

MILENA GARCIA ABRÃO

**Análise do gene *PROP1* em pacientes com
hipopituitarismo: estudo em DNA de células de mucosa
oral e sangue periférico extraído com NaCl**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça

São Paulo

2005

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

"A vida é um talento que nos foi confiado para que possamos transformá-la e ampliá-la, para que ela seja uma dádiva para os outros. Nenhuma pessoa é um iceberg à deriva no oceano da História. Todos pertencemos a uma grande família na qual cada um tem o seu lugar o seu próprio papel a desempenhar."

Papa João Paulo II

Aos meus amados pais, Ana e João meus grandes exemplos de vida e minha amada irmã Marina que me deram a paz, harmonia, incentivo, amor e muitas e muitas alegrias que me fazem assim... realizada e feliz!

*Ao meu grande amor, Márcio que me deu equilíbrio e apoio sempre,
dividindo comigo todas as alegrias e dificuldades com muita
paciência, compreensão, carinho e amor!*

Aos pacientes, razão deste trabalho!

A Deus, que me deu a vida simplesmente!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha grande orientadora Profa Dra Berenice Bilharinho de Mendonça, pessoa maravilhosa, justa e sincera que me fez acreditar em minha capacidade quando permitiu que eu fizesse parte do seu produtivo grupo. Obrigada pela atenção, apoio, compreensão, conselhos e principalmente pelo carinho que a senhora tem por todos nós. Minha admiração e respeito serão eternos!

Ao Prof Dr Ivo Arnhold e a Profa Dra Ana Cláudia Latrônico pela oportunidade de participar deste projeto e aconselhar-me durante todo o trabalho.

Agradeço a grande amiga e professora Dra Ana Elisa Correia Billerbeck por todos os ensinamentos, esclarecimentos, amizade, “brincas”, enfim por tudo!

A amiga Dra Luciani Carvalho que para mim foi um grande exemplo de sucesso e otimismo. Obrigada pela grande ajuda neste trabalho e pela sua amizade inesquecível !

Agradeço do fundo do coração o grande apoio e incentivo que tive de minhas grandes e eternas amigas Michele, Cássia e Izabel, pessoas maravilhosas com quem compartilhei alegrias e tristezas durante este trabalho ! Não seria ninguém sem meus verdadeiros amigos...

A Dra Angela Barbosa pelo apoio teórico e científico sempre estando presente quando eu precisava

Agradeço a minha amiga Dra Mirian Nishi que me apresentou a Biologia Molecular e sempre esteve presente esclarecendo as minhas inúmeras dúvidas!

Agradeço à Nilda, Cristiane e Ana Lúcia por todo apoio e dedicação que vocês nos oferecem, facilitando todos as nossas dificuldades !

À Dra. Maria Beatriz Kohek que apresentou-me a este Laboratório dando-me a oportunidade de mostrar meu trabalho!

A Dona Alzira Sampaio que com todo carinho e afeto sempre nos ajuda e alega nosso ambiente de trabalho...minha grande companheira em todos os momentos !

A Valéria Lando que sempre me apoiou e confiou em mim como funcionária e pós-graduanda fazendo tudo parecer mais fácil com seus conselhos!

Aos amigos do Laboratório: Helena, Marcelo Batista, Daniela, Márcia Ester, Poline, Luciana, Angela, Neide, Fran, Dalvinha, Cristina Rossi, Cidinha, Emília, Márcia Helena, Karina, Regina, Chin, Alex, Lize, Rogério, Rafaela, Rosana, Tânia, Edna, Antônio Rocio, Milena Teles, Vinícius, Elaine, Sorahia, Cândida, Mirta, Suemi, Frederico, Mayra, Laura, Camila....Todos fizeram parte deste trabalho pois estiveram comigo dividindo o mesmo ambiente de trabalho me fazendo muito feliz !

Agradeço ao Marcio, João e Paulo do setor de Informática, pelas infinitas colaborações e amizade!

E finalmente aos meus familiares pela grande torcida !

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	8
PACIENTES E MÉTODOS	10
1 Pacientes	11
1.1 Avaliação clínica	11
1.2 Avaliação hormonal	12
1.3 Avaliação radiológica	13
2 Métodos	14
2.1 Extração de DNA a partir de sangue periférico	14
2.2 Extração de DNA de células de mucosa oral	15
2.2.1 Extração com NaCl	15
2.2.2 Extração com o <i>kit</i> comercial DNA <i>isolation kit</i> , Purigene, MN, USA	16
2.3 Estudo molecular	17
2.3.1 Reação de polimerização em cadeia (PCR)	17
2.3.2 Sequenciamento automático	20
2.3.3 Estudo de microssatélites	20
2.3.4 Técnica de <i>Southern Blotting</i>	23
2.3.5 Mapa da deleção	28
RESULTADOS	30
1 Análise molecular	31
1.1 Sequenciamento	31
1.2 Relato dos casos	32
1.3 Análise de microssatélites	34
1.4 <i>Southern blotting</i>	35
1.5 Determinação da extensão da deleção	36
2 Padronização das amostras extraídas de <i>swab</i> oral	37

2.1	Amostras extraídas com NaCl	37
2.2	Amostras extraídas com o <i>kit</i> comercial DNA <i>isolation kit</i> , Purigene, MN, USA	37
	DISCUSSÃO	41
	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Fatores de transcrição e sinalização envolvidos na organogênese hipofisária em camundongos
- FIGURA 2.** Estrutura do *PROP1* em humanos
- FIGURA 3.** STS e genes presentes no *contig* do cromossomo 5
- FIGURA 4.** Sequenciamento do exon 2 do *PROP1*
- FIGURA 5.** Ressonância Magnética
- FIGURA 6.** *Southern blotting*
- FIGURA 7.** Localização dos marcadores e genes no *contig* do cromossomo 5
- FIGURA 8.** Amostras de DNA dos controles extraídas de *swab* oral
- FIGURA 9.** Amplificação do exon 2 do *PROP1* em amostras de DNA de controles extraídas de *swab* oral
- FIGURA 10.** Amplificação de 1200 pb do gene *CYP21A2* em amostras de DNA de controles extraídas de *swab* oral

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 -** Mutações descritas no gene *PROP1*
- TABELA 2 -** *Primers* utilizados para amplificação do gene *PROP1*
- TABELA 3 -** *Primers* utilizados para amplificação de fragmento do exon 8 do *CYP21A1* e do exon 10 do receptor do FSH (FSHR)
- TABELA 4 -** *Primers* utilizados e distância dos marcadores em relação ao gene *PROP1*
- TABELA 5 -** *Primers* usados para mapear a região *deletion*
- TABELA 6 -** Comparação dos 2 métodos de obtenção de DNA de células de *swab* oral

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
DHEAS	Sulfato de dehidroepiandrosterona
DP	Desvio padrão
FSH	Hormônio folículo estimulante
<i>FSHR</i>	Receptor do FSH
GH	Hormônio do Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
<i>HESX-1</i>	<i>Homeobox embryonic stem cell-</i> representação gene humano
IGF1	Fator semelhante a insulina 1
IGFBP3	Proteína ligadora de IGF 3
ITT	Teste de tolerância à insulina
IV	Intravenoso
LH	Hormônio luteinizante
<i>LHX3/4</i>	<i>Lim homeobox genes</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PIT-1</i>	Fator I de transcrição específico hipofisário
POMC	Proopiomelanocortina
PRL	Prolactina
<i>PROP1</i>	<i>Prophet of Pit1</i>
STS	<i>Short sequence tags</i>

Sub- α	Subunidade α
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
T4 livre	Tiroxina livre
TSH	Hormônio tireoestimulante
VO	Via oral

RESUMO

RESUMO

Abrão MG. *Análise do gene PROP1 em pacientes com hipopituitarismo: estudo em DNA de células de mucosa oral e sangue periférico extraído com NaCl.* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 55 p.

As mutações no gene *PROP1* são a causa genética mais comum da deficiência combinada de hormônios hipofisários. Até o momento, diversas mutações missense e pequenas deleções foram descritas sendo a mutação 301-302 delAG a mais freqüente. Nosso objetivo foi estudar as mutações em DNA de pacientes com hipopituitarismo e padronizar a extração de DNA de células de *swab* oral, usando um método com NaCl e comparar com um *kit* comercial (Purigene, Minneapolis, EUA). Amplificamos os 3 exons do gene *PROP1* do DNA obtido de células orais e de sangue periférico. Identificamos a mutação 301-302delAG em 6 pacientes, 4 em homozigose (33%) e 2 em heterozigose (16%) e a mutação G51A em heterozigose em um único paciente. Em dois irmãos, filhos de pais consangüíneos, não foi possível amplificar os 3 exons do gene *PROP1* enquanto que os genes *LHX3* e *LHX4* foram amplificados com sucesso. Para confirmar a hipótese de deleção do *PROP1*, o *Southern blotting* foi realizado usando como sonda o produto de PCR do exon 2 do gene *PROP1* e um fragmento do gene *CYP21A2* como sonda controle. A banda referente ao *CYP21A2* estava presente nos pacientes e nos controles enquanto a banda referente ao *PROP1* estava ausente nos irmãos e presente na mãe e nos controles. Para definir a extensão da deleção usamos um mapa de STS próximos ao gene e o STS GDB:314805 localizado a 6,0 kb a montante do *PROP1* não foi amplificado nos pacientes. Entretanto, o gene Q8N6H0 a 18 kb a juzante e o STS WI-16216 a 59 kb a montante do *PROP1* foram amplificados com sucesso nos pacientes e controles indicando que a deleção está localizada dentro de 81 Kb. Para determinar os limites da deleção, várias reações de PCR foram realizadas com *primers* desenhados progressivamente distantes de gene *PROP1*, cobrindo toda a região.

Isto nos permitiu determinar a região deletada de 9,6 kb a juzante e 11 kb a montante do gene *PROP1*, com o tamanho máximo deletado de 18,4 kb. Por ambos os métodos de extração obtivemos um DNA de boa qualidade, permitindo o amplificação dos 3 exons do gene *PROP1*. A extração com NaCl foi mais rápida e mais barata resultando em maior quantidade de DNA quando comparada com o *kit* comercial. Em conclusão, descrevemos a deleção completa do gene *PROP1* em dois irmãos com o fenótipo clássico de hipopituitarismo associado à hipófise hipoplásica ou aumentada e padronizamos a extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl, que apresentou custo mais baixo e resultado mais rápido quando comparado a extração por um *kit* comercial, indicando que o *swab* oral é uma fonte prática de obtenção de DNA para estudos genéticos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Abrão MG. *Analysis of PROP1 gene in patients with hypopituitarism: study in DNA from blood and oral cells extracted with NaCl.* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 55 p.

PROP1 gene mutations are the most common cause of genetic combined pituitary hormone deficiency. To date, several missense mutations and small deletions have been described and the 301-302 del AG is the most frequent. Our objective was to study *PROP1* mutations in patients with hypopituitarism and standardize DNA extraction from an oral swab, using the NaCl method, comparing it with a commercial kit (*Purigene*, Minneapolis, USA). We amplified the 3 exons of *PROP1* gene in DNA obtained from oral cells and peripheral blood cells. We identified the delAG301-302 mutation in 6 patients, 4 in homozygous (33%) and 2 in heterozygous (16%) state and G51A mutation in heterozygous state in a single patient. In two siblings, a boy and a girl, born to consanguineous parents we failed to amplify *PROP1* gene by PCR whereas *LHX3* and *LHX4* genes were successfully amplified. To confirm the hypothesis of *PROP1* gene deletion, Southern blotting was performed using *PROP1* exon 2 gene PCR product as a probe and a fragment of *CYP21A2* gene as a control probe. The *CYP21A2* band was present in patients and controls whereas *PROP1* band was absent in both siblings and present in their mother and in controls. To define the extension of this deletion we used STS mapping approach and no amplification for a STS GDB:314805 6.0 kb downstream of *PROP1* was found. However, *Q8N6H0* gene located 18 kb upstream and the STS WI-16216 located 59 kb downstream of *PROP1* were successfully amplified indicating that the deletion is placed within 81 Kb. To determine the limits of the deletion a number of PCR covering this region were then carried out with primers located progressively distant from *PROP1*. This allowed us determine the deleted region from 9.6 kb upstream to 11 kb

downstream of *PROP* with a maximum deletion size of 18.4 kb. Both methods yielded good quality DNA, allowing the amplification of 3 exons of *PROP1* gene. The NaCl method showed to be faster and less expensive, resulting in a larger amount of DNA when compared with the commercial *kit*. In conclusion, we describe a complete deletion of *PROP1* gene in two siblings with classical hypopituitarism phenotype associated with hypoplastic or enlarged pituitary gland and standardized the DNA extraction of oral cells with NaCl, which presented lower costs and faster results, when compared with the extraction by a commercial *kit* indicating that oral *swabs* are a reliable DNA source for genetic studies.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A hipófise é composta pela adenohipófise e neurohipófise. A adenohipófise ou hipófise anterior é constituída pela *pars distalis*, lobo intermédio e *pars tuberalis*. A porção neural da hipófise abrange o lobo posterior da hipófise, a haste hipofisária, que contém projeções de axônios vindos do hipotálamo e o infundíbulo. A glândula hipofisária origina-se a partir de dois tecidos embriologicamente distintos, porém com íntima associação e integração. Vários estudos recentes contribuíram para elucidação do complexo mecanismo da embriogênese hipofisária (1,2). A adenohipófise origina-se da invaginação do ectoderma oral e a neurohipófise origina-se do ectoderma neural inicialmente como um espessamento do ectoderma oral no teto da cavidade oral e subseqüentemente, a placa involui para formar um leito epitelial, ou seja, a bolsa rudimentar. O segundo evento da organogênese hipofisária envolve a formação da bolsa de Rathke em torno da 4ª semana embrionária e durante esta etapa, a bolsa rudimentar continua a se expandir, enquanto a parte posterior do diencéfalo invagina-se inferiormente para formar o infundíbulo. O ectoderma oral e o neural que darão origem a adenohipófise e a neurohipófise, respectivamente mantêm íntimo contato a partir da 5ª semana embrionária. Sabe-se que o desenvolvimento da hipófise anterior nesta fase é dependente de sinais indutores vindos do diencéfalo ventral, que originará o infundíbulo. Uma semana depois, a bolsa de

Rathke perde sua conexão com a cavidade oral e a proliferação celular aumenta. A última etapa da organogênese hipofisária consiste na diferenciação e proliferação celulares. A partir de uma linhagem celular comum, formam-se cinco diferentes tipos celulares, sendo cada um deles caracterizado pela secreção de hormônios que regulam processos biológicos importantes, em resposta a sinais hipotalâmicos e periféricos. Assim os corticotrofos, gonadotrofos, somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos são responsáveis pela secreção dos seis hormônios: a proopiomelanocortina-POMC que dá origem ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio do crescimento (GH), a prolactina (PRL) e o hormônio tireoestimulante (TSH), respectivamente. O TSH, LH e FSH são glicoproteínas constituídas por uma subunidade α comum (Sub- α) e uma subunidade β específica. Os diferentes tipos celulares aparecem de uma maneira precisa no tempo e em determinada região da adenohipófise. Os corticotrofos estão localizados mais na região dorsal da adenohipófise; os somatotrofos e lactotrofos no lobo intermediário; e os tireotrofos e gonadotrofos na região ventral. O RNAm da Sub- α é o primeiro a ser detectado na região que dará origem a *pars tuberalis* (2). A seguir, se observa a expressão da POMC na região ventral da *pars distalis* e em seqüência no lobo intermediário, posteriormente, nota-se a detecção de GH, PRL e das gonadotrofinas. Este padrão de expressão indica que a diferenciação da hipófise segue um trajeto da porção ventral para dorsal (3)

Todos os mecanismos envolvidos na formação da hipófise são altamente conservados entre os mamíferos, tornando os estudos em camundongos modelos ideais para o conhecimento deste complexo sistema.

A progressão e a proliferação dos diferentes tipos celulares requerem a ação de genes da classe *homeobox*, como o *PITX*, *LHX3* e *LHX4*, *HESX-1*, *PROP-1* e *PIT-1*. O *homeobox* é uma seqüência altamente conservada de DNA com cerca de 180 pares de base, caracterizada primeiramente nas drosófilas. Esta seqüência está localizada na região codificadora de diversos genes *homeobox*, os quais têm papel fundamental no desenvolvimento das espécies. Os genes *homeobox* codificam proteínas que contêm um domínio de ligação de aproximadamente 60 aminoácidos, com capacidade de ligar-se ao DNA de genes alvo, ativando sua transcrição (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

A formação da adenohipófise, a diferenciação celular e a localização precisa dos cinco diferentes tipos celulares produtores dos seis hormônios hipofisários estão sendo progressivamente elucidados através de estudos de mutações naturais afetando os genes envolvidos neste processo, tanto em camundongos quanto no homem e no estudo de animais transgênicos (Figura 1).

Em humanos, o gene *PROP1* está localizado no cromossomo 5q 35 e consiste em três exons os quais codificam uma proteína de 226 aminoácidos. O homeodomínio inclui os resíduos 69 a 128 (2). O *PROP1* se liga como um dímero aos elementos promotores de outras proteínas do tipo *paired-like homeodomain* incluindo o *HESX-1* e *PIT-1* (Figura 2).

O *PROP1* (*Prophet of Pit1*) é um fator de transcrição do tipo *paired-like homeodomain* expresso especificamente nas células embrionárias da hipófise. A designação de *Prophet of Pit1* indica um gene cuja proteína é necessária para a expressão do gene *PIT1*. O gene *PROP1* está envolvido na ontogenese, diferenciação e função dos somatotrofos, lactotrofos, e tireotrofos e dos

gonadotrofos. A primeira mutação deste gene foi identificada na região *paired-like homeodomain* no camundongo Ames (4). A proteína mutante retém aproximadamente 20% da capacidade de ligação ao DNA e da ativação da transcrição da proteína normal (3). A hipófise do camundongo Ames contém quantidades baixas de RNAm e da proteína de Pit-1.

A identificação de mutações no gene *PROP-1* em diversos pacientes com pan-hipopituitarismo demonstrou ser este gene o mais freqüentemente envolvido no hipopituitarismo de causa genética até o momento (Tabela 1).

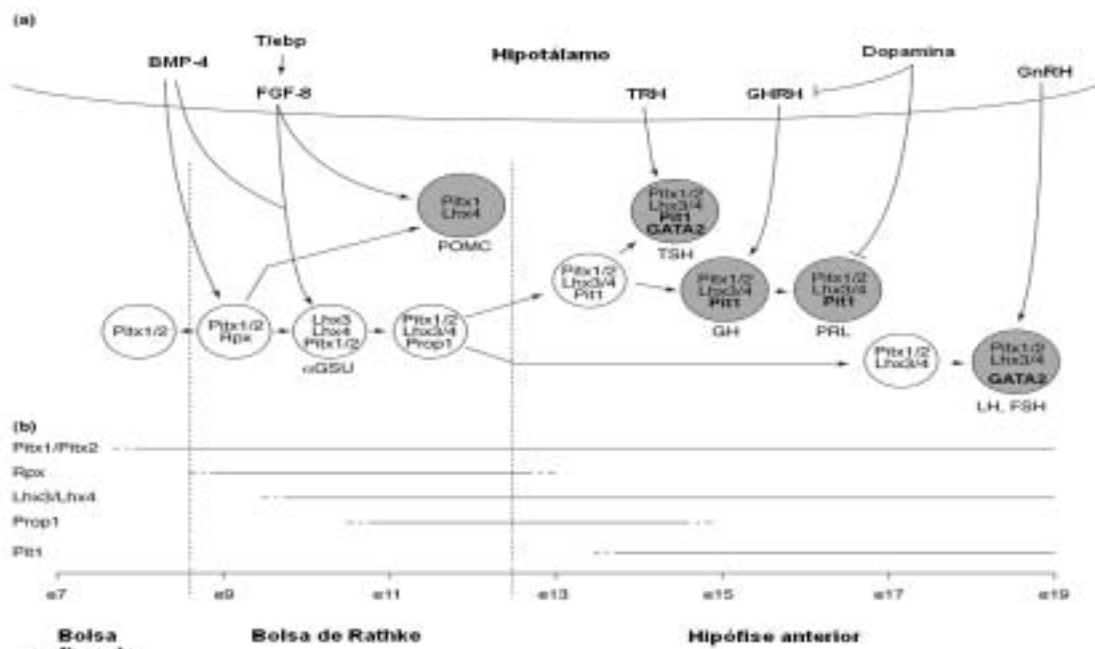
Considerando a alta prevalência de comprometimento do *PROP1* em pacientes com panhipopituitarismo nosso objetivo foi pesquisar a presença de mutações no DNA de pacientes com fenótipo sugestivo, para tratamento e aconselhamento genético.

A obtenção de DNA de boa qualidade é fundamental para identificar mutações. A identificação destas mutações em DNA obtido de sangue periférico é um procedimento habitual, entretanto há dificuldades na coleta de sangue em crianças e no encaminhamento das amostras de pacientes e familiares que vivem em locais distantes e de difícil acesso. A coleta de material utilizando *swab* oral, rotineiramente empregada em medicina forense, pode ser uma boa alternativa para obtenção de DNA (10).

O método Chelex 100 foi desenvolvido para extração de DNA de *swab* oral, em indivíduos suspeitos da prática de crime. Desde então, este método tem sido empregado em medicina forense para extração de DNA de amostras de sangue, sêmen, saliva e cabelo. Este método não envolve solventes tóxicos e utiliza uma resina com alta afinidade por íons metálicos polivalentes impedindo a degradação

do DNA (11). Depois do método de Chelex, outras técnicas foram descritas para extração de DNA de células de mucosa oral, mas sua aplicação em laboratórios de rotina é rara. O Chelex modificado foi um método proposto para tentar melhorar a qualidade da amostra pela adição de proteinase K e incubação a 56°C e 100°C. A quantidade de DNA obtido foi maior e a qualidade melhor utilizando o Chelex modificado (12).

A extração de DNA de *swab* oral para utilização em medicina forense, não necessita que as amostras sejam íntegras, mas que tenham DNA suficiente para identificação de pessoas. Para amplificação de fragmentos maiores de genes e estudo de microsatélites necessitamos de amostras de DNA íntegro e de boa qualidade. A busca por amostras de DNA de melhor qualidade faz com que diferentes técnicas sejam revistas e adaptadas as diferentes condições financeiras e de trabalho envolvidas em cada laboratório.



Dasen JS et al, 2001

FIGURA 1. Fatores de transcrição e sinalização envolvidos na organogênese hipofisária em camundongos

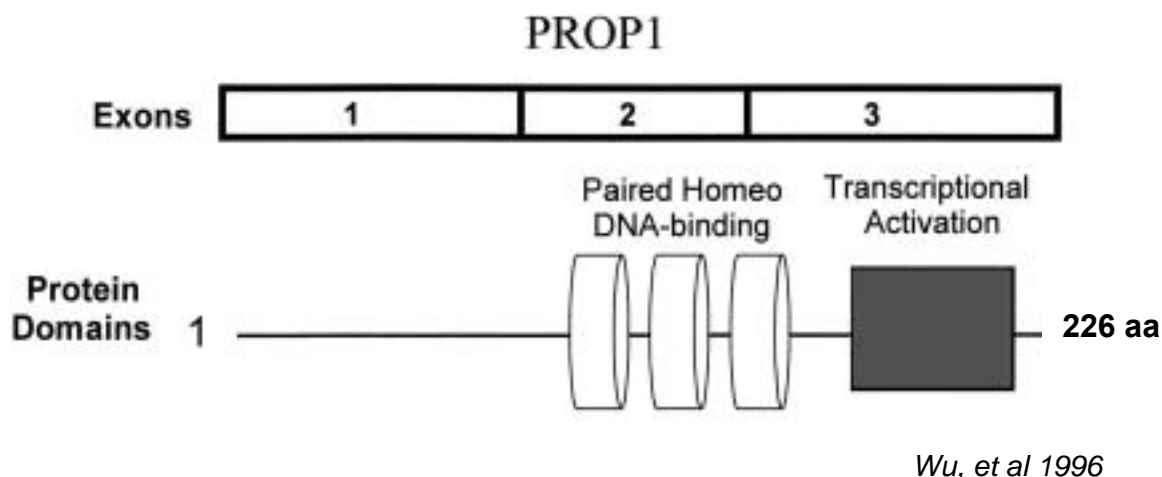


FIGURA 2. Estrutura do *PROP1* em Humanos

TABELA 1 - MUTAÇÕES DESCRITAS NO GENE *PROP1*

AUTOR	TIPO DE MUTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	MUTAÇÃO
Wu, 98	Pequena deleção	Exon 2	301-302 del AG
Fofanova, 98	Pequena deleção	Exon 2	149-150 del GA
Krzisnik, 98	Pequena deleção	Exon 2	150 del A
Duquesnoy, 98	<i>Missense</i>	Exon 2	R73C
Duquesnoy, 98	Retenção Intron 2	Intron 2	343-2 A>T
Deladoey, 99	<i>Missense</i>	Exon 2	F117I
Fluck, 98	<i>Missense</i>	Exon 3	R120C
Agarwal, 00	Pequena deleção	Exon 2	112-124 del
Osório, 00	<i>Missense</i>	Exon 2	F88S
Vallette, 01	<i>Missense</i>	Exon 2	R73H
Riepe, 01	<i>Nonsense</i>	Exon 2	R99X
Paracchini, 03	<i>Missense</i>	Exon 2	R71C/R71H
Vieira, 03	<i>Missense</i>	Exon 2	R99Q
Voutetakis, 04	<i>Nonsense</i>	Exon 2	Q83X
Tatsumi, 04	Pequena deleção	Exon 2	157delA

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Identificar mutações no gene *PROP1* em pacientes com hipopituitarismo a partir de amostras de DNA de sangue periférico
2. Padronizar a extração de DNA de *swab* oral com NaCl para estudo do gene *PROP1*

PACIENTES E MÉTODOS

PACIENTES E MÉTODOS

1. PACIENTES

Para estudo do gene *PROP1* foram selecionados 24 pacientes, portadores de hipopituitarismo de origem hipofisária por apresentarem resposta ausente ou reduzida do TSH e/ou PRL associada à deficiência de GH. Os pacientes foram avaliados do ponto de vista, clínico, hormonal e radiológico.

1.1 Avaliação Clínica

Os pacientes foram avaliados clinicamente no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, da Disciplina de Endocrinologia do HCFMUSP. A estatura foi obtida em cada consulta, através de um estadiômetro de precisão milimétrica. O DP da altura foi calculado usando padrões britânicos de referência (13). O grau de desenvolvimento puberal foi avaliado de acordo com a classificação de Marshall e Tanner (14, 15). A idade óssea foi determinada no RX simples de mão e punho realizado de acordo com o método de Greulich & Pyle (16). Utilizamos como critérios de diagnóstico de deficiência de GH níveis de pico de GH após estímulo <7.0 ng/ml no método de radioimunoensaio ou <3,3 ng/ml no método imunofluorométrico. A deficiência hormonal hipofisária múltipla foi

definida pelos níveis baixos de TSH e PRL basais e pela hiporesposta do TSH e da PRL ao estímulo pelo TRH e hipoglicemia.

1.2 Avaliação hormonal

Foram realizadas dosagens basais de IGF1, IGFBP3, testosterona (sexo masculino) ou estradiol (sexo feminino), DHEAS, T3, T4, T4 livre, TSH.

Os pacientes foram submetidos a dois testes de estímulo do GH: o teste da clonidina (100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de superfície corporal, vo) com coletas de sangue para dosagem do GH, no tempo basal e nos tempos 60, 90, 120 minutos após administração da clonidina e teste combinado para avaliação da função hipofisária, que inclui a hipoglicemia induzida pela administração iv de 0,1 U/kg de peso por insulina (ITT) + 200 μg de TRH + 100 μg de GnRH com coletas de sangue periférico para dosagem da glicemia, GH, cortisol, TSH, PRL, LH e FSH, nos tempos -15, 0 e 15, 30, 45, 60, 90 minutos após a administração da medicação.

As dosagens laboratoriais foram realizadas em soro no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 e o coeficiente de variação intra-ensaio e interensaio foram < 10% para todas as dosagens. A dosagem de IGFI foi realizada pelo método de radioimunoensaio após extração com etanol (*Diagnostic Systems Laboratories Inc, Webster, TX, USA*) e a dosagem da IGFBP3 foi realizada por método imunorradiométrico, (*DSL, Webster, TX, USA*). A dosagem de DHEAS foi realizada por radioimunoensaio (*Cis bio international Gif Sur Yvette Cedex, France*) e as dosagens de estradiol (E2), testosterona (T) e gonadotrofinas (LH/FSH), T3, T4 total, T4 livre, TSH, prolactina e cortisol foram

realizadas por ensaios fluoro e imunofluorométricos (*AutoDelfia*, *Wallac*, Turku, Finlândia).

1.3 Avaliação Radiológica

A região hipotálamo-hipófisaria foi avaliada por ressonância magnética obtendo-se cortes coronais e sagitais em T1 com TR 350 ms e TE= 20 ms utilizando-se um aparelho Tesla 1,5 (*Sigma GE*, Milwaukee, Wisconsin, USA) por ocasião do diagnóstico. Todas as imagens da região hipotálamo-hipofisária foram avaliadas de forma sistemática pela radiologista Dra. Cláudia da Costa Leite.

2. MÉTODOS

2.1 Extração de DNA a partir de sangue periférico

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos indivíduos arrolados na pesquisa ⁷⁸. Dez mililitros de sangue venoso foram colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se um volume de solução de lise (NH₄Cl a 114 mM, NH₄HCO₃ a 1 mM) duas vezes maior que o volume de sangue, incubado a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Germany), sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido uma vez.

O botão de células brancas foi suspenso em nove ml de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 180 µl de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 µl de proteinase K na concentração de 10 mg/ml (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), e incubado a 37°C por 18 horas. Após este período, 3,6 ml de solução saturada de NaCl 6 M foi adicionada seguido de agitação do conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, em seguida lavado em etanol a 70% durante 5 minutos,

repetindo-se a operação por mais três vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto, seguido de secagem por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após o procedimento, o DNA foi ressuspensão em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

2.2 Extração de DNA de células de mucosa oral

Os pacientes foram orientados a bochechar previamente com 100 ml de água destilada e a coleta do *swab* foi realizada raspando a face interna das bochechas com escovinhas estéreis, com movimentos circulares aproximadamente 30 vezes; as escovinhas tiveram a porção externa da haste cortada o suficiente para serem colocadas em microtubos de 2 ml.

Foram testados e comparados dois métodos diferentes de extração de DNA de *swab* oral: a extração com NaCl e extração com *kit* comercial Purigene *DNA isolation kit*, Minneapolis USA (Tabela 3).

2.2.1 Extração com NaCl

Aos tubos contendo o *swab*, foram adicionados 200 µL de TES (Tris HCl 10mM pH7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e 5 µL de proteinase K (10 mg/ml) e incubados por 2h a 42°C. Após a incubação, retirou-se a escova e obteve-se o volume aproximado de 250 µL aos quais adicionamos 42 µL de NaCl saturado (6 M) agitando vigorosamente por agitação manual. Centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugados por 1

minuto a 15.000 x g. O etanol absoluto foi descartado e foi adicionado 1 ml de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o *pellet*. Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g e o sobrenadante desprezado. Repetiu-se a lavagem com etanol 70% mais uma vez e após desprezar o sobrenadante os tubos permaneceram abertos por 30 min para evaporação do etanol residual. O DNA foi dissolvido em 60 μ L de TE 10:0,1 (Tris HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM pH 8). Este volume foi estabelecido após a utilização de volumes progressivos de 20-60 μ L por ser adequado para obtenção de concentração de DNA em torno de 80 ng/ μ L.

2.2.2 Extração com o *kit* comercial DNA *isolation kit*, Purigene, Minneapolis, USA

Em cada tubo contendo os *swabs* foram adicionados 300 μ L de solução de lise. A seguir, foi adicionado 1,5 μ L de proteinase K (20 mg/mL). As escovas foram retiradas e 100 μ L de solução de precipitação de proteína foram adicionados ao tubo. Acrescentamos 300 μ L de isopropanol 100% e 0,5 μ L de glicogênio (20 mg/mL) e os tubos foram centrifugados a 15.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo invertido sobre papel absorvente. Foram adicionados 300 μ L de etanol 70% para lavar o DNA. Os tubos permaneceram abertos por 15 minutos para evaporação do etanol residual e a seguir o DNA foi dissolvido em 20 μ L de solução de hidratação do DNA. A concentração final de DNA nas amostras foi em torno de 50 ng/ μ L.

As amostras de DNA extraídas pelos dois métodos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris–acetato 0,004 M; EDTA 0,001 M, pH 8,0) contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 μ g/ml de gel e

observadas em transiluminador UV para verificar sua integridade. As concentrações das amostras de DNA obtidas pelas duas técnicas foram medidas em espectrofotômetro (Ultrospec III, Pharmacia LKB Biochrom Ltd, Cambridge, England) no comprimento de onda de 260 nm. A relação 260/280 igual a 1,8 foi utilizada para caracterizar a pureza do material. As amostras ficaram armazenadas a 4°C até sua utilização.

As amostras de DNA extraídas pelas duas metodologias foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris – acetato 0,004M, EDTA 0,001M, pH 8,0) contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL de gel e observadas em transiluminador para verificar sua integridade.

3. Estudo Molecular

3.1 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Os exons 1, 2 e 3 do gene *PROP-1* foram amplificados por PCR, em uma reação com volume final de 50 µL contendo de 1-10 µL do DNA extraído dos *swabs* orais (1 µL para DNA-NaCL e 5 µL para DNA-Kit Purigene) e 1 µL (100-500 ng) de DNA extraído de sangue periférico 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM/L de cada dNTP, 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador específico e 1,25 U de *Taq* polimerase. Os *primers* utilizados e as respectivas temperaturas de hibridação estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *PROP1*

EXON	PRIMER SENSE	PRIMER ANTI-SENSE	TH ^o C
1 (301 pb)	GGAAGCAGAGAAATCTCAAGTC	CCAAGGGGTGCTCCAGTC	54
2 (365 pb)	TGGTCCAGCACCGAGGAG	GCTATCATAGAATGTTGGG	55
3 (512 pb)	CTATGTCAAGTGTGGGCTCT	TTCTAATCGGTGAGCTGAC	57

TH: temperatura de hibridação

A solução obtida foi submetida ao seguinte programa do termociclador: 40 ciclos: 94°C por 1 min, 30 seg na temperatura de hibridação de 55°C, 72°C por 30 seg e 1 ciclo final de 72°C por 10 min. Foi utilizado o termociclador automático *GeneAmp PCR Instrument System 9600* (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT). Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA) e um DNA genômico já amplificado anteriormente para confirmação da eficácia e especificidade da reação. As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL de gel e observadas em transiluminador UV.

Para testar a capacidade de amplificação de fragmentos maiores que 533 pb, do DNA obtido pelos 2 métodos de extração, amplificamos o exon 10 do receptor de *FSH* contendo 1000 bp e um fragmento do gene *CYP21A2* de 1200 pb com primers e protocolo de amplificação específico (Tabela 3).

TABELA 3 - *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO EXON 8 DO *CYP21A2* E DO EXON 10 DO RECEPTOR DO FSH (*FSHR*)

GENE	FRAG.	<i>PRIMER SENSE</i>	<i>PRIMER ANTI-SENSE</i>	TH ^o C
<i>CYP21A2</i>	(1200 pb)	TTCAGGCGATTTCAGGAAGGC	CAGAGCAGGGAGTAGTCTC	56
<i>FSHR</i>	(1000 pb)	CTGGATCTGAGATGTTGATTCTA	CCTCTAAGTCATTAGCCAAATA	60

TH: temperatura de hibridação
 Frag: fragmento

3.2 Sequenciamento automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi estimada através da comparação da intensidade de sinal emitido pelos fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à uma purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2 U/ μ l) e exonuclease I (10 U/ μ L) (*PCR product pre-sequencing kit*, Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA) com incubação a 37°C por 15 minutos seguido de 80°C por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *kit ABI Prism™ BigDye Terminator* (Perkin Elmer) e quantidades variáveis de produto de PCR (10 a 100 ng) foram utilizadas de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em seqüenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 310 automatic DNA sequencer* (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Em dois irmãos portadores de panhipopituitarismo, não foi possível a amplificação de nenhum dos exons do *PROP1* enquanto os genes *LHX3* e *LHX4* foram amplificados usando o mesmo DNA. Testamos a presença de deleção gênica, utilizando os microssatélites já descritos para estudo do efeito fundador da mutação AG301-302 e 2 novos microssatélites descritos mais recentemente.

3.3 Estudo de microssatélite

O estudo de microssatélites flanqueando o gene *PROP1*, foi realizado utilizando os marcadores D5S2008, D5S469 e D5S408, sintetizados pela empresa *Invitrogen/Life technologies*. Os *primers* e condições para a reação de

PCR foram escolhidos baseados na literatura (GenBank NT_077451) (Tabela 4 e Figura 3).

TABELA 4 - *PRIMERS* UTILIZADOS E DISTÂNCIA DOS MARCADORES EM RELAÇÃO AO GENE *PROP1*

MICROSSATÉLITE	<i>PRIMER</i> SENSE MARCADO COM FLUORESCÊNCIA	<i>PRIMER</i> ANTI-SENSE	TH°C	DISTÂNCIA EM RELAÇÃO AO <i>PROP1</i> (MB)
D5S2008	GGTGGCTCACACATATAATTC	AGATGATTCCCATTTACATTTG	56	0,1
D5S469	AATACACGGAATGTGGTCTAG	CTTTGACTGATTTTACTGAGCA	56	1,0
D5S408	ACAACCTCCAACCCTGAGAT	ACTGTGCCTAGCCTTCATTT	56	2,5

TH: temperatura de hibridação

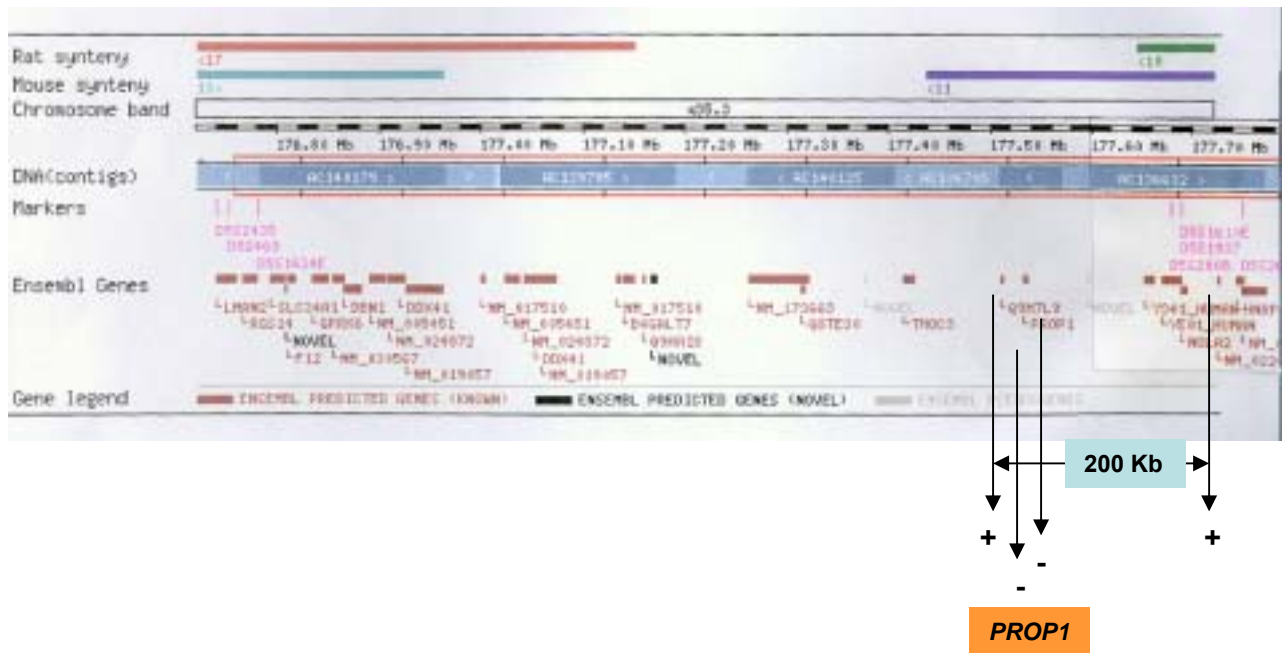


FIGURA 3. STS e Genes presentes no *contig* do cromossomo 5

Para confirmar a deleção do gene *PROP1* realizamos a técnica de *Southern blotting*, estudando 3 pessoas da mesma família (2 afetados e a mãe) e 5 controles normais.

3.4 Técnica de *Southern blotting*

Digestão de DNA genômico e separação eletroforética do DNA digerido (18)

As amostras de DNA foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (*Ultrospec III -Pharmacia Biotech - Upsala, Sweden*) para determinação da concentração das mesmas. As amostras de DNA (10 µg) foram então digeridas com a enzima de restrição *Apa I* (*Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA*) usando-se 10 U/µg. Após incubação a 37°C por 18 horas, 1 µg das amostras de DNA

digeridas foram submetidas à eletroforese num gel de agarose a 1% preparado com TAE 1X (TAE 50X: 242 g de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial, 0,4 M de EDTA pH8, pH final da solução 8,3) e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL de gel). A confirmação de que o processo de digestão das amostras de DNA ocorreu adequadamente foi feita através da avaliação do gel controle por transiluminação (*Transilluminators*, UV, Sigma, USA) o que permitiu o prosseguimento do processo. As amostras podem ser armazenadas em *freezer* - 20°C até a sua utilização. O gel foi carregado obedecendo a seguinte ordem: nos dois primeiros poços do gel o marcador de peso molecular λ *HindIII* (250ng/µL) nas concentrações de 1µg (4µL) no primeiro poço e 125ng (0,5/µL) no segundo poço, seguido pelas amostras de DNA digeridas. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% preparado com TAE 1X e submetidas à eletroforese por aproximadamente 18 horas a 40 V. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ mL de gel) e através de transiluminação os fragmentos do DNA digerido foram visualizados.

Transferência do DNA genômico - Southern blotting

Realizou-se a depurinação do gel através da incubação em HCl 0,15 M durante 7 minutos sob agitação; lavando-o a seguir com água bidestilada. Seguiu-se a desnaturação do gel por 30 minutos sob agitação em NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M; lavando-o após com água bidestilada. A neutralização do gel foi realizada em Tris-HCl 0,5 M pH8, NaCl 1,5 M por 30 minutos. A membrana de nylon (*Hybond-N*, *Amersham*, UK), cortada nas dimensões do gel e corretamente identificada, foi colocada sobre o gel e sobre a membrana uma pilha de papel de filtro. Uma

solução de transferência 20X SSC (175,3 g de NaCl 3 M, 88,2 g de citrato de sódio 0,3 M, pH final da solução pH7 num volume final de 1L) colocada numa cuba foi absorvida pela pilha de papel de filtro passando através do gel e da membrana. O processo de transferência que promove a passagem do DNA contido no gel para a membrana por capilaridade ocorreu num período de 12 a 24 horas. Finalizado o processo de transferência o gel foi corado com brometo de etídio e observado no transiluminador. A ausência de DNA no gel confirma a eficiência da transferência realizada. Terminada a transferência a membrana foi lavada em 2X SSC para retirada de resíduos de agarose. Esta membrana protegida por um envelope de papel 3 MM (*Chromatography paper, Wathman, England*) foi mantida em forno de hibridização (HB 1100 D - *Red Roller II Hybridization Oven, Hoefer Scientific Instruments, CA, USA*) a 80°C durante 2 horas para a fixação do DNA transferido na membrana. Nestas condições a membrana poderá ser armazenada por tempo prolongado até a sua hibridação com a sonda de interesse.

Origem e Marcação das Sondas

- **Sonda *PROP1*** exon 2 - foi obtida a partir de PCR de DNA genômico de um indivíduo controle normal, purificada com o *kit* comercial *Concept Rapid PCR Amplification (System-Gibco BRL)*.
- **Sonda *CYP21A2*** exon 8 - obtida por PCR usada para controle interno da reação.

A marcação das sondas *PROP1* e *CYP21A2* foi realizada com (³²P) dCTP (3000 Ci/mmol, *Amersham, UK*) pela técnica de *random priming* através de *kit* comercial (*Random Primers DNA Labeling System, Gibco BRL, Gaithersburg, MD,*

USA). A reação de marcação foi realizada num volume total de 50 μ L. Foi acrescentado a 100 ng da sonda, 1 μ L do marcador de peso molecular λ HindIII (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) e água bidestilada qsp e este produto foi fervido por 5 a 10 minutos e imediatamente transferido e mantido no gelo. Este processo é responsável pela desnaturação do DNA. Os demais reagentes do *kit* num volume de 2 μ L de cada oligonucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP), 15 μ L do *random primer buffer mixture*, 5 μ L de dCTP* além de 1 μ L da enzima *Klenow*, foram previamente centrifugados e mantidos no gelo. Com exceção da enzima, todos os reagentes foram fervidos por 5 a 10 minutos. Incubamos a solução a 25°C por 2 horas conforme orientações do fabricante. Ao final deste período de incubação foi adicionado o *stop buffer* (5 μ L). Os nucleotídeos livres foram separados após aplicação numa coluna de *Sephadex G50* (Pharmacia, Upsala, Sweden) equilibrada com TES (10 mM de Tris-HCl pH8, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA pH 8). A eficiência da marcação foi avaliada colocando-se 2 μ L da sonda purificada em 5 mL de líquido de cintilação (PPO 6 g, POP 10 mg, tolueno 1 L) e medida em contador *Beckman* (Beckman, USA) fixando-se como mínima uma atividade específica de 10^8 cpm/ μ g de DNA para utilização da sonda na marcação. A sonda foi fervida por 5 minutos e mantida no gelo até ser acrescentada à solução de hibridização.

Hibridação

As membranas foram pré-hibridadas numa solução de formamida deionizada 50%, Denhardt 0,1% (PVP 2 g, Ficoll 2 g, Albumina bovina 2% numa solução final de 100 mL), SSPE 5X (NaCl 261 g, NaH₂PO₄.H₂O 41,4 g, EDTA 11,1 g pH da solução final pH 7,4, num volume final 1 L), SDS 1% e sulfato de dextrana 5% utilizando-se um volume final de 15 mL por membrana, durante um período mínimo de 4 horas a 42°C em forno de hibridização. A seguir adicionou-se a sonda marcada desnaturada juntamente com o DNA de esperma de salmão (200 µg/mL da solução) à solução de pré-hibridização realizando-se a hibridização à temperatura de 42°C por 24 horas com agitação. As membranas foram lavadas seguindo o protocolo: 15 minutos à temperatura ambiente na solução de 2X SSC, 0,1 % SDS; 15 minutos à temperatura ambiente na solução de 0,1X SSC, 0,1% SDS, e 30 minutos à temperatura de 65°C na solução de 0,1X SSC, 0,1% SDS. Terminada a lavagem as membranas foram secadas parcialmente em papel de filtro, apenas para retirar o excesso de líquido sem secá-las por completo. As membranas foram colocadas em sacos plásticos e seladas. Após essa etapa foram colocadas em chassis contendo *screen* para captação da imagem e posterior exposição no *STORM*. Após a exposição das membranas por período de tempo variável, a intensidade do sinal dos fragmentos das sondas *PROP1* e *CYP21A2* na imagem captada, foi quantificada pelo uso do software *ImageQuant® (Molecular Dynamics)*. A quantificação dos fragmentos foi obtida através da razão da área dos fragmentos das duas sondas num mesmo indivíduo após a subtração da contagem inespecífica, realizada pelo próprio programa e comparada às dos controles normais.

3.5 Mapa da deleção

Com a confirmação da deleção pelo *Southern blotting*, partimos para o estudo dos limites da região deletada a partir da amplificação de STS e genes presentes próximos ao gene *PROP1*. Selecionamos os STSs utilizando como referência o banco de dados do NCBI. Dois STSs encontrados a montante do *PROP1* *GDB:314805* e *WI-16216* e um gene a jusante (*Q8N6HO*) foram submetidos inicialmente à amplificação no DNA dos dois irmãos, a mãe e controles normais.

Baseado no banco de dados genéticos (GenBank NT_077451), foram desenhados *primers* adicionais próximos ao *PROP1*, para caracterizar os pontos de quebra do DNA. As regiões foram denominadas R1 a R6, sendo as regiões R1-R4 localizadas entre os genes *Q8N6HO* e *PROP1* enquanto as regiões R5-R6 localizadas entre os STSs *GDB* e *WI-16216* (Tabela 5).

TABELA 5 - *PRIMERS* USADOS PARA MAPEAR A REGIÃO DELETADA

<i>PRIMERS</i>	SENSE	ANTI-SENSE	TH (°C)	FRAGMENTO. (bp)
Q8N6H0	5'ATCCCAGACAAGAGGAGGAA3'	5'CTTGTCTTCCTCACCCAGAT3'	54	326
GDB: 314805	5'AGGTGGAGGTTGTGGTGAG3'	5'GCCTTTACTCCTGCTATGCA3'	54	260
WI-16216	5'ATGCTCGGGCCTCAGAAG3'	5'TGATGAGCTTCCGGATCTG3'	52	131
Região 1	5'GCCATCCAGAAGTGCCTG3'	5'TCCAGGGGATGCAGCGATCT3'	64	358
Região 2	5'AGAGATTGTGACACCTATGG3'	5'GAATTCACGTACCTGTCTAG3'	50	560
Região 3	5'GAAGGACATAACAGAAGTCTG3'	5'ATGCAATTTCCCTCAATCAGC3'	60	390
Região 4	5'GTCTGGAATCACAACCCCTGA3'	5'CGAGGCCAGTGGATTGCT3'	54	630
Região 5	5'CTGAAGGACATGAAGGATAAC3'	5'AACAGAGCGAGACTCTGTCT3'	60	317
Região 6	5'ATGAGTGTGCCTGTGTGAG3'	5'CTATCATGCCTATAGACAGCT3'	60	314

TH: temperatura de Hibridação

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Análise Molecular

1.1 Sequenciamento

O sequenciamento direto dos produtos de PCR dos exons 1, 2 e 3 do gene *PROP1* revelou que a alteração mais freqüente foi a deleção de uma repetição AG: 301-302delAG. Essa deleção cria um *stop codon* na posição 149/150 da proteína levando à formação de uma proteína truncada no códon 109. Dos 24 pacientes estudados 6 apresentaram essa mutação sendo 2 em heterozigose e 4 em homozigose (Figura 4). Uma paciente apresentou uma mutação em heterozigose 152G>C também no exon 2. Esta mutação leva a uma troca de glicina pela alanina na posição 51 (G51A). Esta alteração não foi encontrada em 100 alelos normais sugerindo tratar-se de uma nova mutação. Os pais desta paciente foram estudados e o pai apresentou a mesma alteração em heterozigose. Em todos pacientes, exceto em 2 casos, amplificamos e seqüenciamos amostras de DNA extraído de sangue periférico e de *swab* oral extraído com NaCl e *Kit* Purigene, com igual resultado, mostrando a boa qualidade do DNA obtido por estes 2 métodos.

Em dois irmãos portadores de panhipopituitarismo, filhos de pais consangüíneos, não foi possível amplificar nenhum dos exons apesar de inúmeras tentativas. A integridade do DNA destes pacientes foi confirmada tanto pela presença de banda única de alto peso molecular em gel de agarose 1% quanto pela amplificação de outros genes.

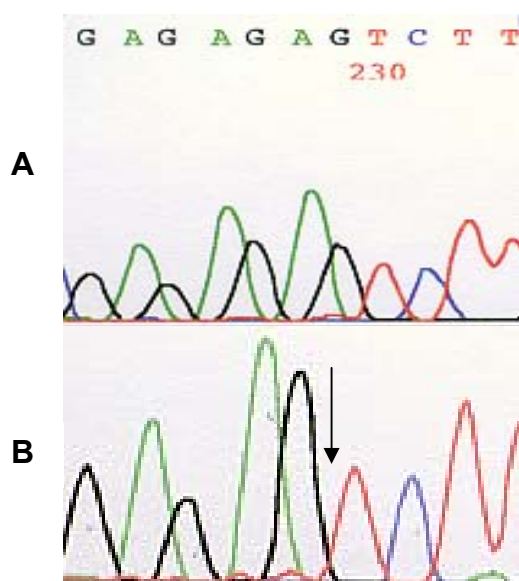


FIGURA 4. Sequenciamento do exon 2 do *PROP1* de um controle normal (A) e de um paciente (B) com panhipopituitarismo mostrando a deleção de um dinucleotídeo AG em homozigose

1.2 Relato dos casos com deleção do *PROP1*

O paciente 1, do sexo masculino nasceu de parto vaginal espontâneo a termo com 48 cm pesando 4700 g. O desenvolvimento psicomotor foi normal. A baixa estatura foi observada aos 7 anos quando se apresentou com uma altura de 90 cm (-5,4 SD) e a idade óssea era 2 anos e 9 meses. A altura do pai era de 180 cm (+0,79 SD), e a altura da mãe era 161 cm (-0,2 SD), sendo uma altura alvo de

164 cm para a menina e de 177 cm para o menino. Os testes de laboratório mostraram níveis muito baixos de GH sérico que não alcançaram níveis normais após estímulo com clonidina e hipoglicemia em testes separados (pico do GH, 1,0 ng/mL; normal, > 7 ng/mL). Os níveis basais de cortisol eram normais e elevaram-se adequadamente em resposta a hipoglicemia. O tratamento foi iniciado aos 7 anos com GH recombinante. Aos 14 anos, TSH, PRL e as deficiências gonadotróficas foram diagnosticadas após o teste combinado de estímulo hipofisário. O T4 livre era <0,2 ng/dl e o T3 era 41 ng/dl e a terapia de reposição da tiroxina foi iniciada. Aos 16 anos, era ainda pré-púbere sem pêlos pubianos e nível basal pré-púbere de DHEAS (53 ng/ml). Os níveis basais de cortisol variavam entre 3,5 a 4,2 ug/dl associados a sinais clínicos de deficiência de cortisol tendo sido iniciada a terapia de reposição com o acetato de cortisol. Aos 18 anos, o nível basal do cortisol era 3,4 ug/dl, DHEAS 15 ng/dl, continuando pré-púbere e o tratamento com testosterona foi prescrito. A RM da região hipotálamo-hipofisária foi realizada aos 18 anos mostrando ampliação do lóbulo hipofisário anterior (altura = 8,6 milímetros contra o $\pm 6,1 \pm 0,3$ milímetros em controles na mesma idade) e hiper sinal em T1 com aumento de imagem em vistas coronais e sagitais sem distinção entre o lóbulo hipofisário posterior e a haste hipofisária (Figura 5 B).

A paciente 2, do sexo feminino também nasceu de parto vaginal espontâneo a termo pesando 3100 g. A baixa estatura foi observada aos 9 anos e 10 meses e sua altura era 79,5 cm (-5,9 SD). Os níveis de GH eram muito baixos e não alcançaram níveis normais após o estímulo com hipoglicemia (pico do GH = 0,5 ng/mL; o normal, > 7 ng/mL) então o tratamento com GH

recombinante foi iniciado. Os níveis basais de cortisol eram normais e elevaram-se adequadamente em resposta a hipoglicemia. Em 10 anos, os níveis de TSH e de PRL indicaram um aumento em resposta ao estímulo com TRH, e os níveis de gonadotrofinas eram abaixo do limite de detecção do ensaio, ambos antes e após a administração de GnRH. O T4 livre=0,6 ng/dL; T3=85 ng/dL; DHEAS=85 ng/mL). O nível basal normal do cortisol (16,6 ug/dL) persistiu até sua última avaliação aos 15 anos (Figura 5 A).

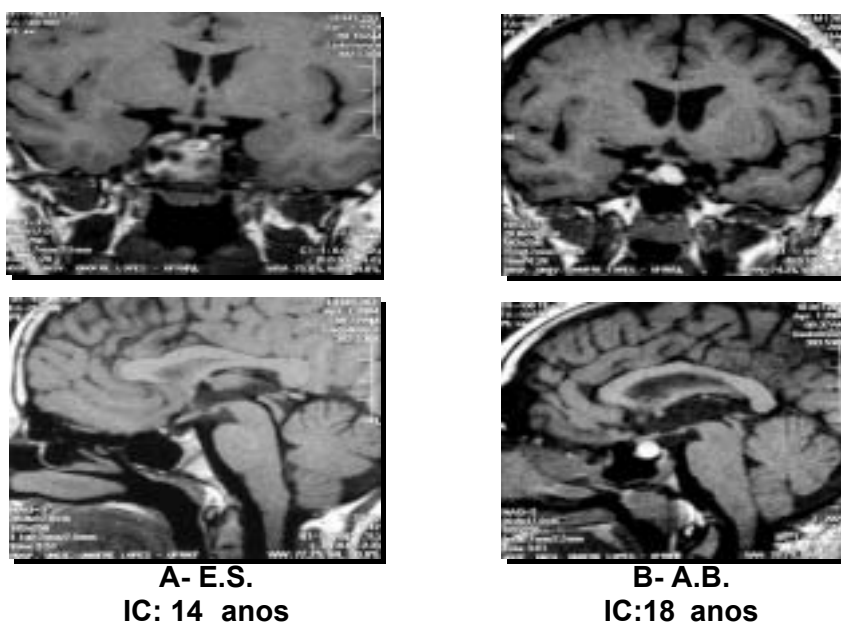


FIGURA 5. A Ressonância Magnética revelou haste normal e hipófise anterior hipoplásica na paciente do sexo feminino e massa hipofisária hiperintensa em T1 com extensão supra-selar no paciente do sexo masculino

1.3 Análise de microssatélites

Para testar a presença de deleção gênica, amplificamos os microssatélites já descritos para estudo do efeito fundador da mutação AG301-302 e 2 novos microssatélites descritos mais recentemente. Houve amplificação dos 3

microssatélites indicando que a deleção ocorreu entre os marcadores D5S2008 e D5S469, que flanqueiam o gene *PROP1*.

1.4 Southern Blotting

A análise pelo *Southern Blotting* revelou a presença da banda correspondente ao gene *CYP21A2* que foi usado como controle da reação em todos os indivíduos enquanto a banda referente ao gene *PROP1* foi ausente em ambos os irmãos, mas presente na mãe e nos controles. O ImageQuant Software (*Amersham Pharmacia Biotech*, Piscataway, NJ, USA) foi utilizado para quantificar o sinal da sonda do *PROP1* comparada ao sinal da sonda *CYP21A2*. O resultado indicou que ambos pacientes são portadores da deleção em homozigose enquanto que a mãe é portadora da deleção em heterozigose (Figura 6).

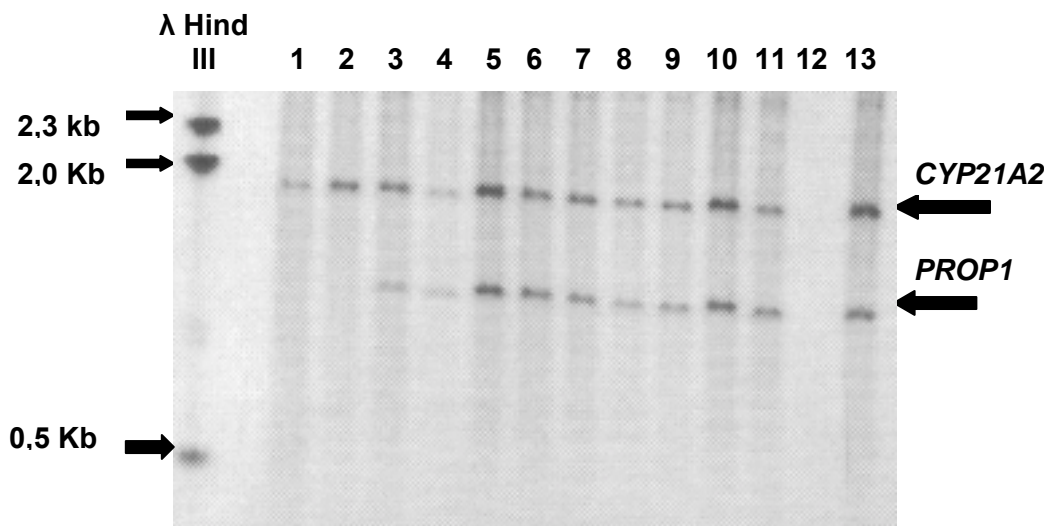


FIGURA 6. *Southern Blotting*: O DNA foi hibridizado com a sonda do *PROP1* (exon 2) e uma sonda controle do gene *CYP21A2* (exon 8). A banda correspondente ao gene *CYP21A2* está presente em todos os indivíduos enquanto a banda que representa o gene *PROP1* estava ausente nos dois pacientes (1 e 2), mas presente na mãe (3) e nos controles normais (4-13)

1.5 Determinação da extensão da deleção

Amplificamos o gene *Q8N6HO* que está localizado a 18,4 kb a jusante do *PROP1* e o STS WI-16216 a 59,4 kb a montante do *PROP1*. O STS GDB localizado a 6,0 Kb a montante do *PROP1* foi amplificado somente nos controles indicando que a deleção poderia ser de até 81 kb. Pela extensão da região foram desenhados novos *primers* a cada 1000 pb a partir do *PROP1*, para caracterizar o ponto de quebra do DNA. Os *primers* foram construídos baseados na seqüência do *contig* do cromossomo 5 (GenBank NT_077451). A região 2, localizada a 9,6 Kb a jusante do *PROP1* foi amplificada apenas nos controles. A região 1/2 foi amplificada nos pacientes e controles indicando que a quebra do DNA a jusante do *PROP1* ocorreu entre essas duas regiões. No outro lado a região 5 localizada a 11 Kb a montante do *PROP1* foi amplificada apenas nos controles e a região 5/6 foi amplificada nos pacientes e controles, indicando que o a quebra do DNA a montante do *PROP1* ocorreu entre essas duas regiões. Considerando os dois lados definimos a extensão da deleção em torno de 18,4 Kb (Figura 7).

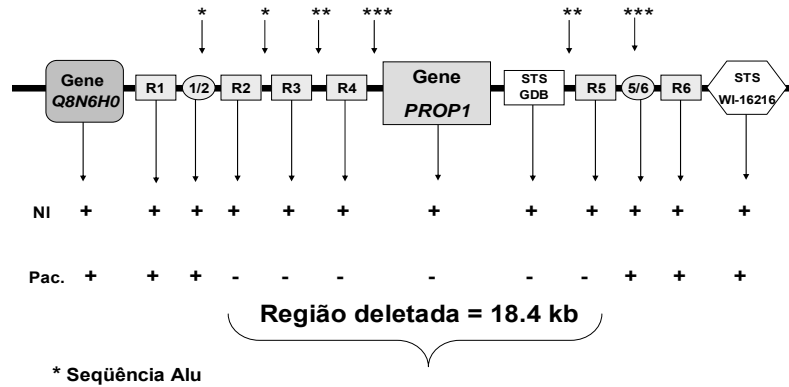


FIGURA 7. Localização dos marcadores e genes no *contig* do cromossomo 5. A região 2 localizada a 9,6 kb a jusante do *PROP1*, foi amplificada apenas nos controles. Região 1/2 foi amplificada nos pacientes e controles indicando que a quebra do DNA a jusante do *PROP1* ocorreu entre essas duas regiões. A região 5 localizada a 11 kb a montante do *PROP1* foi amplificada apenas nos controles e a região 5/6 foi amplificada nos pacientes e controles, indicando que a quebra do DNA a montante do *PROP1* está localizada entre essas duas regiões. Considerando ambos os lados, a extensão da deleção é de aproximadamente 18,4 Kb

2. Padronização das amostras extraídas de *swab* oral

2.1 Amostras extraídas com NaCl

O DNA obtido apresentou padrão de degradação em gel de agarose 1% porém com formação de bandas >12.000 pb. Estas amostras mostraram excelente eficiência na amplificação de fragmentos de até 1200 pb utilizando *primers* do gene *CYP21A2* em apenas 1 µL de DNA. (Figuras 8, 9, 10 e Tabela 6)

2.2 Amostras extraídas com o *Kit* comercial

O DNA obtido por este método apresentou menor padrão de degradação em gel de agarose 1% com banda presente >12000 pb. Fragmentos de 1000 pb do exon 10 do gene do receptor do *FSH* foram amplificados demonstrando boa

qualidade quando utilizado o volume de 5 μ L. Mesmo sendo um DNA de melhor qualidade, foi necessário um volume maior nas reações de PCR por apresentar menor concentração. Como o volume final da extração é de 20 μ L não é um método econômico quando se trata de amostras importantes e de difícil obtenção. (Figuras 8, 9, 10 e Tabela 6)

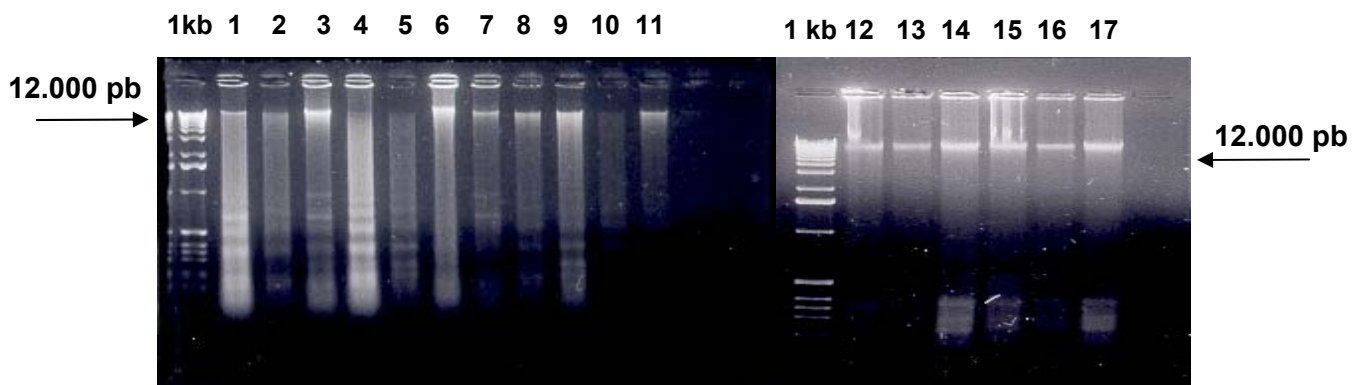


FIGURA 8. Amostras de DNA dos controles extraído de *swab* oral utilizando NaCl (colunas 1-11) ou *kit* comercial (12-17) em gel de agarose 1%. Observar presença de maior concentração de massa em torno de 12.000 pb em ambos os métodos

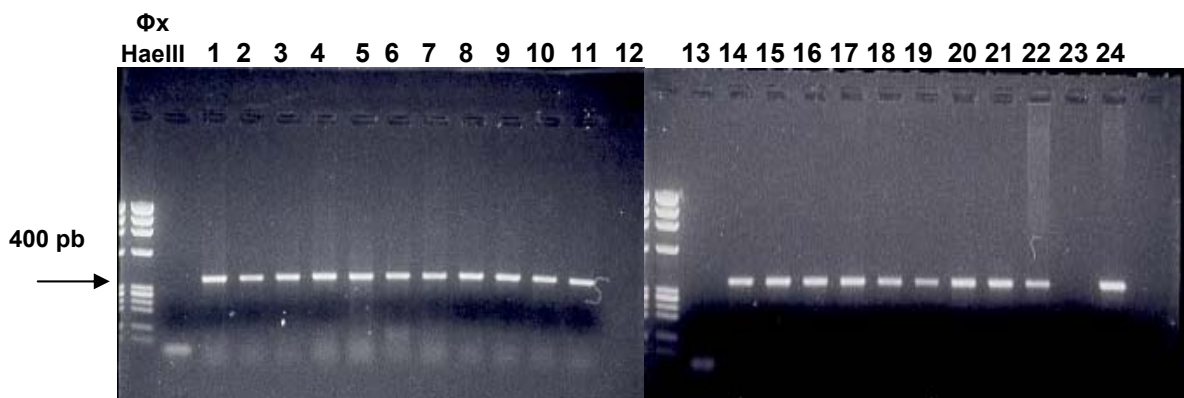


FIGURA 9. Amplificação do exon 2 do *PROP1* em amostras de DNA de controles extraídas de *swab* oral com NaCl (colunas 2-12), ou *kit* comercial (colunas 14-22) e de sangue periférico (coluna 24). Controles negativos da reação (colunas 1, 13 e 23)

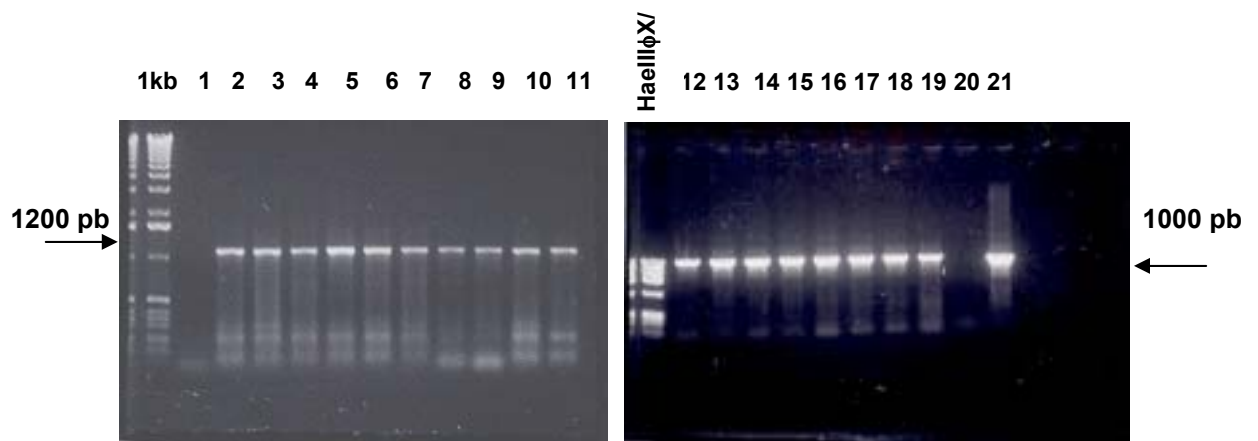


FIGURA 10. Amplificação de 1200 pb do gene *CYP21A2* em amostras de DNA de controles extraídas de *swab* oral com NaCl (colunas 2-11), e de 1000 pb do exon 10 do *FSHR* em amostras de DNA de controles extraídas com *kit* comercial (colunas 12-19) e sangue (coluna 21). Controles negativos da reação (colunas 1 e 22)

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS 2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE DNA DE CÉLULAS DE SWAB ORAL

MÉTODO UTILIZADO	VOLUME FINAL (µL)	CONC. DE DNA (ng/µL)	VOLUME NECESSÁRIO PARA AMPLIFICAÇÃO (µL)	TEMPO DE EXTRAÇÃO DO DNA (min)	CUSTO APROX. PARA 50 EXTRAÇÕES (R\$)
NaCl	60	80	1	160	200
<i>Kit Puregene</i>	20	50	5	240	500

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Mutações no gene *PROP1* constituem a causa mais freqüente de panhipopituitarismo de causa genética até hoje. Já foram descritas quinze diferentes mutações em pacientes com panhipopituitarismo de herança autossômica recessiva (19, 20, 21, 22, 23) (Tabela 1). Essas mutações estão localizadas dentro do domínio de ligação da proteína que se torna truncada com função abolida ou parcialmente funcional. A alteração mais frequentemente encontrada é a deleção de uma repetição AG: 301-302delAG. Esta mutação leva à formação de uma proteína truncada no códon 109 (20, 24). A proteína mutante perde a capacidade de ligação ao DNA e também à capacidade de ativação da transcrição. A ocorrência freqüente desta mutação sugere que a repetição AG no exon 2 predispõe a um alinhamento incorreto durante a replicação cromossômica. A deleção 301-302delGA introduz a um novo sítio de restrição *Bcg* I, tornando fácil o rastreamento desta deleção em pacientes com pan-hipopituitarismo. Quatro outras deleções também resultam em proteína truncada: 149-150delGA (19, 25), 150delA (26) e 112-124del (27), 157delA (28) assim, como uma nova mutação do tipo *nonsense* R99X (29). As proteínas mutantes perdem o domínio funcional de ligação ao DNA e a capacidade de ativação da transcrição. Também foram

relatadas mutações do tipo *missense*: R73C (19, 30), R73H (29), F88S (31), F117I (9,19), R120C (19, 24, 26), R99Q (32), Arg71Cys e Arg71His (33), que levam a perda parcial ou completa da função. Existe também uma mutação recorrente na região de *splice* no intron 2 c343-2 A>T (19, 30).

É notável a variabilidade no fenótipo dos pacientes com mutações no gene *PROP1*, incluindo o início do aparecimento das deficiências hormonais (19, 26), o tamanho hipofisário (21, 24, 26, 30) e a secreção de cortisol (21, 34). A maioria dos pacientes com mutações no gene *PROP1* apresentam deficiências hormonais de GH, PRL, TSH e gonadotrofinas, mas também podem apresentar deficiência de cortisol geralmente na idade adulta (21, 34). A maioria dos pacientes com hipopituitarismo por alterações moleculares no gene *PROP1* apresenta parênquima hipofisário diminuído à ressonância nuclear magnética (19, 24, 26, 30, 34), porém alguns pacientes durante a infância podem ter um período de aumento hipofisário seguido por uma diminuição (21) e em alguns casos seguido de novo aumento (35).

O estudo do gene *PROP1* em amostras de DNA de 24 pacientes com panhipopituitarismo, caracterizou 6 pacientes com a deleção AG 301-302. Esta mutação leva à formação de uma proteína truncada no códon 109 (20, 29). A proteína mutante perde as propriedades de ligação ao DNA e também à capacidade de ativação da transcrição. Cogan *et al.* demonstraram que as famílias afetadas com a mutação 301-302delAG não são relacionadas afastando a possibilidade de um efeito fundador (36). A troca de glicina por alanina na posição 51 no exon 2 foi encontrada em uma paciente em heterozigose. Esta alteração não foi encontrada em 100 alelos normais sugerindo tratar-se de uma

nova mutação. Os pais desta paciente foram estudados sendo que o pai apresentou a mesma alteração em heterozigose. Recentemente, esta mutação foi descrita em heterozigose em uma paciente australiana e como o seu pai também apresentava a mesma mutação foi considerada um polimorfismo (37). Entretanto, esta mesma mutação foi encontrada em homozigose, em outro paciente brasileiro, estudado pela Dra Maria Teresa Vieira na UNIFESP e a mutação segrega na família sugerindo ser esta a causa da doença. Estudos funcionais estão em andamento na Divisão de Endocrinologia, Metabolismo e Medicina Molecular da Universidade de Northwestern, Chicago, USA para definição desta mutação.

Para confirmar a presença da deleção, testamos a amplificação de microssatélites que flanqueiam o gene *PROP1*. Os marcadores D5S469 e D5S2008, localizados a uma distância de 1,0 e 0,1 Mb do gene, respectivamente são os mais próximos atualmente. O marcador mais próximo o D5S2008, localizado a uma distância de 0,1 Mb do *PROP1* foi amplificado nos dois pacientes indicando que esta deleção está dentro de um fragmento de 110.000 bp. Estudos complementares confirmaram a deleção completa do *PROP1*, ainda não descrita na literatura, apesar de terem sido relatados mais de 100 casos de mutações neste gene em pacientes com panhipopituitarismo.

Nesse trabalho relatamos a deleção completa do gene *PROP1* em dois irmãos com hipopituitarismo. A deleção foi confirmada pelo *Southern blotting* e a extensão da deleção foi determinada usando um mapa de STSs para delimitar o ponto de quebra. No *contig* do cromossomo 5 que contem o gene *PROP1* (Genebank # NT077451) foram identificadas diversas seqüências Alu que cercam

o *PROP1*. Estas repetições Alu são importantes para a diversidade genômica humana e podendo afetar o genoma de diversas maneiras (38) podendo causar mutações, inserções, recombinação entre elementos, conversões e alterações da expressão gênica. Conseqüentemente, é possível que a presença de diversas seqüências Alu flanqueando o gene *PROP1* poderia ter facilitado a quebra do DNA, causando a deleção deste gene.

A extração de DNA de leucócitos periféricos é o meio de obtenção de DNA mais amplamente utilizado e tem sido realizada por várias técnicas sendo que a técnica de extração com fenol-clorofórmio permite obtenção de DNA de melhor qualidade. Devido à toxicidade deste reagente atualmente se buscam alternativas para a extração de DNA de leucócitos periféricos, tendo sido utilizado o NaCl saturado neste estudo (17).

A coleta de células a partir de *swab* oral facilita a obtenção e encaminhamento da amostra, principalmente de recém-nascidos, crianças e pacientes que vivem em locais onde a coleta e o envio da amostra de sangue não é factível.

Com o intuito de padronizar uma metodologia para extração de DNA de *swab* oral para ser aplicada como rotina em nosso laboratório testamos duas técnicas, uma delas caseira, com NaCl, e a outra comercial (*Puregene, Gentra Systems*, Minneapolis, MN, USA) utilizando como modelos de amplificação o gene *PROP1* e o gene *FSHR* em DNA de indivíduos normais e pacientes com hipopituitarismo. O NaCl foi utilizado para extrair o DNA de *swab* de células de mucosa oral por apresentar propriedades químicas de precipitação relativamente semelhantes às do fenol. O método caseiro, utilizando o NaCl mostrou-se rápido,

fácil e barato e resultou num DNA de qualidade, sendo possível a amplificação dos 3 exons do gene *PROP1*, além de fragmentos de até 1200 pb do *CYP21A2* e 1000 pb do *FSHR*.

Os *kits* comerciais para extração de DNA são previamente testados e aprovados, geralmente apresentando maior credibilidade em relação aos métodos caseiros, mas muitas vezes são inviáveis devido ao custo elevado. A extração com *kit* comercial (Puregene, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) comparada à extração com NaCl, apresentou menor rendimento, maior tempo de execução e custo 2 vezes maior.

Em conclusão, padronizamos a técnica de extração de DNA de células de *swab* oral com NaCl que quando comparada à extração com *kit* comercial apresentou menor custo e maior rapidez indicando ser esta uma forma confiável de obtenção de DNA para estudos genéticos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Identificamos a mutação delAG301-302 em 6 pacientes, 4 (16%) em homozigose e 2 (8%) em heterozigose, e a mutação G51A em heterozigose em uma paciente entre os 24 pacientes com panhipopituitarismo de origem hipofisária estudados
2. Identificamos em 2 irmãos com panhipopituitarismo de origem hipofisária a deleção total do gene *PROP1* compreendida num fragmento deletado de 18,6 pb. A presença de várias seqüências Alu próximas ao gene é a provável causa da deleção do *PROP1*
3. Padronizamos a técnica de extração de DNA de células de *swab* oral com NaCl que quando comparada à extração com *kit* comercial apresentou menor custo e maior rapidez indicando ser esta uma forma prática de obtenção de DNA para estudos genéticos.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Sheng HZ, Westphal H** 1999 Early steps in pituitary organogenesis. Trends Genet 15:236-40
2. **Treier M, Rosenfeld MG** 1996 The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. Curr Opin Cell Biol 8:833-43.
3. **Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carriere C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG** 1996 Pituitary lineage determination by the Prophet of *Pit-1* homeodomain factor defective in Ames dwarfism. Nature 384:327-33
4. **Dasen JS, Rosenfeld MG** 2001 Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. Annu Rev Neurosci 24:327-55
5. **Lopez-Bermejo A, Buckway CK, Rosenfeld RG** 2000 Genetic defects of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. Trends Endocrinol Metab 11:39-49.
6. **Mullis PE** 2000 Transcription factors in pituitary gland development and their clinical impact on phenotype. Horm Res 54:107-19

7. **Rosenfeld MG, Briata P, Dasen J, Gleiberman AS, Kioussi C, Lin C, O'Connell SM, Ryan A, Szeto DP, Treier M** 2000 Multistep signaling and transcriptional requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Recent Prog Horm Res* 55:1-13
8. **Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG** 1998 Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 12:1691-704.
9. **Watkins-Chow DE, Camper SA** 1998 How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *Trends Genet* 14:284-90.
10. **Lijnen and G. Willems** 2001 DNA research in forensic dentistry *Methods Find Exp. Clin Pharmacol* 23: 9-511.
11. **Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R** 1991 Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Bio Techniques* 10:506-13
12. **Singer D, Lorente M, Valenzuela A Lorente J, Alvarez J** 1996 Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method *Forens Sci International* 83:167-177
13. **Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M.** Standfords from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children *Arch. Dis. Child.* 41:613, 1966
14. **Marshall WA, Tanner JM,** 1969. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child Jun*;44(235):291-303
15. **Marshall WA, Tanner JM,** 1970. Variations in pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child Feb*;45(239):13-23.

16. **Greulich W. N, Pyle SI.** Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist, 2nd Edition , Standford CA. Standford University Press, Second edition, 1959
17. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HA** 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* Feb11;16(3):1215.
18. **Southern, E.M.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, v.98, p.503-17, 1975.
19. **Deladoey J, Fluck C, Buyukgebiz A, Kuhlmann BV, Eble A, Hindmarsh PC, Wu W, Mullis PE** 1999 "Hot spot" in the *PROP1* gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1645-50
20. **Fofanova OV TN, Kinoshita E, et al.** 1999 A mutational hot spot in the *PROP-1* gene in Russian children with combined pituitary hormone deficiency. *Pituitary* 1:45-49
21. **Mendonca BB, Osorio MGF, Latronico AC, Estefan V, Lo LSS, Arnhold IJP** 1999 Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the *PROP-1* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 84:942-945
22. **Nogueira CR, Sabacan L, Jameson JL, Medeiros-Neto G, Kopp P** 1999 Combined pituitary hormone deficiency in an inbred Brazilian kindred associated with a mutation in the *PROP-1* gene. *Mol Genet Metab* 67:58-61
23. **Rosenbloom AL AA, Brown MR, Fisher DA, Baumbach L, Parks JS** 1999 Clinical and biochemical phenotype of familial anterior hypopituitarism from mutation of the *PROP1* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 84:50-57

24. **Wu W CJ, Pfäffle RW** 1998 Mutations in *PROP1* cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet.* 18:147-149
25. **Fofanova O, Takamura N, Kinoshita E, Parks JS, Brown MR, Peterkova VA, Evgrafov OV, Goncharov NP, Bulatov AA, Dedov, II, Yamashita S** 1998 Compound heterozygous deletion of the *PROP-1* gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2601-4
26. **Krzisnik C KZ, Battelino T, Brown M, Parks JS, Laron Z.** 1999 The "Little People" of the island of Krk revisited. Etiology of hypopituitarism revealed. *J Endocrine Genet.* 1:9-19
27. **Agarwal G, Bhatia V, Cook S, Thomas PQ** 2000 Adrenocorticotropin deficiency in combined pituitary hormone deficiency patients homozygous for a novel *PROP1* deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4556-61.
28. **Tatsumi KI, Kikuchi K, Tsumura K, Amino N.** 2004 A novel *PROP1* gene mutation (157delA) in Japanese siblings with combined anterior pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* Nov: 61(5):635-40.
29. **Vallette-Kasic S, Barlier A, Teinturier C, Diaz A, Manavela M, Berthezene F, Bouchard P, Chaussain JL, Brauner R, Pellegrini-Bouiller I, Jaquet P, Enjalbert A, Brue T** 2001 *PROP1* gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and a high incidence of corticotroph deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4529-3
30. **Duquesnoy P, Roy A, Dastot F, Ghali I, Teinturier C, Netchine I, Cacheux V, Hafez M, Salah N, Chaussain JL, Goossens M, Bougneres P, Amselem S** 1998 Human *Prop-1*: cloning, mapping, genomic structure.

Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. FEBS Lett 437:216-20

- 31. Osorio MG, Kopp P, Marui S, Latronico AC, Mendonca BB, Arnhold IJ**
2000 Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of *PROP-1*. J Clin Endocrinol Metab 85:2779-85
- 32. Vieira TC, Silva MRD, Cerutti JM, Brunner E, Borges M, Arnaldi LT, Kopp P, Abucham J** 2003 Familial combined pituitary hormone deficiency due to a novel mutation R99Q in the Hot Spot region of Prophet of *Pit1* presenting as constitutional growth delay J Clin Endocrinol Metab 88:38-44
- 33. Paracchini R, Giordano M, Corrias A, Mellone S, Matarazzo P, Bellone J, Momigliano-Richiardi P, Bona G.** Two new PROP1 gene mutations responsible for compound pituitary hormone deficiency 2003 Clin Genet 64:142-147.
- 34. Pernasetti F, Toledo SP, Vasilyev VV, Hayashida CY, Cogan JD, Ferrari C, Lourenco DM, Mellon PL** 2000 Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301-302delAG) in the prophet of *Pit-1* gene. J Clin Endocrinol Metab 85:390-7
- 35. Netchine I, Esteva B, Blustajn J, Thibaud N, Gourmelen M, Rossignol S, Amselem S, Le Bouc Y,** 2002 Onset of Hypocortisolism in a familial case of combined pituitary hormone deficiency caused by a mutation in the PROP1 gene is independent of anterior pituitary size variation. Proceedings of the

41st Annual Meeting of The European Society for Pediatric Endocrinology,
Madrid, Spain, abstract P2-334

36. **Cogan JD WW, Phillips JA et al.** 1998 The *PROP1* 2-bp deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3346-3349
37. **Mclennan K, Jeske Y, Cotterill A, Cowley D, Penfold J, Jones T, Howard N, Thomsett M, Choong C** 2003. Combined pituitary hormone deficiency in Australian children: clinical and genetic correlates. *J Clin Endocrinol Metab* 58:785-794
38. **Batzer MA, Deininger PL.** 2002 Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet.* May; 3(5):370-9.