom
112	F	12,05	-3,1	-0,2	VAG	CEF	ND	H	NV	NV	Ex5	c.420G>C	Het
113	M	15,16	-4,1	-1,2	VAG	CEF	ND	ND	ND	ND	/	/	/
114	F	7,98	-4,5	-0,9	VAG	ND	ND	ND	ND	ND	I4	c.98-70C>A	Hom

CES-Cesária; VAG-Vaginal; CEF- Cefálico; ND= Não Disponível, GA- Genitália Ambigua; MIP- Micropenis; CR- Criptorquidia; PE- Pré Eclâmpsia; IC- Icterícia; CR- Criptorquidia; SF-Sofrimento Fetal; H- hipoplásica; DD- Deslocada Direita; NI-Normal; E- ectópica; NV- Não visualizada; HI - Haste Integra; A- Afilada; TR- Transsecção de Haste; I-Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose; Hom- Homozigose;

Dados Clínicos, imagem e achados moleculares no gene *OTX2* nos pacientes com DHM

Caso	Sexo	IC i (a)	Z Altura Inicial	Z BMI	Parto	Apresentação	Insulto Perinatal	Adeno	MRI Neuro	Haste	Exon Intron	Alteração Encontrada	Estado
115	F	10,73	-3,0	0,1	VAG	CEF	LCQ	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Hom
116	F	12,21	-5,8	-0,6	VAG	CEF	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Hom
117	F	4,83	-4,3	0,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	I4	c.98-70C>A	Hom
118	M	4,62	-3,6	-0,1	CES	CEF	ND	H	E	NV	I4	c.98-70C>A	Het
119	M	15,64	-5,5	1,1	CES	ND	ND	H	E	NV	/	/	/
120	M	9,81	-5,0	-1,3	VAG	CEF	ND	H	E	TR	I4	c.98-70C>A	Het
121	M	15,22	-3,2	-0,9	VAG	Outros	FC	H	E	HI	I4	c.98-70C>A	Het
122	M	3,71	-2,3	-1,6	CES	ND	HIP/IC /MF/DP	H	E	A	I4	c.98-70C>A	Het
123	M	14,81	-4,4	-1,4	VAG	CEF	ND	H	NV	HI	I4	c.98-70C>A	Hom
124	F	11,74	-4,4	-1,8	CES	ND	IC	H	ND	NV	I4	c.98-70C>A	Het
125	F	0,80	-5,1	ND	CES	ND	*	ND	E	A	/	/	/

CES-Cesária; VAG-Vaginal; CEF- Cefálico; ND= Não Disponível, LCQ- Luxação Congenita Quadril; FC-Fratura Cravicular ; HIP- Hipoglicemia; IC- Icterícia; MF- Mãe Fumante; DP- deslocamento Placenta; IC- Icterícia; H- hipoplásica; E- ectópica; NV- Não visualizada; HI - Haste Inteira ; TR- Transsecção de Haste; A- Afilada; I-Intron; Ex- Exon; Het-Heterozigose; Hom- Homozigose;

9.REFERÊNCIAS

1. **Savage JJ, Yaden BC, Kiratipranon P, Rhodes SJ** 2003 Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development. *Gene* 319:1-19
2. **Kacsoh B** 2000 The hypothalamo hypophyseal system. . New York
3. **Dattani MT, Robinson IC** 2000 The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man. *Clin Genet* 57:337-346
4. **Hartman ML** 1998 The Growth Hormone Research Society consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adult GH deficiency. *Growth Horm IGF Res* 8 Suppl A:25-29
5. **Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Carninci P, Mortensen AH, Hayashizaki Y, Arnhold IJ, Mendonca BB, Brue T, Camper SA** Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: In search of novel regulatory genes. *Mol Cell Endocrinol* 323:4-19
6. **Gorbenko Del Blanco D, Romero CJ, Diaczok D, de Graaff LC, Radovick S, Hokken-Koelega AC** A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve. *Eur J Endocrinol* 167:441-452
7. **Couly G, Le Douarin NM** 1988 The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo. *Development* 103 Suppl:101-113
8. **Eagleson GW, Harris WA** 1990 Mapping of the presumptive brain regions in the neural plate of *Xenopus laevis*. *J Neurobiol* 21:427-440
9. **Dasen JS, Rosenfeld MG** 2001 Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* 24:327-355
10. **Sheng HZ, Westphal H** 1999 Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet* 15:236-240
11. **Mallamaci A, Di Blas E, Briata P, Boncinelli E, Corte G** 1996 OTX2 homeoprotein in the developing central nervous system and migratory cells of the olfactory area. *Mech Dev* 58:165-178
12. **Miyazaki H, Kobayashi T, Nakamura H, Funahashi J** 2006 Role of Gbx2 and Otx2 in the formation of cochlear ganglion and endolymphatic duct. *Dev Growth Differ* 48:429-438
13. **Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T** 2003 Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6:1255-1263
14. **Katahira T, Sato T, Sugiyama S, Okafuji T, Araki I, Funahashi J, Nakamura H** 2000 Interaction between Otx2 and Gbx2 defines the organizing center for the optic tectum. *Mech Dev* 91:43-52
15. **Finkelstein R, Boncinelli E** 1994 From fly head to mammalian forebrain: the story of otd and Otx. *Trends Genet* 10:310-315
16. **Tahayato A, Sonnevile R, Pichaud F, Wernet MF, Papatsenko D, Beaufils P, Cook T, Desplan C** 2003 Otd/Crx, a dual regulator for the specification of ommatidia subtypes in the *Drosophila* retina. *Dev Cell* 5:391-402
17. **Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, Barsacchi G, Harris WA** 2003 Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 130:5155-5167

18. **Bovolenta P, Mallamaci A, Briata P, Corte G, Boncinelli E** 1997 Implication of OTX2 in pigment epithelium determination and neural retina differentiation. *J Neurosci* 17:4243-4252
19. **Martínez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A, Bovolenta P** 2001 Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 128:2019-2030
20. **Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E** 1993 A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* 12:2735-2747
21. **Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L, Bellingham J, Ng D, Herbrick JA, Duncan A, Scherer SW, Tsui LC, Loutradis-Anagnostou A, Jacobson SG, Cepko CL, Bhattacharya SS, McInnes RR** 1997 Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* 91:543-553
22. **Rivolta C, Berson EL, Dryja TP** 2001 Dominant Leber congenital amaurosis, cone-rod degeneration, and retinitis pigmentosa caused by mutant versions of the transcription factor CRX. *Hum Mutat* 18:488-498
23. **Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, Birch D, Heckenlively JR, Freund CL, McInnes RR, Daiger SP** 1998 A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene. *Am J Hum Genet* 63:1307-1315
24. **Wurst W, Bally-Cuif L** 2001 Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* 2:99-108
25. **Mortensen AH, Brinkmeier ML, Davis SW, Castinetti F, Potok MA, Camper SA** 2009 OTX and EMX Genes in Pituitary Gland Development and Function. . In: 91st Annual Meeting Endocrine Society. Washington
26. **Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT** 2009 Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* 30:790-829
27. **Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brulet P** 1995 Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121:3279-3290
28. **Ang SL, Jin O, Rhinn M, Daigle N, Stevenson L, Rossant J** 1996 A targeted mouse Otx2 mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122:243-252
29. **Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S** 1995 Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev* 9:2646-2658
30. **Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T** 2006 Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep* 7:824-830
31. **Xu Q, Tam M, Anderson SA** 2008 Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J Comp Neurol* 506:16-29
32. **Brinkmeier ML, Potok MA, Davis SW, Camper SA** 2007 TCF4 deficiency expands ventral diencephalon signaling and increases induction of pituitary progenitors. *Dev Biol* 311:396-407
33. **Davis SW, Camper SA** 2007 Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction. *Dev Biol* 305:145-160

34. **Liu C, Liu W, Palie J, Lu MF, Brown NA, Martin JF** 2002 Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions. *Development* 129:5081-5091
35. **Amanda H Mortensen B, Thomas Lamonerie, PhD² and Sally A Camper, PhD** 2012 **The Ins and Outs of OTX2: Assessment of Intrinsic and Extrinsic Functions in Pituitary Organogenesis** *Endocr Rev* Vol. 33
36. **Courtois V, Chatelain G, Han ZY, Le Novere N, Brun G, Lamonerie T** 2003 New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *J Neurochem* 84:840-853
37. **Dateki S, Fukami M, Sato N, Muroya K, Adachi M, Ogata T** 2008 OTX2 mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial growth hormone deficiency: functional studies using the IRBP, HESX1, and POU1F1 promoters. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3697-3702
38. **Elliott J, Maltby EL, Reynolds B** 1993 A case of deletion 14(q22.1-->q22.3) associated with anophthalmia and pituitary abnormalities. *J Med Genet* 30:251-252
39. **Bennett CP, Betts DR, Seller MJ** 1991 Deletion 14q (q22q23) associated with anophthalmia, absent pituitary, and other abnormalities. *J Med Genet* 28:280-281
40. **Ragge Nk Fau - Brown AG, Brown Ag Fau - Poloschek CM, Poloschek Cm Fau - Lorenz B, Lorenz B Fau - Henderson RA, Henderson Ra Fau - Clarke MP, Clarke Mp Fau - Russell-Eggitt I, Russell-Eggitt I Fau - Fielder A, Fielder A Fau - Gerrelli D, Gerrelli D Fau - Martinez-Barbera JP, Martinez-Barbera Jp Fau - Ruddle P, Ruddle P Fau - Hurst J, Hurst J Fau - Collin JRO, Collin Jr Fau - Salt A, Salt A Fau - Cooper ST, Cooper St Fau - Thompson PJ, Thompson Pj Fau - Sisodiya SM, Sisodiya Sm Fau - Williamson KA, Williamson Ka Fau - Fitzpatrick DR, Fitzpatrick Dr Fau - van Heyningen V, van Heyningen V Fau - Hanson IM, Hanson IM** 2005 Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am J Hum Genet* 76:1008-1022
41. **Wyatt A, Bakrania P, Bunyan DJ, Osborne RJ, Crolla JA, Salt A, Ayuso C, Newbury-Ecob R, Abou-Rayyah Y, Collin JR, Robinson D, Ragge N** 2008 Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma. *Hum Mutat* 29:E278-283
42. **Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T** Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95:756-764
43. **Ashkenazi-Hoffnung L, Lebenthal Y, Wyatt AW, Ragge NK, Dateki S, Fukami M, Ogata T, Phillip M, Gat-Yablonski G** A novel loss-of-function mutation in OTX2 in a patient with anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. *Hum Genet* 127:721-729
44. **Tajima T, Ohtake A, Hoshino M, Amemiya S, Sasaki N, Ishizu K, Fujieda K** 2009 OTX2 Loss of Function Mutation Causes Anophthalmia and Combined Pituitary Hormone Deficiency with a Small Anterior and Ectopic Posterior Pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 94:314-319
45. **Nolen LD, Amor D, Haywood A, St Heaps L, Willcock C, Mihelec M, Tam P, Billson F, Grigg J, Peters G, Jamieson RV** 2006 Deletion at 14q22-23 indicates a contiguous gene syndrome comprising anophthalmia, pituitary hypoplasia, and ear anomalies. *Am J Med Genet A* 140:1711-1718
46. **Henderson RA, Williamson K, Cumming S, Clarke MP, Lynch SA, Hanson IM, FitzPatrick DR, Sisodiya S, van Heyningen V** 2007 Inherited PAX6, NF1 and OTX2 mutations in a child with microphthalmia and aniridia. *Eur J Hum Genet* 15:898-901

47. **Schilter KF, Schneider A, Bardakjian T, Soucy JF, Tyler RC, Reis LM, Semina EV** OTX2 microphthalmia syndrome: four novel mutations and delineation of a phenotype. *Clin Genet* 79:158-168
48. **Gonzalez-Rodriguez J, Pelcastre EL, Tovilla-Canales JL, Garcia-Ortiz JE, Amato-Almanza M, Villanueva-Mendoza C, Espinosa-Mattar Z, Zenteno JC** Mutational screening of CHX10, GDF6, OTX2, RAX and SOX2 genes in 50 unrelated microphthalmia-anophthalmia-coloboma (MAC) spectrum cases. *Br J Ophthalmol* 94:1100-1104
49. **Gorbenko Del Blanco D, Romero CJ, Diaczok D, de Graaff LC, Radovick S, Hokken-Koelega AC** 1530 A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve. *Eur J Endocrinol* 167:441-452
50. **Henderson RH, Williamson KA, Kennedy JS, Webster AR, Holder GE, Robson AG, FitzPatrick DR, van Heyningen V, Moore AT** 2009 A rare de novo nonsense mutation in OTX2 causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Mol Vis* 15:2442-2447
51. **Diaczok D, Romero C, Zurich J, Marshall I, Radovick S** 2008 A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4351-4359
52. **Ou Z, Martin DM, Bedoyan JK, Cooper ML, Chinault AC, Stankiewicz P, Cheung SW** 2008 Branchiootorenal syndrome and oculoauriculovertebral spectrum features associated with duplication of SIX1, SIX6, and OTX2 resulting from a complex chromosomal rearrangement. *Am J Med Genet A* 146A:2480-2489
53. **Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M** 1966 Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. II. *Arch Dis Child* 41:613-635
54. **Beek FJ** 2003 [Current validation of the Greulich and Pyle atlas for the determination of skeletal age]. *Ned Tijdschr Geneesk* 147:689-690
55. **Silva EG, Shlessarenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, Marui S, Mendonca BB** 2003 GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. *Horm Res* 59:229-233
56. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF** 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
57. **Darnell J, Lodish, H., Baltimore, D.,** 1990 *Molecular Cell Biology*. Second ed. Scientific American Books ed. New York: Freeman and company
58. **Cohen LE, Radovick S** 2002 Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. *Endocr Rev* 23:431-442
59. **Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T** 2010 Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95:756-764
60. **Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T** 2010 Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95:756-764
61. **Kelberman D, Dattani MT** 2007 Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology. *Eur J Endocrinol* 157 Suppl 1:S3-14

62. **Thomas PQ, Dattani MT, Brickman JM, McNay D, Warne G, Zacharin M, Cameron F, Hurst J, Woods K, Dunger D, Stanhope R, Forrest S, Robinson IC, Beddington RS** 2001 Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. *Hum Mol Genet* 10:39-45
63. **Franca MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, Mendonca BB, Arnhold IJ** Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab* 95:E384-391
64. **Silveira LF, Trarbach EB, Latronico AC** 2010 Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. *Mol Cell Endocrinol* 324:30-38
65. **Leger J, Danner S, Simon D, Garel C, Czernichow P** 2005 Do all patients with childhood-onset growth hormone deficiency (GHD) and ectopic neurohypophysis have persistent GHD in adulthood? *J Clin Endocrinol Metab* 90:650-656
66. **Chen S, Leger J, Garel C, Hassan M, Czernichow P** 1999 Growth hormone deficiency with ectopic neurohypophysis: anatomical variations and relationship between the visibility of the pituitary stalk asserted by magnetic resonance imaging and anterior pituitary function. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2408-2413
67. **Kelberman D, Dattani MT** 2007 Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology. *Eur J Endocrinol* 157 Suppl 1:S3-14
68. **Melo ME, Marui S, Carvalho LR, Arnhold IJ, Leite CC, Mendonca BB, Knoepfelmacher M** 2007 Hormonal, pituitary magnetic resonance, LHX4 and HESX1 evaluation in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:95-102
69. **Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG** 2007 Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87:933-963
70. **Flemming G, Klammt J, Kiess W, Blum WF, Blum WF, Pfaeffle RW** 2008 Functional analysis of novel GLI2 mutations in patients with multiple pituitary hormone deficiency. In: ESPE ed. 47th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology. Istanbul, Turkey
71. **Garel C, Leger J** 2007 Contribution of magnetic resonance imaging in non-tumoral hypopituitarism in children. *Horm Res* 67:194-202
72. **Osorio MG, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, Estefan V, Mendonca BB, Arnhold IJ** 2002 Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5076-5084
73. **Sloop KW, Walvoord EC, Showalter AD, Pescovitz OH, Rhodes SJ** 2000 Molecular analysis of LHX3 and PROP-1 in pituitary hormone deficiency patients with posterior pituitary ectopia. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2701-2708
74. **Murray PG, Hague C, Fafoula O, Patel L, Raabe AL, Cusick C, Hall CM, Wright NB, Amin R, Clayton PE** 2008 Associations with multiple pituitary hormone deficiency in patients with an ectopic posterior pituitary gland. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:597-602