



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR EM UMA COORTE DE  
PORTADORES DE DEFICIÊNCIA DE  
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA BAHIA**

**ANA CLÁUDIA COUTO SANTOS DA SILVA**

**Salvador – Brasil  
2010**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR EM UMA COORTE DE  
PORTADORES DE DEFICIÊNCIA DE  
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA BAHIA**

**ANA CLÁUDIA COUTO SANTOS DA SILVA**

Orientadora: Profa. Dra. Angelina Xavier Acosta

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

Área de Concentração: Epidemiologia Molecular e Medicina Investigativa.

**Salvador – Brasil  
2010**

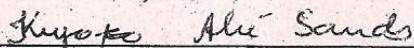


"ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR DE UMA COORTE DE PORTADORES DE DEFICIÊNCIA DE  
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA BAHIA"

ANA CLÁUDIA COUTO SANTOS DA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

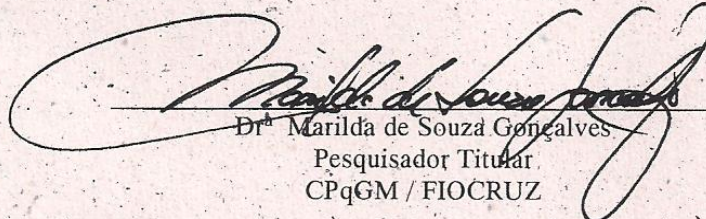
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr<sup>a</sup> Kiyoko Abé Sandes  
Professor Pleno  
UNEB



Dr<sup>a</sup> Luciana Mattos Barros Oliveira  
Professor Adjunto  
UFBA



Dr<sup>a</sup> Marilda de Souza Gonçalves  
Pesquisador Titular  
CPqGM / FIOCRUZ



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586e Silva, Ana Cláudia Couto Santos da.  
Estudo clínico e molecular em uma coorte de portadores de deficiência de hormônio do crescimento na Bahia. [manuscrito] / Ana Cláudia Couto Santos da Silva. - 2010.  
133 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa  
Gonçalo Moniz. 2010.

Orientador: Profª. Dra. Angelina Xavier Acosta, Laboratório Avançado  
de Saúde Pública-LASP

1. Hormônio do crescimento. 2. Lobo posterior da hipófise. 3.HESX1.4.  
LHX4 5.OTX2 6. Mutação 7. Ectopia I.Título.

CDU 612.062:612.434

**Dedico este trabalho**

**Aos meus queridos pais, *Walter e Adelize*, meus**

**primeiros e maiores mestres**

**e**

**A *todos os pacientes* que, com suas histórias**

**de vida, enriquecem minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido chegar até aqui.

A minha orientadora, Profa. Dra. Angelina Xavier Acosta, que sempre esteve disponível para discutir cada etapa desse trabalho.

À Profa. Dra. Kiyoko Abé-Sandes que, com suas explicações precisas, ajudou-me a desvendar alguns mistérios da biologia molecular.

A todos os membros do Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), em especial ao Prof. Dr. Bernardo Galvão, chefe do Laboratório quando da minha chegada, e à Profa. Dra. Fernanda Grassi, atual chefe do LASP, que me acolheram, permitindo que esse trabalho se concretizasse. Agradeço ainda a Sra. Eugênia, nossa querida “Lindinha”, pelo carinho e atenção dispensados.

A todos os membros do Grupo de Pesquisa Genlasp: Carol, Gabrielle, Marcela, Fabiana pelo apoio e incentivo ao longo desses quatro anos. Agradeço ainda, em especial, a Taísa e Thais, pela forma paciente e atenciosa que me iniciaram nas técnicas de biologia molecular e a Taise pela inestimável ajuda nas fases finais do trabalho.

A Filipe Rêgo, pela análise de todas as sequências da tese.

A Dr. Luís Fernando Adan, que iniciou o ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do CEDEBA, sendo, por isso, precursor desse trabalho.

Aos funcionários do laboratório do CEDEBA, especialmente às senhoras Alda, Elza, Maria Auxiliadora e Jaciara e aos bioquímicos, Ângela, Gervásio e Rose, pela coleta e armazenamento do material biológico dos pacientes.

À Régila, grande amiga e assistente social do Setor Infante Juvenil do CEDEBA, que acreditou na viabilidade do projeto e, de forma incansável, recrutou cada paciente incluído nesse estudo.

A todos os funcionários do Laboratório DNA, em especial, à Profa. Dra. Maria Betânia Toralles, pela realização das dosagens hormonais.

À Dra. Cláudia Bomfim, que revisou as ressonâncias magnéticas dos pacientes.

A todos os médicos que encaminharam seus pacientes para a inclusão no estudo.

A Dra. Raja Brauner, a quem devo a minha formação em Endocrinologia Pediátrica.

A todos os pacientes e seus genitores ou responsáveis que, gentilmente, disponibilizaram-se a participar desse trabalho.

Enfim, a todos que, ao longo dos anos, têm sido parceiros nessa longa, e nem sempre fácil, caminhada.

## RESUMO

**Título:** Estudo Clínico e Molecular em uma Coorte de Portadores de Deficiência de Hormônio do Crescimento na Bahia

**Introdução:** A deficiência de hormônio do crescimento (DGH) tem incidência estimada entre 1/4.000 a 1/10.000 nascidos vivos e pode ser isolada ou associar-se a outras deficiências hormonais. Como não há exame “padrão-ouro”, o seu diagnóstico baseia-se em critérios antropométricos associados a pico diminuído de GH após testes de estímulos farmacológicos. Mais recentemente, a presença de ectopia do lobo posterior hipofisário (ELP) à ressonância nuclear magnética de hipófise (RNMH) tem sido considerada marcador de DGH e mutações em genes associados à embriogênese hipofisária têm sido descritas nesse pacientes. O objetivo do trabalho foi descrever as características clínicas, moleculares e radiológicas de uma coorte de portadores de DGH, acompanhada num mesmo centro de referência (Centro de Diabetes e Endocrinologia da Bahia), entre dezembro de 1998 e dezembro de 2009. **Métodos:** todos os pacientes realizaram avaliação da função hipofisária e RNMH. O estudo foi dividido em duas partes. Na primeira, foram incluídos apenas pacientes com DGH e ELP (n=130), sendo realizada a caracterização fenotípica da população. Além disso, mutações nos genes HESX1, LHX4 e OTX2 foram avaliadas em 104 pacientes, pelos métodos de PCR e SSCP ou PCR e sequenciamento. Na segunda parte do estudo, foi comparada a resposta terapêutica no primeiro ano de tratamento com hormônio do crescimento nos pacientes com (n=58) e sem (n=26) ELP. **Resultados:** No subgrupo de pacientes com ELP observou-se grande variabilidade fenotípica. Deficiência hormonal hipofisária combinada foi descrita em 61,5% dos pacientes, sendo mais frequente naqueles nos quais a haste hipofisária não foi visualizada. Malformações cerebrais ocorreram em 9,2% dos pacientes. Trinta pacientes apresentaram mutações, não descritas anteriormente, em genes associados à embriogênese hipofisária, sendo 26 no LHX4 e cinco no HESX1. Mutações no OTX2 não foram identificadas nessa população. A segunda parte do estudo evidenciou que a velocidade de crescimento durante o tratamento com GH foi similar nos pacientes com e sem ELP. **Conclusões:** o estudo, que avaliou a maior casuística de pacientes com DGH associada à ELP já descrita, confirma a heterogeneidade fenotípica da população, além da baixa prevalência de mutações na mesma. Além disso, ao contrário de estudos prévios, demonstra que a presença de ELP não se associou a melhor resposta ao tratamento com GH.

**Palavras-chave:** hormônio do crescimento, mutação, HESX1, LHX4, OTX2, ectopia, lobo posterior da hipófise.



## ABSTRACT

**Title:** Clinical and Molecular Study in a Cohort of Growth Hormone Deficient Patients in Bahia

The estimated incidence of growth hormone deficiency (GHD) is between 1/4.000 and 1/10.000 among live births. It may be isolated or associated with other hormone deficiencies. As there is no gold standard test, the diagnosis of GHD relies on anthropometric criteria associated with decreased GH peak after pharmacological stimulation tests. More recently, the description of ectopic posterior pituitary lobe (EPPL) on magnetic resonance imaging (MRI) has been considered a marker of GHD and mutations in genes involved in pituitary gland organogenesis have been described in these patients. The aim of this study was to describe clinical, molecular and radiological characteristics of a cohort of GHD patients followed, in a single reference center (Diabetes and Endocrinology Center or Bahia), between December 1998 and December 2009. **Methods:** all patients underwent pituitary function evaluation and MRI. The study was divided in two parts. In the first one, only patients with GHD and EPL were included (=130) and phenotypic characterization of the population was performed. In addition, mutations in HESX1, LHX4 and OTX2 genes were investigated in 104 patients using polymerase chain reaction (PCR) plus single strand conformation polymorphism (SSCP) or PCR and automatic sequencing. In the second part of the study, the growth pattern in the first year of GH treatment was compared in patients with (n=58) and without (n=26) EPPL. **Results:** Large phenotypic variability was observed in the subgroup of patients with EPPL. Combined pituitary deficiency was described in 61.5% of the patients, more frequent in those with no visible pituitary stalk. Cerebral malformations were described in 9.2% of the patients. Thirty patients have mutations, not described in previous studies, 26 in LHX4 and five in HESX1. OTX2 mutations were not identified in this population. The second part of the study showed similar growth pattern in patients with and without EPPL. **Conclusions:** The study, with the largest cohort of GHD patients associated with EPPL already described, confirms the phenotypic heterogeneity of the population and the low prevalence of mutations in genes involved in pituitary embryogenesis. Furthermore, unlike previous studies, the presence of EPPL was not associated with a better growth response to human growth hormone therapy.

**Key-words:** growth hormone, mutation, HESX1, LHX4, OTX2, ectopic, pituitary posterior lobe.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **INTRODUÇÃO**

Figura 1	A glândula hipofisária	17
Figura 2	Hormônios hipofisários e ação periférica	17
Figura 3	Estágios do desenvolvimento hipofisário em roedores	18
Figura 4	Moléculas sinalizadoras e fatores transcricionais envolvidos na embriogênese hipofisária	19
Figura 5	Proteínas homeodomínio	21
Figura 6	Hipófise normal nas diversas fases da vida	29
Figura 7	Hipófise normal e síndrome de interrupção de haste hipofisária (PSIS)	31
Figura 8	Eixo hipotálamo-hipofisário	35
Quadro 1	Mutações no HESX1 em pacientes com NH ectópica ou ausente	33
Quadro 2	Mutações no LHX4 em pacientes com NH ectópica ou ausente	34
Quadro 3	Mutações no OTX2 em pacientes com NH ectópica ou ausente	34
Quadro 4	Causas de baixa estatura	37
Quadro 5	Alterações clínicas associadas ao hipopituitarismo	39

### **MATERIALE MÉTODOS**

Figura 1	Estratégia de seleção dos pacientes	48
Figura 2	Estratégia do estudo molecular	48

### **ARTIGO 1**

Figura 1	<i>Status</i> gonadotrófico dos 67 pacientes do sexo masculino acima dos 14 anos na última avaliação	56
Figura 2	<i>Status</i> gonadotrófico das 25 pacientes do sexo feminino acima dos 13 anos na última avaliação	57
Quadro 1	Prevalência da disfunção hormonal nos 80 casos de DHHC	58
Quadro 2	Malformações cerebrais nos pacientes com ELP	58

### **ARTIGO 2**

Figura 1	Transição de A>G no éxon 3 do HESX1 e no éxon 6 do LHX4	73
----------	---	----

## LISTA DE TABELAS

### **ARTIGO 2**

Tabela 1	Características clínicas, hormonais e radiológicas dos 19 pacientes com mutações em heterozigose no éxon 6 do LHX4	74
Tabela 2	Características clínicas, hormonais e radiológicas dos sete pacientes com mutações em homozigose no éxon 6 do LHX4	75
Tabela 3	Características clínicas, hormonais e radiológicas dos cinco pacientes com mutações em heterozigose no éxon 3 do HESX1	75

### **ARTIGO 3**

Tabela 1	Parâmetros antropométricos dos 58 pacientes com DGH e ELP (Grupo A) antes e um ano após tratamento com GH	88
Tabela 2	Parâmetros antropométricos dos 26 pacientes com DGH sem ELP (Grupo B) antes e um ano após tratamento com GH	88
Tabela 3	Comparação dos 84 pacientes portadores de DGH com (Grupo A) e sem (Grupo B) ELP	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACTH</b>	Hormônio corticotrófico
<b>ADH</b>	Hormônio antidiurético
<b>AH</b>	Adeno-hipófise
<b>AVP</b>	Arginina-vasopressina
<b>BR</b>	Bolsa de Rathke
<b>DGH</b>	Deficiência de GH
<b>DGHI</b>	Deficiência de GH isolada
<b>DHHC</b>	Deficiência hormonal hipofisária combinada
<b>DI</b>	Diabetes insipidus
<b>DSO</b>	Displasia do septo ótico
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidermal)
<b>ELP</b>	Ectopia do lobo posterior
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento de fibroblastos)
<b>FSH</b>	Hormônio folículo-estimulante
<b>GH</b>	<i>Growth hormone</i> (hormônio do crescimento)
<b>GHRH</b>	<i>Growth hormone-releasing hormone</i> (hormônio liberador do hormônio do crescimento)
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotrophin releasing hormone</i> (hormônio liberador de gonadotrofinas)
<b>HESX1</b>	<i>Homeobox embryonic stem cell</i>
<b>IGF-1</b>	<i>Insulin-like growth factor 1</i> (fator de crescimento insulina-símile 1)
<b>IGFBP-3</b>	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i> (proteína ligadora 3 do IGF)
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>LHX3</b>	<i>Lim homeobox protein 3</i>
<b>LHX4</b>	<i>Lim homeobox protein 4</i>
<b>MSH</b>	Hormônio estimulador dos melanócitos
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NH</b>	Neuro-hipófise
<b>OTX2</b>	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)

<b>PSIS</b>	<i>Pituitary stalk interruption syndrome</i> (síndrome de interrupção de haste hipofisária)
<b>PIT1 ou POU1F1</b>	<i>POU class 1 homeobox 1</i>
<b>PITX1</b>	<i>Paired-like homeodomain transcription factor 1</i>
<b>POMC</b>	Pró-opiomelanocortina
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PROP-1</b>	<i>Prophet of Pit-1</i>
<b>RNMH</b>	Ressonância nuclear magnética de hipófise
<b>RPX</b>	<i>Rathke pouch homeobox</i>
<b>SHH</b>	<i>Sonic hedgehog signaling</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOX</b>	<i>SRY-related high mobility group</i>
<b>SSCP</b>	<i>Single strand conformation polymorphism</i> (polimorfismo conformacional de fita simples)
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factors</i> (fatores transformadores do crescimento)
<b>TSH</b>	Hormônio estimulador da tireoide

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>1. A Hipófise</b>	16
1.1. Embriologia e Anatomia da Glândula Hipofisária	16
1.2. Fatores Sinalizadores da Organogênese Hipofisária	18
1.3. Fatores de Transcrição e a Organogênese Hipofisária	20
1.3.1. Fatores de Transcrição Implicados no Desenvolvimento Hipofisário Precoce	21
1.3.2. Fatores de Transcrição Associados à Diferenciação de Células Hipofisárias	26
<b>2. Avaliação Radiológica da Região Hipotálamo-Hipofisária</b>	28
2.1. Aspectos Radiológicos da Hipófise Normal	28
2.2. RNMH e DGH	30
<b>3. Alterações Genéticas no Hipopituitarismo</b>	32
<b>4. O Eixo Hipotálamo-Hipófise-GH e o Crescimento Normal</b>	35
<b>5. Baixa Estatura e Deficiência de GH</b>	36
5.1. Definição e Causas de Baixa Estatura	36
5.2. Deficiência de GH	37
5.2.1. Epidemiologia e Causas	37
5.2.2. Apresentação Clínica	38
5.2.3. Diagnóstico	40
5.2.4. Tratamento	41
<b>JUSTIFICATIVA</b>	43
<b>OBJETIVOS</b>	45
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	47
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	49
<b>Resumo do artigo 1</b>	50
<b>Artigo 1: Características clínicas e laboratoriais de 130 pacientes com ectopia da hipófise e deficiência de hormônio do crescimento</b>	51
Resumo	51
Introdução	52



Material e Métodos	52
Resultados	54
Discussão	59
Referências Bibliográficas	62
<b>Resumo do Artigo 2</b>	<b>67</b>
<b>Artigo 2: Análise de Mutações nos Genes HESX1, LHX4 e OTX2 em 104 Pacientes Com Ectopia do Lobo Posterior Hipofisário</b>	<b>68</b>
Resumo	68
Introdução	69
Pacientes e Métodos	70
Resultados	72
Discussão	76
Referências Bibliográficas	78
<b>Resumo do Artigo 3</b>	<b>83</b>
<b>Artigo 3: Avaliação da Resposta no Primeiro ano de Tratamento com Hormônio do Crescimento em Pacientes com Deficiência de GH com e sem Ectopia do Lobo Posterior Hipofisário</b>	<b>84</b>
Resumo	84
Introdução	85
Material e Métodos	86
Resultados	87
Discussão	89
Referências Bibliográficas	91
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>120</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>130</b>

## **ESTRUTURA**

Após os itens INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS, esta tese apresenta a METODOLOGIA resumida do trabalho. Os RESULTADOS são apresentados em três artigos científicos, que trazem o detalhamento da metodologia empregada e a DISCUSSÃO sobre o aspecto abordado em cada um deles.

O item CONSIDERAÇÕES FINAIS contém interpretações e comentários finais sobre todos os artigos científicos apresentados e sobre o conjunto do trabalho. O item CONCLUSÕES traz as conclusões gerais da tese.

O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS refere-se às citações que aparecem na tese e nos artigos.

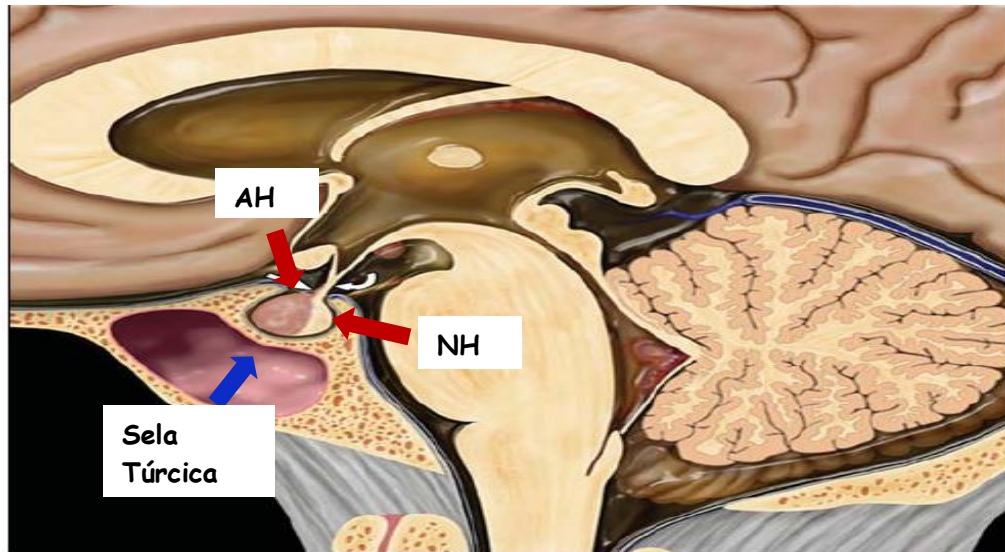
Em APÊNDICE e ANEXOS encontram-se dados adicionais do trabalho.

# ***INTRODUÇÃO***

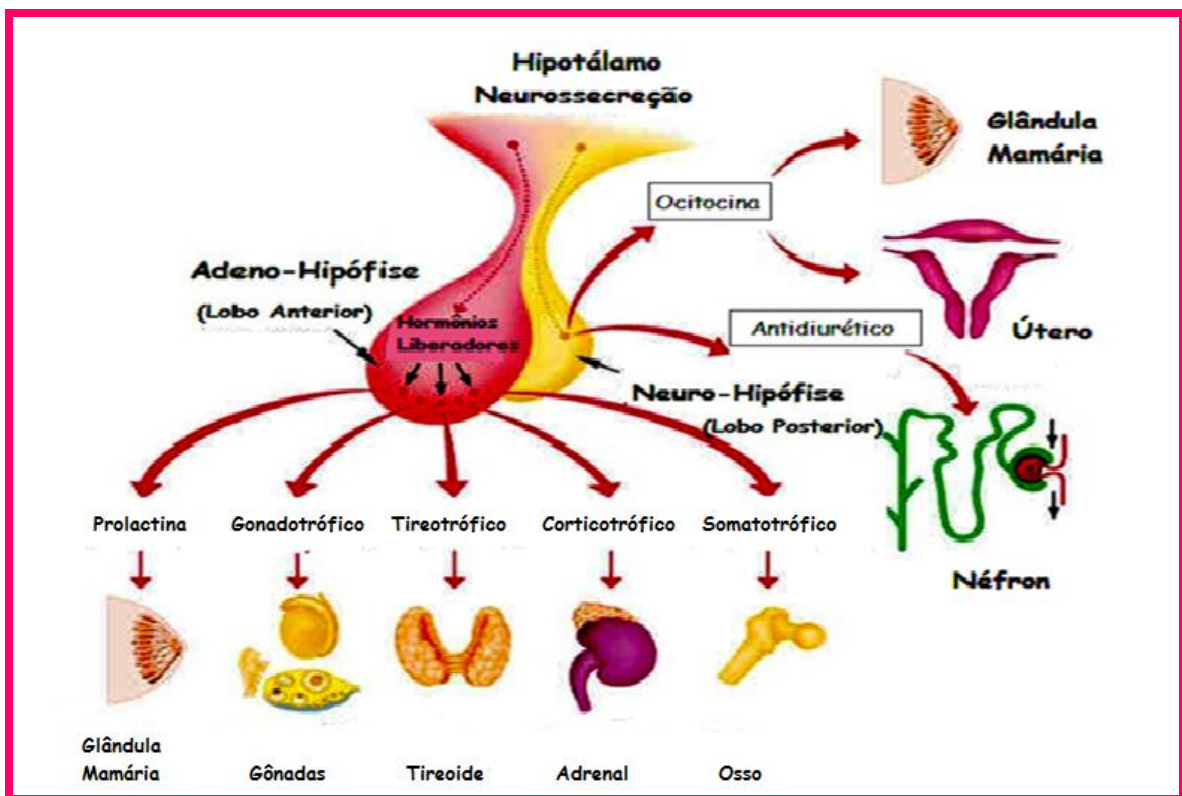
## 1. A Hipófise

### 1.1. Embriologia e Anatomia da Glândula Hipofisária

A hipófise ou pituitária é uma glândula endócrina que desempenha papel vital no controle do crescimento pós-natal, reprodução, metabolismo e homeostase. Situa-se na sela túrcica, no osso esfenoide, na base do crânio, e sua forma madura é constituída de adeno-hipófise (AH) e neuro-hipófise (NH) (Figura 1). A AH é formada pelos lobos anterior e intermediário, enquanto que a NH é composta pelo lobo posterior (Kelberman & Dattani, 2006; Alatzoglou & Dattani, 2009). O lobo anterior contém população de cinco tipos celulares responsáveis pela produção de seis hormônios, os quais desempenham ações específicas em resposta a sinais hipotalâmicos e periféricos (Figura 2). Essas células são designadas em função dos hormônios produzidos: corticotrofos (hormônio corticotrófico, ACTH); gonadotrofos (hormônio luteinizante, LH e hormônio folículo-estimulante, FSH); somatotrofos (hormônio do crescimento, GH); lactotrofos (prolactina, PRL) e tireotrofos (hormônio estimulador da tireoide, TSH) (Ikeda et al., 1988; Drummond et al., 2003). O lobo intermediário contém melanotrofos, produtores de pró-opiomelanocortina (POMC), precursor do hormônio estimulador dos melanócitos (MSH) e das endorfinas. A POMC é também precursora do ACTH e se expressa ainda nos corticotrofos no lobo anterior (Kelberman & Dattani, 2006; Alatzoglou & Dattani, 2009). O lobo intermediário em humanos, em contraste com o que ocorre nos camundongos, desaparece na embriogênese. Por isso, a AH em humanos é constituída apenas pelo lobo anterior. O lobo posterior hipofisário consiste de projeções axonais de neurônios, cujos corpos celulares encontram-se no hipotálamo, e secreta ocitocina e arginina-vasopressina (AVP), também chamada de hormônio antidiurético (ADH). Sob ação hipotalâmica a AVP controla o balanço hidroeletrolítico, enquanto que a ocitocina é requerida no parto e na lactação. O hipotálamo localiza-se superiormente à hipófise madura e tem projeções neuronais no córtex cerebral e eminência média. Os hormônios hipotalâmicos são transportados para os lobos intermediário e anterior da hipófise pelo sistema vascular portal. As projeções neuronais para a hipófise e o sistema sanguíneo portal são carreados pelo infundíbulo ou haste hipofisária. Assim, qualquer dano à haste pode resultar em disfunção hipofisária anterior ou posterior (Kelberman & Dattani, 2006).



**Figura 1:** A glândula hipofisária. AH, adeno-hipófise e NH, neuro-hipófise. Fonte: Adaptado de Hamilton et al., 2007.



**Figura 2:** Hormônios hipofisários e ação periférica. Fonte: Adaptado de César e Sezar. Biologia 2. São Paulo, Editora Saraiva, 2002.

As origens embriológicas da AH e da NH são distintas. A primeira origina-se da bolsa de Rathke (BR), invaginação do ectoderma oral, enquanto que a segunda deriva do neuroectoderma cerebral. No final do desenvolvimento embrionário, os dois lobos da hipófise são unidos na sela túrcica (Sheng & Westphal, 1999).

O desenvolvimento hipofisário é similar em todos os vertebrados, tendo sido mais bem estudado em roedores (Kelberman & Dattani, 2006). Este processo ocorre em quatro estágios distintos (Figuras 3 e 4): a) formação da bolsa rudimentar, b) desenvolvimento de BR rudimentar, c) formação da bolsa definitiva e d) diferenciação de vários tipos celulares. A primeira fase da organogênese hipofisária, que ocorre no dia embrionico (DE) 8,5 do camundongo (4-6 semanas de gestação no embrião humano), consiste na formação da bolsa rudimentar. A placa da bolsa rudimentar surge como espessamento do ectoderma oral no teto da cavidade oral. No DE 9,0 a placa invagina-se para formar um leito epitelial, ou seja, a BR rudimentar, primórdio do lobo hipofisário anterior. Ao mesmo tempo, o diencéfalo ventral projeta-se externamente para formar o infundíbulo e a hipófise posterior. Posteriormente, forma-se a BR definitiva e, na última etapa da embriogênese hipofisária, ocorre diferenciação e proliferação celulares. Os cinco tipos celulares são originados de linhagem celular comum e surgem de forma precisa no tempo e em determinada posição da hipófise. Aproximadamente no DE 12,5, corticotrofos diferenciados aparecem na região ventral da hipófise e, um dia depois, aparecem os tireotrofos. Segue-se a diferenciação de melanotrofos no lobo intermediário no DE 14,5 e, entre os DE 15,5-16, surgem as células somatotróficas, lactotróficas e gonadotróficas. No DE 17,5 todas as células produtoras de hormônios já concluíram sua diferenciação e estão espacialmente distribuídas na glândula.



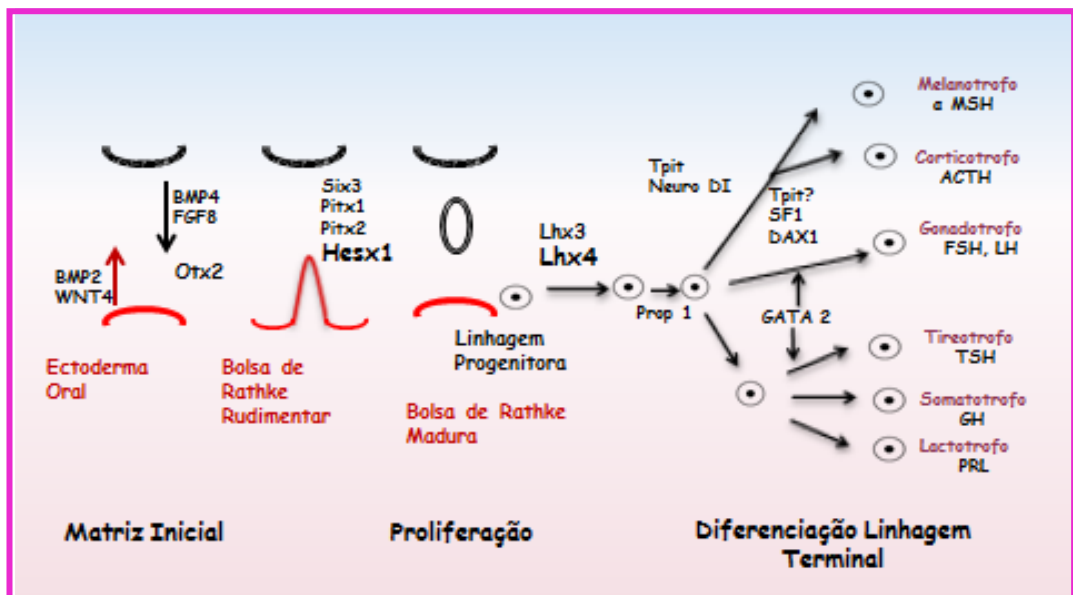
**Figura 3:** Estágios do desenvolvimento hipofisário em roedores. Fonte: Adaptado de < [http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/histo\\_pit.html](http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/histo_pit.html)>. Acesso em: 13 de setembro de 2010.

## 1.2. Fatores Sinalizadores da Organogênese Hipofisária

A justaposição do ectoderma oral, precursor da BR e do ectoderma neural do diencéfalo é mantida em todos os estágios iniciais da organogênese pituitária, sendo fundamental para o desenvolvimento hipofisário normal (Takuma et al., 1998). Uma cascata



de moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição é necessária para a formação do órgão, proliferação e diferenciação celulares (Figura 4). As moléculas sinalizadoras são derivadas do diencéfalo ventral (Bmp4, Fgf8, Fgf4, Nkx2.1, Wn5 $\alpha$ ), do ectoderma oral (Shh), do mesênquima circunjacente (Bmp2, Chordin) e da BR propriamente dita (Bmp2, Wnt4) e atuam na hipófise anterior, ativando ou reprimindo genes codificadores de fatores transcricionais, o que permitirá a proliferação das células pituitárias e a localização adequada das mesmas na glândula madura (Treier & Rosenfeld, 1996; Takuma et al., 1998).



**Figura 4:** Moléculas sinalizadoras e fatores transcricionais envolvidos na embriogênese hipofisária. Fonte: Adaptado de Savage et al., 2003.

A primeira molécula sinalizadora secretada é a proteína óssea morfogenética 4 (Bmp4) seguida do fator de crescimento de fibroblastos 8 (Fgf-8). O Bmp4 e o Fgf-8 são expressos no epitélio do diencéfalo ventral quando o infundíbulo faz contato direto com a BR e são necessários nas etapas iniciais do desenvolvimento hipofisário (Treier & Rosenfeld, 1996; Takuma et al., 1998). A invaginação inicial da BR não ocorre em camundongos nocaute para o gene Bmp-4 e a maioria desses animais morre imediatamente antes do início do desenvolvimento hipofisário. O Fgf-8 se expressa durante todo o desenvolvimento hipofisário, desde o diencéfalo ventral até a formação do infundíbulo. Animais nocaute para o gene Fgf-8 morrem logo após a primeira formação dos tecidos. Além disso, o Fgf-8 ativa dois genes reguladores chaves, o LIM homeobox 3 (Lhx3) e o LIM homeobox 4 (Lhx4), essenciais

para a transformação de bolsa rudimentar em bolsa definitiva e na diferenciação dos tireotrofos e gonadotrofos (Sheng et al., 1997; Sheng & Westphal, 1999; Mullen et al., 2007).

O Bmp2 tem expressão inicial no ectoderma oral e nas regiões adjacentes. Sua expressão diminui gradualmente, sugerindo que desempenha papel importante na perda da dependência do diencéfalo para continuação da formação hipofisária. A expressão do Bmp-2 é necessária para a diferenciação celular dependente do gene Pit-1 (Zhu et al., 2007). As expressões do Fgf-8 e do Bmp-2 parecem ter efeitos antagônicos, determinando a posição dos tipos celulares nas regiões dorsal (corticotrofos) e ventral (tireotrofos e gonadotrofos) da hipófise (Treier & Rosenfeld, 1996).

O *sonic hedgehog signaling* (SHH), inicialmente distribuído no ectoderma oral e que desaparece mais tarde, também contribui para o desenvolvimento hipofisário normal. O gene SHH está associado a defeitos da linha média em alguns pacientes (Belloni et al., 1996; Odent et al., 1999).

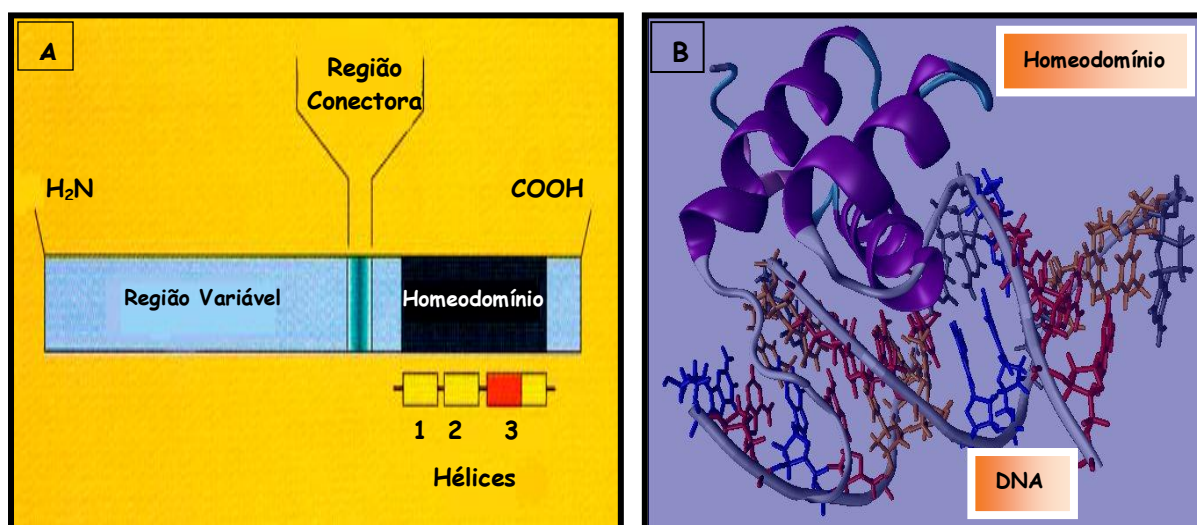
Os genes Wnt4 e Wnt5 são expressos na pituitária em desenvolvimento de camundongos (Treier & Rosenfeld, 1996), mas, em humanos, o ortólogo WNT5A não foi detectado na hipófise.

Embora a organogênese hipofisária humana seja menos conhecida, parece se assemelhar à dos roedores. Em camundongos, mutações, espontâneas ou induzidas, nos genes envolvidos na formação da hipófise, têm levado à compreensão da doença hipofisária humana, permitindo ainda melhor definição da cascata genética responsável pelo desenvolvimento embriológico hipofisário (Dattani & Robinson, 2000; Dasen et al., 2001; Cohen & Radovick, 2002).

### 1.3. Fatores de Transcrição e a Organogênese Hipofisária

O desenvolvimento hipofisário normal depende da ação de genes homeobox, assim chamados por possuírem uma sequência de DNA de cerca de 180 pares de base na sua região codificante. Esses genes são responsáveis pela codificação de proteínas que contêm homeodomínios (HD), ou seja, região constituída de 60 aminoácidos (Scott et al., 1989) (Figura 5). Muitas proteínas que contêm o HD são fatores de transcrição e desempenham importante função na regulação do desenvolvimento e da especificação da linhagem celular (Boncinelli, 1997). Essas proteínas exercem sua ação pela ligação do seu HD a sítios específicos de DNA na região promotora do gene-alvo (Figura 5), regulando assim a transcrição gênica. Além do HD, os fatores de transcrição gênica contêm domínios de

ativação ou repressão transcricional. Mais de 100 homeoproteínas já foram estruturalmente identificadas e são subdivididas em diferentes subfamílias, baseadas na homologia da sequência de aminoácidos (LIM, POU, *paired-like*, etc) (Mullis, 2000). Os fatores de transcrição são expressos em diferentes estágios da organogênese, estando sobrepostos espacial e temporalmente (Sheng et al., 1997; Sheng & Westphal, 1999). Os principais genes até o momento associados à formação pituitária são: *Hesx1*, *Otx2*, *Pitx1* e *Pitx2*, *Sox2* e *Sox3*, *Gli*, *Lhx3* e *Lhx4*, *Isl1*, *Prop1* e *Pit1*.



**Figura 5:** Proteínas homeodomínio. (A) Estrutura de proteína contendo homeodomínios. (B) Homeodomínio ligado a DNA. Fonte: Adaptado de DE Robertis et al., 1990.

### 1.3.1. Fatores de Transcrição Implicados no Desenvolvimento Hipofisário Precoce

#### a) *Hesx1*

O *HESX1* (*homeobox embryonic stem cell*), também denominado *RPX* (*rathke pouch homeobox*), pertence à classe *paired-like homeobox* e está localizado no cromossomo 3p21.1-21.2 (Watkins-Chow & Camper, 1998). O *HESX1*, gene repressor transcricional, é um dos primeiros marcadores do primórdio hipofisário, sugerindo seu papel na formação e diferenciação glandular precoce (Hermesz et al., 1996). Sua expressão é também essencial para o desenvolvimento do nervo ótico (Bona et al., 2004). Durante a embriogênese murina sua expressão inicia-se com a gastrulação e começa a desaparecer no DE 12, tornando-se indetectável no DE 13,5 (Alatzoglou & Dattani, 2009). O desaparecimento do *Hesx1* é requerido para a expressão de outros genes como o *Prop1*, responsável pela diferenciação celular hipofisária. O camundongo transgênico nocaute para esse gene evidenciou fenótipo semelhante à síndrome da displasia do septo ótico (DSO), ou síndrome De Morsier, no

homem, caracterizada pela presença de dois dos seguintes critérios: hipoplasia do nervo ótico, malformações de estruturas cerebrais de linha média (como ausência do septo pelúcido, agenesia de corpo caloso, etc.) e hipoplasia hipofisária, associados ao hipopituitarismo congênito. Poucos pacientes com DSO apresentam mutações em homozigose ou em heterozigose no gene HESX1 (Dattani et al., 1998; Dattani et al., 2000; Thomas et al., 2001; McNay et al., 2007). O quadro clínico e radiológico é bastante heterogêneo comparando as diferentes mutações no HESX1, e também entre portadores da mesma mutação. Em comum, todos os pacientes portadores de mutação no gene HESX1 apresentam DGH (deficiência de GH), isolada ou associada à deficiência de outros hormônios hipofisários. Alguns dos pacientes com mutação no HESX1 também apresentaram a NH ectópica, localizada na eminência média ou na haste hipofisária (Dattani et al., 1998; Thomas et al., 2001; Carvalho et al., 2003; Cohen et al., 2003; Tajima et al., 2003; Coxa et al., 2007; McNay et al., 2007; Corneli et al., 2008).

#### b) Otx2

O fator de transcrição OTX2 (*orthodenticle homeobox 2*) pertence à classe *paired-like homeobox*, subclasse bicoide e está localizado no cromossomo 14q22.3. O OTX2 é expresso em várias espécies, sendo requerido para a formação de estruturas anteriores e manutenção do cérebro anterior ou prosencéfalo (Simeone et al., 1993). No camundongo, o Otx2 se expressa precocemente e, na sua ausência, há comprometimento da gastrulação, o que provoca a falta de estruturas correspondentes à futura cabeça nos animais mutantes (Acampora et al., 1995). Mais tarde, o Otx2 também é requerido para manutenção do cérebro anterior (Kurokawa, 2004). Sua função no desenvolvimento hipofisário não está bem definida, mas acredita-se que seja importante na formação da BR, precedendo e sendo especialmente necessário para a expressão do Hesx1 (Rhinn et al., 1999). Mutações no gene do OTX2 têm sido associadas a síndromes de anoftalmia/microftalmia em humanos, associadas a pan-hipopituitarismo ou deficiência isolada de GH (DGHI). Radiologicamente, a AH varia de normal a hipoplásica e NH ectópica já foi descrita em alguns casos (Dateki et al., 2008; Diaczok et al., 2008; Tajima et al., 2009; Dateki et al., 2010; Ashkenazi-Hoffnung et al., 2010).

#### c) Pitx1/Pitx2

O PITX1 (*paired-like homeodomain transcription factor 1*) ou POTX (*pituitary otx-related factor*) pertence à classe *paired-like homeobox*, subclasse bicoide e está localizado no cromossomo 5q31. O Pitx1 é capaz de ativar todos os genes hipofisários e participa do

desenvolvimento do cérebro e da face (Kelberman et al., 2009). A expressão do gene é inicialmente detectada no ectoderma oral no DE 8,0 de camundongos, sendo mantida na BR e em todas as células da hipófise anterior em desenvolvimento (Szeto et al., 1996; Lanctôt et al., 1997). Entretanto, na glândula madura, a sua expressão é maior nos tireotrofos e gonadotrofos, e em algumas células produtoras de POMC (Lanctôt et al., 1999). Camundongos com mutações em homozigose no *Pitx1* morrem antes do nascimento ou imediatamente após o mesmo (Szeto et al., 1999).

O PITX2 (*paired-like homeodomain transcription fator 2*) localiza-se no cromossomo 4q25 e exibe muitas características similares ao PITX1, como capacidade de ativar promotores da maioria dos genes hipofisários e padrão de distribuição de sua expressão na glândula em desenvolvimento e madura (Gage & Camper, 1997; Drouin et al., 1998; Trembley et al., 2000). Mutações em homozigose nesse gene estão associadas à letalidade precoce no período embrionário, mas, ao contrário do que ocorre em mutações do *Pitx1*, o desenvolvimento hipofisário é gravemente afetado, o que estaria associado a não manutenção da expressão do *Hesx1* (Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999).

Os padrões de expressão do *Pitx1* e *Pitx2* se sobrepõem no período precoce do desenvolvimento, sugerindo redundância funcional entre os dois genes, embora o *Pitx2* tenha papel mais proeminente no desenvolvimento hipofisário (Charles et al., 2005). Essa hipótese é corroborada pelo fato de que animais mutantes para ambos os genes apresentam fenótipo mais grave, nos quais não se observa a expressão do *Lhx3*.

O PITX3, terceiro membro da família, não teve ainda seu papel estabelecido da embriogênese hipofisária (Kelberman et al., 2009).

#### d) *Sox2* e *Sox3*

O SOX2 e SOX3 são membros da família de fatores de transcrição SOX (*SRY-related high mobility group* (HMG) - grupo de alta mobilidade relacionada ao SRY), que foram inicialmente identificados baseados na homologia do motivo de ligação conservado na classe HMG, presente no gene SRY, determinante do sexo em mamíferos (Stevanovic et al., 1993). Os genes SOX são agrupados em diferentes subfamílias em função da variação na região HMG, sendo que o SOX2 e SOX3, juntamente com o SOX1, fazem parte da subfamília SOXB1 (Stevanovic et al., 1993). Membros da subfamília SOXB1 são expressos durante todo período de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e acredita-se que desempenhem importante papel na determinação neuronal (Pevny & Placzec, 2005).

Expressão elevada também foi observada no diencéfalo ventral, incluindo infundíbulo e hipotálamo (Rizzoti et al., 2004).

O SOX2 localiza-se no cromossomo 3q26.3-q27. Mutações *de novo* no SOX2 têm sido descritas em pacientes com anoftalmia bilateral ou microftalmia grave, associada a retardo neuropsicomotor, dificuldade no aprendizado, atresia esofagiana e malformações genitais (Hagstrom et al., 2005; Williamson et al., 2006). Além disso, mutações nesse gene levam a hipoplasia da hipófise anterior e hipogonadismo hipogonadotrófico. Outras manifestações incluem anormalidades no hipocampo, defeitos no corpo caloso e perda auditiva neurossensorial (Kelberman et al., 2006, 2008).

O SOX3, gene de apenas um éxon, localizado no cromossomo X de todos os mamíferos, também está associado ao desenvolvimento hipotálamo-hipofisário. Duplicações no cromossomo Xq.27.1 ou expansão de sete alaninas nesse gene levam ao hipopituitarismo (Solomon et al., 2004; Woods et al., 2005). Pacientes do sexo masculino apresentam DGHI ou DGH associada a outras deficiências hormonais hipofisárias. Alterações anatômicas da região hipotálamo-hipofisária incluem hipoplasia infundibular, NH ectópica e alterações do corpo caloso, com ou sem retardo mental (Laumonnier et al., 2002; Solomon et al., 2002; Woods et al., 2005).

#### e) Gli2

O GLI2 (*GLI family zinc finger 2*) localiza-se no cromossomo 2q14 e codifica a proteína responsável pela mediação do sinal do SHH. Recentemente, a via de sinalização do SHH foi relacionada a desordens mais complexas do desenvolvimento hipofisário (Roessler et al., 1997). Mutações do GLI2 foram identificadas em pacientes com holoprosencefalia. O fenótipo não foi constante, mas todos os pacientes apresentavam função hipofisária anormal, associada a anormalidades craniofaciais variáveis (Roessler et al., 2003).

#### f) Lhx3

O gene LHX3 (*LIM homeobox 3*, ou Lim3, P-lim), localizado no cromossomo 9q34.3 (Sloop et al., 1999; Sloop et al., 2000), pertence aos fatores de transcrição da classe homeodomínio LIM envolvidos na organogênese de diversos órgãos, principalmente tecidos neurais. A expressão do Lhx3 é detectada durante o desenvolvimento do sistema nervoso e da BR e persiste na hipófise adulta, sendo fundamental nas fases iniciais do desenvolvimento estrutural da glândula e para a diferenciação e a proliferação de gonadotrofos, tireotrofos, somatotrofos e lactotrofos (Alatzoglou & Dattani, 2009). Em camundongos nocaute para esse



gene há formação da BR inicial, mas a mesma não apresenta crescimento, o que resulta na ausência dos lobos hipofisários anterior e intermediário, com conseqüente depleção de todos os tipos celulares da hipófise anterior. A NH não é afetada (Alatzoglou & Dattani, 2009).

Mutações homozigotas no LHX3 são causas raras de hipopituitarismo e costumam levar às deficiências de GH, prolactina, TSH e FSH/LH e ACTH, sendo esta última descrita mais recentemente (Rajab et al., 2008). A maioria dos pacientes tem deficiências hormonais graves, que se manifestam ao nascimento, embora formas mais leves tenham sido descritas. Rigidez da coluna cervical, com ombros elevados, limitando a rotação da cabeça a 75-80° pode estar presente (Netchine et al., 2000; Pfaeffle et al., 2007), assim como perda auditiva neurossensorial (Rajab et al., 2008). A AH varia de hipoplásica a aumentada, com lesão sugestiva de microadenoma (Bhangoo et al., 2006).

#### g) Lhx4

O LHX4 (*LIM homeobox 4* ou Gsh4) também pertence aos fatores de transcrição da classe homeodomínio LIM. O gene LHX4 humano está localizado no cromossomo 1q25 (Machinis et al., 2001) e é constituído por seis éxons. O Lhx4 relaciona-se com o Lhx3 e sua expressão, que ocorre em áreas específicas do cérebro em desenvolvimento e na medula espinhal (Zhu et al., 2007), é inicialmente detectada durante a invaginação da BR, restringindo-se mais tarde ao futuro lobo anterior hipofisário e diminuindo no DE 15,5. Em camundongos nocaute para esse gene há formação da BR, mas o número de células está reduzido, levando à hipoplasia hipofisária. Entretanto, ao contrário do encontrado nos camundongos nocaute do Lhx3, todos os tipos celulares estão presentes na AH (Sheng et al., 1997; Raetzman et al., 2002).

Mutações em heterozigose no LHX4 foram raramente identificadas em humanos, resultando em graus variáveis de hipopituitarismo, com deficiência de GH, TSH, ACTH e gonadotrofinas. O hipopituitarismo se associa à sela túrcica hipoplásica, com ou sem NH ectópica, anormalidades cerebelares e malformação de Chiari (Machinis et al., 2001; Machinis & Amselem, 2005; Tajima et al., 2007; Pfaeffle et al., 2008; Dateki et al., 2010; Tajima et al., 2010). O fenótipo resultante sugere que o LHX4 coordena o desenvolvimento cerebral e a forma do crânio. Mutações no LHX4 levariam à DGH e baixa estatura pelo comprometimento da regulação do POU1F1 (*POU domain class 1, transcription factor 1*) e da ativação da expressão do gene do GH. Mas, outros mecanismos devem estar também envolvidos, já que a deficiência de ACTH não pode ser explicada pelos mecanismos suprarreferidos.

#### h) Isl1

O ISL1 (*ISL LIM homeobox 1*), localizado no cromossomo 5q11.1, é o primeiro membro da família de homeodomínio LIM a se expressar durante a formação hipofisária, sendo detectado inicialmente no DE 8,5 do camundongo em todo o ectoderma oral, restringindo-se à BR no DE 9,5 e na posição ventral da mesma em torno do DE 11,5 (Kelberman et al., 2009). O Isl1 parece necessário à proliferação e/ou manutenção da célula progenitora hipofisária, uma vez que mutações em homozigose nesse gene estão associadas a bloqueio da formação da BR (Takuma et al., 1998).

### 1.3.2. Fatores de Transcrição Associados à Diferenciação de Células Hipofisárias

#### a) Prop-1

O PROP-1 (*Prophet of Pit-1*) é um fator de transcrição do tipo homeodomínio *paired-like*, expresso apenas durante o desenvolvimento hipofisário (Sornson et al., 1996). O gene PROP-1 humano está localizado no cromossomo 5q35. O PROP-1 funciona como repressor ou ativador transcricional. A designação de *Prophet of Pit-1* indica gene cujo produto normalmente precede e é necessário para a expressão do gene PIT-1. O gene PROP-1 está envolvido na ontogênese, diferenciação e função dos somatotrofos, lactotrofos, tireotrofos, e, provavelmente, dos gonadotrofos. A primeira mutação foi identificada no camundongo Ames, modelo animal de pan-hipopituitarismo (Sornson et al., 1996). O PROP-1 liga-se como dímero aos elementos promotores de outras proteínas *paired-like* incluindo HESX1 e PIT-1. A identificação de mutações no gene PROP-1 em diversos pacientes com pan-hipopituitarismo demonstrou ser este gene o mais frequentemente envolvido no hipopituitarismo até o momento, sendo responsável por cerca de 50% das causas geneticamente determinadas de deficiência hormonal hipofisária combinada (DHHC) (Parks et al., 1999). Pacientes com mutações no gene PROP-1 apresentam grande variabilidade no fenótipo, incluindo o início do aparecimento das deficiências hormonais (Deladoey et al., 1999; Krzisnik et al., 1999), tamanho hipofisário (Duquesnoy et al., 1998; Wu et al., 1998; Krzisnik et al., 1999; Mendonça et al., 1999) e secreção de cortisol (Mendonça et al., 1999; Pernasetti et al., 2000). A maioria dos pacientes com mutações no gene PROP-1 apresenta deficiências hormonais de GH, PRL e TSH, LH e FSH (Wu et al., 1998), mas também pode haver, mais tardiamente, insuficiência adrenal (Mendonça et al., 1999; Pernasetti et al., 2000). No pan-hipopituitarismo por alterações moleculares no gene PROP-1 o parênquima hipofisário costuma estar diminuído à ressonância nuclear magnética de hipófise (RNMH)

(Duquesnoy et al., 1998; Wu et al., 1998; Deladoey et al., 1999; Krzisnik et al., 1999; Pernasetti et al., 2000), porém alguns pacientes podem ter um período de aumento hipofisário seguido de hipoplasia grave (Mendonça et al., 1999).

#### b) Pit-1 ou Pou1f1

O PIT-1, também conhecido por GHF1 (*GH factor 1*) tem sido oficialmente denominado de POU1F1 (*POU class 1 homeobox 1*). O PIT-1 pertence à família POU dos genes homeobox e está localizado no cromossomo 3p11. Sua expressão ocorre tardiamente durante o desenvolvimento pituitário e persiste por toda vida. Além disso, o PIT-1 é requerido para expressão dos genes GH-1, PRL, GHRHR e TSH, sendo fundamental para o desenvolvimento dos somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos na hipófise anterior (Kelberman & Dattani, 2007). Os camundongos Snell e Jackson, modelos animais de pan-hipopituitarismo, apresentam alterações no Pit-1 (Li et al., 1990). Várias mutações no PIT-1 têm sido reconhecidas em casos esporádicos e em famílias afetadas com pan-hipopituitarismo (Ohta et al., 1992; Pfaffle et al., 1992; Radovick et al., 1992; Tatsumi et al., 1992; Cohen et al., 1995; Irie et al., 1995; Pellegrini-Bouiller et al., 1996; Aarskog et al., 1997; Arnhold et al., 1998; Fofanova et al., 1998; Pernasetti et al., 1998; Rodrigues et al., 1998; Ward et al., 1998; Vallette-Kasic et al., 2001). Aproximadamente metade dos pacientes afetados é diagnosticada por baixa estatura, enquanto a outra metade apresenta quadro grave de hipotireoidismo congênito. Todos os pacientes com mutação no PIT-1 apresentam deficiência de GH, PRL e TSH com hipófise de tamanho normal ou reduzido, NH e haste hipofisária normais (Parks et al., 1999).

#### c) Gata2 e Tbx19

O GATA2 (*Gata binding protein 2*) e o TBX19 (*T-box 19*), localizados nos cromossomos 3q21.3 e 1q24.2, respectivamente, são outros fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação das células hipofisárias. O Gata2, induzido pelo Bmp2, expressa-se inicialmente no DE 10,5 na porção ventral da BR e persiste no camundongo adulto (Dasen et al., 1999). Esse gene interage com o Pit-1 e influencia o aparecimento de vários tipos de células hipofisárias. Em camundongos com elevada expressão de Gata2 as células hipofisárias dependentes de Pit-1 são transformadas em gonadotrofos, enquanto que o Pit-1 teria função de suprimir os gonadotrofos dependentes de Gata2 (Dasen et al., 1999).

O Tbx19, antes chamado Tpit, só se expressa na glândula em desenvolvimento, primeiro no DE 12,5 nas células POMC-positivas e posteriormente nos corticotrofos e

melanotrofos, persistindo na glândula madura (Lamolet et al., 2001). Em humanos, mutações no TBX19 são a causa mais comum de deficiência isolada de ACTH no período neonatal (Kelberman et al., 2009).

## **2. Avaliação Radiológica da Região Hipotálamo-Hipofisária**

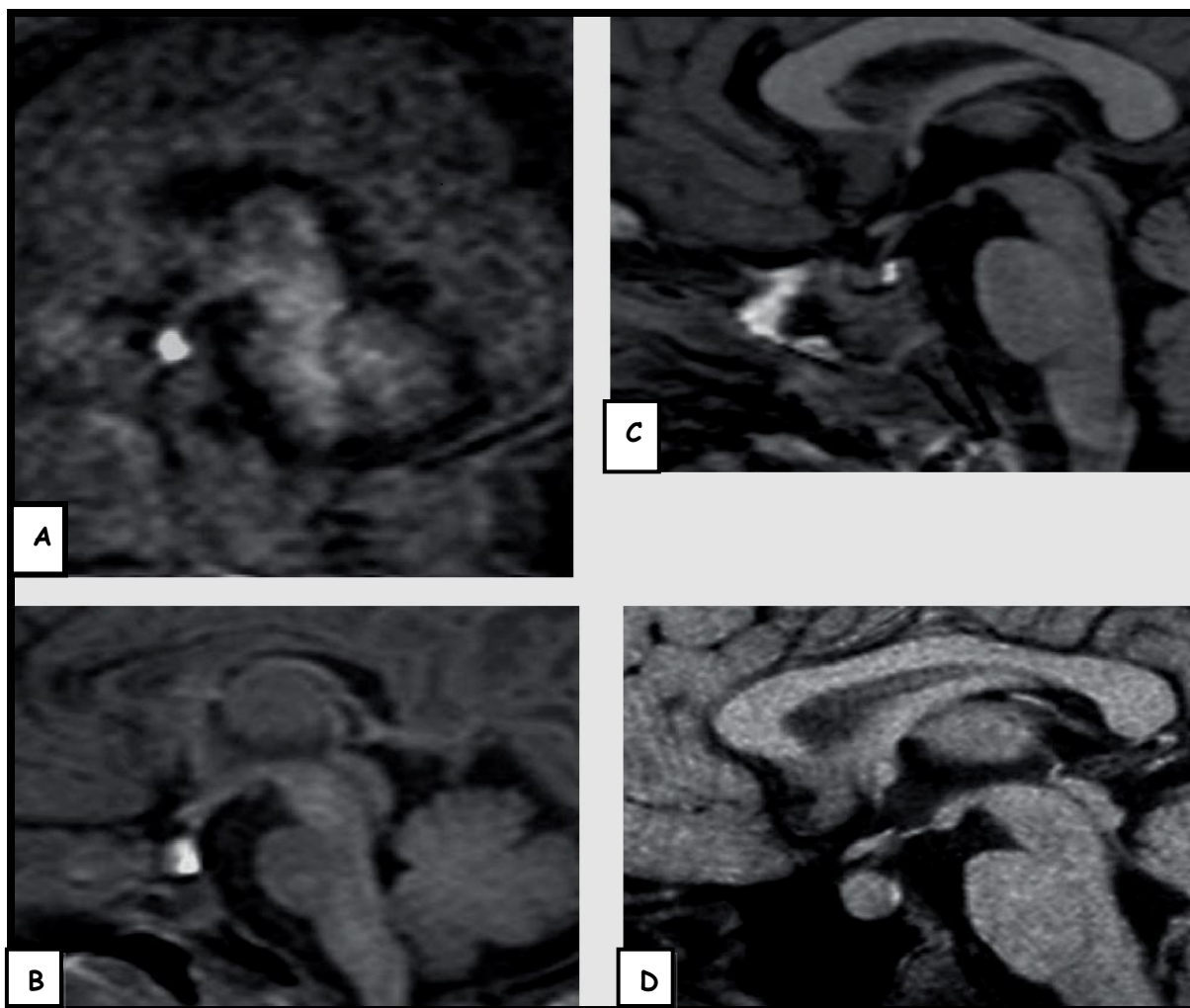
### **2.1. Aspectos Radiológicos da Hipófise Normal**

A RNMH é o método de imagem de escolha para estudo da região hipotálamo-hipofisária em função: a) da sua capacidade de detectar alterações sutis da concentração de água nos tecidos e permitir elevada discriminação entre os mesmos, b) da sua capacidade multiplanar e c) pela não utilização de radiação ionizante (Drummond et al., 2003). Esse exame permite estudo anatômico preciso e detalhado da hipófise, diferenciando os lobos anterior e posterior (Argyropoulou & Kiortsis, 2005). Para avaliação adequada da glândula hipofisária, são realizadas imagens de alta resolução e cortes finos, de espessura menor ou igual a 3 mm, nos cortes coronal e sagital. A injeção de contraste é realizada sistematicamente quando é necessário o estudo detalhado da haste hipofisária (Garel & Léger, 2007).

A hipófise modifica-se em função da idade e do sexo (Figura 6), sendo habitualmente convexa no neonato, padrão que persiste até os dois meses de idade, quando assume morfologia similar à da criança mais velha (Dietrich et al., 1995). Na infância, o crescimento glandular é discreto e em todas as direções, atingindo altura não superior a 6 mm em crianças abaixo de 12 anos e sem diferença entre os sexos. Na puberdade há hipertrofia fisiológica, sendo 10 mm o limite máximo de altura no sexo feminino (com convexidade superior às vezes ultrapassando os limites da sela) e 7 a 8 mm no sexo masculino (Maghnie et al., 2004).

O sinal à RNMH também se modifica ao longo dos anos (Figura 6). No feto e até dois meses de idade, toda hipófise tem sinal hiperintenso em T1, resultando em aspectos muito similares da AH e NH (Dietrich et al., 1995). Após esse período, o lobo anterior apresenta sinal isoíntenso ao da substância branca nas sequências T1 e T2, ao passo que o lobo posterior é hiperintenso na sequência T1 e discretamente hiperintenso em T2. Não se esclareceu, de forma definitiva, qual seria a substância responsável pelo sinal hiperintenso característico do lobo posterior em T1. Sugere-se que o próprio ADH ou vesículas fosfolipídicas ligadas ao mesmo, neurofisinas e combinações desses componentes sejam os responsáveis. Independente da origem do hipersinal da NH, que, entretanto, pode estar ausente em 10% dos indivíduos

normais (Maghnie et al., 2004), a sua visualização é importante marcador da integridade do trato neuro-hipofiseal-hipotalâmico.



**Figura 6:** Hipófise normal nas diversas fases da vida - corte sagital da RNMH. A, no feto; B, no neonato; C, menino em fase pré-puberal; D, hipófise hipertrofiada na puberdade. Fonte: Garel & Léger, 2006.

O infundíbulo ou haste hipofisária estende-se do hipotálamo em direção à margem superior da hipófise, posicionando-se na linha média. Em adultos, a espessura da haste não deve ser superior a 3,5 mm na sua porção próxima à eminência média e inferior a 1,9 mm na sua inserção pituitária. Em crianças, a haste tem diâmetro aproximado de 2 mm, situando-se entre 1 e 3 mm e não deve exceder a artéria basilar (Elster, 1993). A haste hipofisária é constituída de três porções: glandular, vascular e neural. A porção neural é composta dos tratos supra-ótico-hipofisário e paraventricular hipofisário, formadas por fibras não mielinizadas. O componente vascular consiste em artérias nutrientes, sistema venoso portal e capilares e provê o suprimento sanguíneo da hipófise anterior pelas artérias hipofisárias superiores (Maghnie et al., 2004).

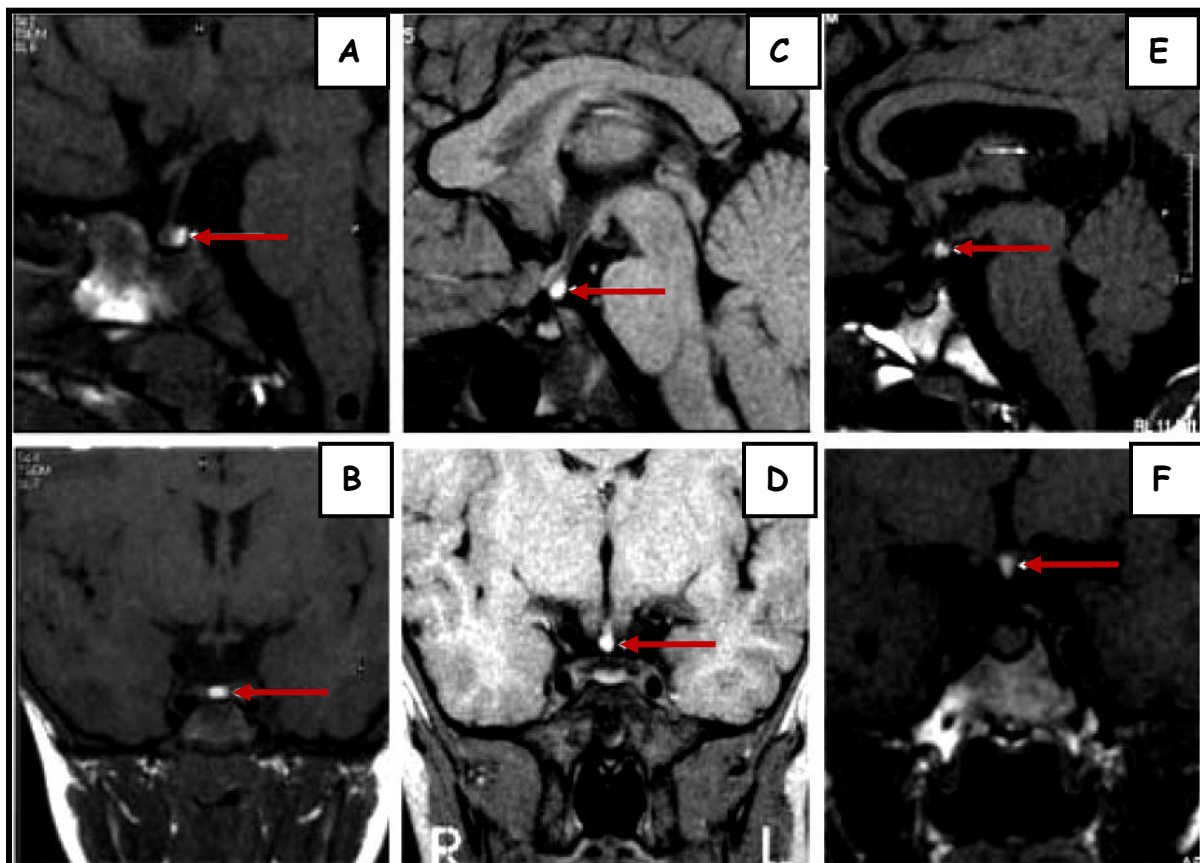
## 2.2. RNMH e DGH

Na avaliação do hipopituitarismo não tumoral, a descrição da região hipotálamo-hipofisária à RNMH é fundamental, uma vez que pode sugerir o tipo e o prognóstico da deficiência hormonal envolvida. A AH, que deve ser analisada em função da idade e do estágio puberal do paciente, pode estar normal, diminuída ou, raramente, aumentada. A haste hipofisária pode estar normal, afilada ou ausente. A NH pode ser descrita como tópica ou ectópica, encontrada, nesse último caso, na eminência média ou na haste hipofisária (Garel & Léger, 2007).

A altura da hipófise parece relacionar-se aos níveis de GH, mas não foi encontrada associação entre o tamanho da glândula e a gravidade da deficiência hormonal (Tillmann et al., 2000). A AH normal é mais frequente nos casos de deficiência de GH isolada (DGHI), mas a AH hipoplásica é descrita tanto nessa forma como na DHHC, não podendo ser considerada, portanto, como sinal específico (Bozzola et al., 2000). Aumento da AH é encontrado em portadores de defeitos moleculares raros, como mutações no PROP-1 e LHX3 (Netchine et al., 2000; Voutetakis et al., 2004; Banghoo et al., 2006). Sela vazia é outra alteração descrita em portadores de DGHI (Cacciari et al., 1994).

Em 1987 foi descrita, na RNMH de paciente com hipopituitarismo, a síndrome de interrupção de haste hipofisária (PSIS- *pituitary stalk interruption syndrome*), caracterizada pela associação de AH hipoplásica, ectopia de NH e agenesia parcial ou completa de haste hipofisária (Fusijawa et al., 1987) (Figura 7). A identificação da referida alteração radiológica contribuiu para o diagnóstico e entendimento de algumas formas de DGH, previamente classificadas como “idiopáticas” (Maghnie et al., 2004). Desde então, são avaliadas as consequências da localização ectópica da NH, inicialmente considerada marcador de DGH permanente, independente de posicionar-se na eminência média ou ao longo da haste. Entretanto, estudos mais recentes sugerem que pacientes com DGH retestados quanto à secreção residual de GH após o fim do tratamento, podem recuperar a função somatotrófica quando a NH encontra-se ao longo da haste hipofisária, enquanto que quando a haste não é visível, a DGH é definitiva (Ulmann et al., 1993; Maghnie et al., 1996; Genovese et al., 1997; Léger et al., 2005). A associação de NH ectópica e haste ausente é mais comum nos casos de DHHC (Maghnie et al., 2004).





**Figura 7:** Hipófise normal e síndrome de interrupção de haste hipofisária (PSIS). RNMH (Imagens em T1). A, corte sagital; B, corte coronal; morfologia normal da AH e haste íntegra. Sinal hiperintenso da NH em posição normal; C, corte sagital; D, corte coronal; AH normal e haste interrompida. NH ectópica é visualizada ao longo da haste (a nível proximal da haste); E, corte sagital; F, corte coronal; AH hipoplásica e haste hipofisária não visualizada após infusão de gadolínio. O sinal hiperintenso da NH é visto ectopicamente na eminência média. Fonte: Léger et al, 2005.

Várias são as teorias para explicar a ectopia do lobo posterior hipofisário e a hipoplasia da AH. Segundo a teoria traumática, a interrupção da haste seria provocada por partos pélvicos, situação que levaria a lesões hipóxicas da região hipotálamo-hipofisária (Kikuchi et al., 1988; Pinto et al., 1997). A teoria malformativa, mais aceita atualmente, sugere que defeito na embriogênese seria responsável por essas alterações. Corroboram essa suspeita o achado de outras malformações do SNC associadas às alterações hipofisárias e a descrição de casos familiares de DGH e NH ectópica (Maghnie et al., 1991; Argyropoulou et al., 1992; Pinto et al., 1997; Hamilton et al., 1998; Chen et al., 1999).

Algumas malformações da linha média têm sido associadas à ectopia da hipófise posterior, incluindo malformação de Chiari 1, atrofia ou hipoplasia do nervo ótico, agenesia do corpo caloso, agenesia do septo pelúcido, persistência do canal crânio-faríngeo, síndrome de Kallmann, microcefalia, atrofia cerebelar, desvio lateral das artérias carótidas e displasia vermiana (Hamilton et al., 1998; Mitchell et al., 2002; Simon et al., 2006). A identificação

desses achados é fundamental, uma vez que na DGH associada a malformações de linha média do SNC e NH ectópica o ganho estatural sob tratamento com GH é maior do que naqueles com AH normal ou apresentando hipoplasia isolada (Coutant et al., 2001; Zenaty et al., 2003). Esses achados sugerem variabilidade fenotípica dos pacientes com DGH.

### **3. Alterações Genéticas no Hipopituitarismo**

Mutações em genes associados a comprometimento da função hipofisária têm sido investigados em pacientes com vários fenótipos de hipopituitarismo e podem ser categorizadas em três grupos: a) mutações em genes envolvidos no desenvolvimento precoce do cérebro anterior e hipófise, que tendem a resultar em formas sindrômicas de hipopituitarismo em associação com alterações extra-pituitárias em outros tecidos onde se expressam, mais frequentemente, olhos, nervo ótico ou estruturas da linha média do cérebro anterior; b) mutações em genes envolvidos nos estágios iniciais da diferenciação celular, que levariam à DHHC e c) mutações em genes codificando subunidades específicas ou requeridas para um tipo celular específico, levando a deficiências hormonais isoladas (Kelberman et al., 2009).

Estudos moleculares de pacientes com de NH ectópica têm evidenciado mutações nos genes HESX1, LHX4, OTX2 e SOX3. Por outro lado, mutações nos genes PIT-1, PROP-1 ou LHX3 não foram descritas nesses pacientes. Embora a frequência dessas mutações seja baixa, a sua identificação pode ser útil no esclarecimento de alguns casos.

Woods et al. (2005) descreveram hipopituitarismo ligado ao cromossomo X em pacientes com duplicações do SOX3 ou expansões de repetições de polialanina nesse gene. Os pacientes do sexo masculino afetados com essas mutações tipo perda de função exibiam NH ectópica, associada a graus variáveis de hipopituitarismo, com haste hipofisária afilada ou ausente.

As mutações nos genes HESX1, LHX4 e OTX2 já identificadas em pacientes com NH ectópica são descritas nos Quadros 1 a 3.

<b>Mutação DNA (Proteína) (Referência)</b>	<b>Herança</b>	<b>Efeito Funcional</b>	<b>Deficiências Hormonais</b>	<b>Achados Radiológicos</b>
<b>G18C (p.Q6H)</b> (Thomas et al., 2001; Corneli et al., 2008)	Dominante	↓ da ligação ao DNA	GH, TSH, GnRH. ACTH (evolutiva)	AHH
<b>C509T (p.S170L)</b> (Thomas et al., 2001)	Dominante	↓ da ligação ao DNA	GH	NO hipoplásico, ACC parcial
<b>A541G (T181A)</b> (Thomas et al., 2001)	Dominante	↓ da ligação ao DNA	GH	NH ausente
<b>T77C (p.126T)</b> (Carvalho et al., 2003)	Recessiva	Perda parcial da função repressora	GH, GnRH TSH/ACTH (evolutivas)	AHH, HHA
<b>C478T (p.R160C)</b> (Dattani et al., 1998; Brickman et al., 2001)	Recessiva	Perda da capacidade de ligação ao DNA	Pan-hipopituitarismo	AHH, NO hipoplásico, ACC, SP ausente
<b>g.1624delG</b> (Cohen et al., 2003)	Dominante	↑ da ligação ao DNA- bloqueio da atividade do PROP-1	GH	AHH, NO hipoplásico e NH ausente
<b>306-307insAG</b> (Tajima et al., 2003)	Dominante	Perda de capacidade de ligação ao DNA	GH, GnRH, TSH ACTH (provável)	AHH, NO hipoplásico à esquerda
<b>E149K</b> (McNay et al., 2007)	Dominante	Perda da função repressora	GH	AHH, HHH

**Quadro 1:** Mutações do HESX1 em pacientes com NH ectópica ou ausente. AHH, AH hipoplásica; NO, nervo-ótico; ACC, agenesia do corpo caloso; NH, neuro-hipófise; HHA, haste hipofisária ausente; HHH, haste hipofisária hipoplásica; SP, septo pelúcido.

<b>Mutação DNA (Proteína) (Referência)</b>	<b>Herança</b>	<b>Efeito Funcional</b>	<b>Deficiências Hormonais</b>	<b>Achados Radiológicos</b>
<b>c.607-1G&gt;C</b> <i>(Machinis et al., 2001; Reynaud et al., 2006)</i>	Dominante	Não definido	GH, TSH, ACTH GnRH (variável)	AHH, NH pode ser tópica, ST hipoplásica, haste ausente
<b>C293_294 insC (p.Thr99fs)</b> <i>(Castinetti et al., 2008)</i>	Dominante	Perda de capacidade de ligação ao DNA e da capacidade transcricional	GH, TSH GnRH (variável)	NH pode ser tópica
<b>(p.P366T)</b> <i>(Tajima et al., 2007)</i>	Dominante	Não definido	Pan-hipopituitarismo	AHH, ST hipoplásica, Malformação de Chiari
<b>(p.R84C)</b> <i>(Pfaeffle et al., 2008)</i>	Dominante	Comprometimento capacidade transcricional	GH, TSH GnRH (evolutiva)	AHH
<b>(p.L190R)</b> <i>(Pfaeffle et al., 2008)</i>	Dominante	Perda de capacidade de ligação ao DNA e da capacidade transcricional	GH, TSH, ACTH	AHH
<b>Microdeleção (Dateki et al., 2010)</b>	Dominante	-	GH, TSH, GnRH	AHH, ST hipoplásica
<b>V101A (Tajima et al., 2010)</b>	Dominante	Perda da capacidade transcricional	Pan-hipopituitarismo	AHH

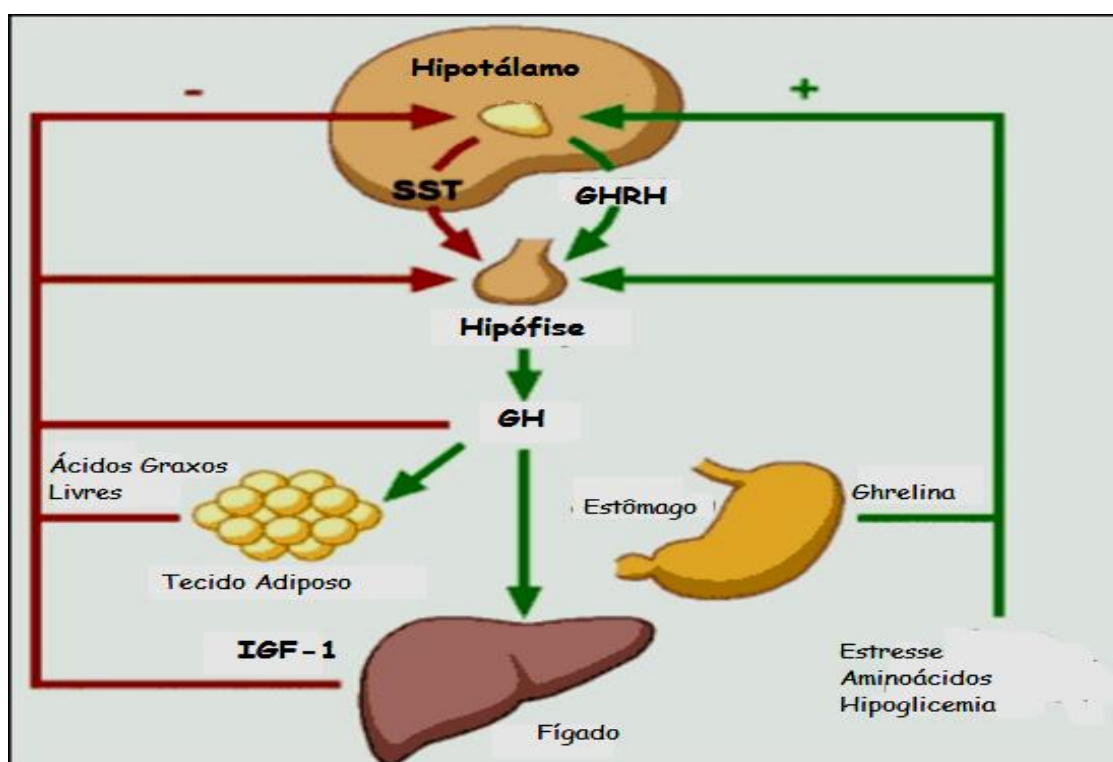
**Quadro 2:** Mutações do LHX4 em pacientes com NH ectópica. AHH, AH hipoplásica; ST, sela-túrcica; NH, neuro-hipófise.

<b>Mutação DNA (Proteína) (Referência)</b>	<b>Herança</b>	<b>Efeito Funcional</b>	<b>Deficiências Hormonais</b>	<b>Achados Radiológicos</b>
<b>c.674 A&gt;G (p.N33S) (Diaczoc et al., 2008)</b>	Recessiva	↓ da atividade de transativação	Pan-hipopituitarismo	AHH, NH pode ser normal
<b>c.576-577insCT (p.S136fsX178) (Tajima et al., 2009)</b>	Recessiva	↓ ou ausência da transativação do POU1F1 e HESX1, respectivamente (?)*	Pan-hipopituitarismo	AHH, HHA, anoftalmia bilateral, Malformação de Chiari 1
<b>c.270 A&gt;T (p.R90S) (Ashkenazi-Hoffnung et al., 2010)</b>	Dominante	↓ da ligação ao DNA e da transativação	DGHI	AHH, HH interrompida, anoftalmia unilateral
<b>c.221_236del (K74fsX103) (Dateki et al., 2010)</b>	Dominante	Ausência da atividade de transativação	GH	AHH
<b>(p.G188X) (Dateki et al., 2010)</b>	Dominante	↓ da atividade de transativação	Pan-hipopituitarismo ou função hipofisária normal	AHH, anoftalmia D, microftalmia E

**Quadro 3:** Mutações do OTX2 em pacientes com NH ectópica. DGHI, deficiência de GH isolada; AHH, AH hipoplásica; NH, neuro-hipófise; HH, haste hipofisária; HHA, haste hipofisária ausente.\* Estudos funcionais não realizados.

#### 4. O Eixo Hipotálamo-Hipófise-GH e o Crescimento Normal

O GH, codificado pelo gene GH-1, é um polipeptídeo constituído de 191 aminoácidos, secretado pela AH de forma pulsátil nas 24 horas, com a maioria dos picos ocorrendo à noite (Rose et al., 1991; Tannenbaum, 1991). Dois peptídios hipotalâmicos, que atuam antagonicamente, regulam a síntese e secreção do GH (Figura 8): o hormônio liberador do GH (GHRH), estimulador, e a somatostatina (SST), com efeito inibitório. Os pulsos de GH resultam da diminuição do tônus do SST *versus* a secreção contínua do GHRH (Tannenbaum, 1991). O controle da liberação do GH também é mediado pelo próprio GH e pelo *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), que interagem no hipotálamo (*feedback* negativo de alça longa) e, apenas pelo IGF-1 na hipófise (*feedback* negativo de alça curta). Além disso, a ghrelina secretada pelo estômago no jejum modula os picos de GH (Koutkia et al., 2004).



**Figura 8:** Eixo hipotálamo-hipofisário.

Adaptado de < <http://www.endotext.org/neuroendo/neuroendo5c/neuroendoframe5c.htm>>. Acesso em 10 de junho de 2010.

O GH hipofisário acopla-se a receptores no fígado e outros tecidos-alvos, estimulando a síntese de IGF-1 e *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP-3). O IGF-1, responsável por muitas das ações do GH, circula ligado a várias proteínas, sendo a IGFBP-3 a

mais importante. A ação promotora do crescimento exercida pelo IGF-1 se dá de duas formas: endócrina, através da sua fração livre circulante e autócrina/parácrina, pelo IGF-1 sintetizado na placa de crescimento (Rose, 2007). Os níveis de IGF-1 estão diminuídos durante os cinco primeiros anos de vida, aumentam na infância e alcançam valores mais elevados no início da maturação sexual (Cara et al., 1987; Veldhuis, 1998). O GH tem várias ações metabólicas independentes do IGF-1, como aumento da lipólise e do transporte de aminoácidos no músculo e síntese hepática de proteínas (Goldman, 2004).

A estatura de um indivíduo resulta da interação da sua composição genética e de fatores ambientais, tais como seu *status* nutricional e hormonal. Os componentes fetal e pós-natal do crescimento afetam a estatura final. O crescimento fetal independe do GH, sendo mediado pela nutrição materna e fatores de crescimento maternos e fetais como IGFs (IGF-1 e IGF-2), *fibroblast growth factors* (FGF), *epidermal growth factors* (EGF), *transforming growth factors* (TGF)  $\alpha$  e  $\beta$  e insulina. O GH tem apenas papel menor nas últimas semanas da vida intrauterina (Dattani & Preece, 2004).

O padrão de crescimento pós-natal difere em função da idade, sendo identificadas três fases de desenvolvimento: infantil, pré-puberal e puberal. Na infantil, embora o eixo GH-IGF-1 comece a ter importância a partir do primeiro ano de vida, o crescimento rápido que ocorre até os dois anos depende, sobretudo, da nutrição. Ao final do segundo ano, estabelece-se o padrão de desenvolvimento de cada criança. Entre dois e cinco anos de idade, a criança cresce aproximadamente 7 cm/ano e entre 6 e 12 anos, a velocidade de crescimento situa-se em torno de 5 a 5,5 cm/ano, com pequena diferença entre os sexos. Nessa fase, o crescimento é dependente principalmente de fatores endócrinos, como GH e tiroxina (T4). Na puberdade, há o estirão puberal, que ocorre entre 12 e 16 anos de idade na menina e mais tardiamente em meninos. Nessa fase, além do GH e dos hormônios tireoidianos, contribuem para o crescimento os esteroides sexuais (Dattani & Preece, 2004).

## **5. Baixa Estatura e Deficiência de GH**

### **5.1. Definição e Causas de Baixa Estatura**

Define-se como baixa estatura aquela inferior a -2 DP (desvios-padrão) para a idade, comparada com curvas padrão, sexo-específicas, obtidas de população saudável. A maioria das crianças com baixa estatura não apresenta causa hormonal ou genética (Lindsay et al., 1994). Catorze por cento das crianças com estatura inferior a -2 DP têm causa biológica,

enquanto que esse percentual aumenta para 58%, quando valores inferiores a -3,0 DP são definidos como anormais (Voss et al., 1992; Voss, 2000). A herança genética também deve ser considerada na avaliação da estatura, levando à necessidade de investigar todas as crianças com estatura 1,4 DP abaixo da estatura-alvo familiar (Dattani & Preece, 2004). Dentre as causas de baixa estatura (Quadro 4), a principal é familiar, sendo o diagnóstico realizado com base no DP da estatura, que se situa dentro da faixa de estatura-alvo familiar (Dattani & Preece, 2004). Entretanto, causas orgânicas devem ser afastadas, a partir da realização de avaliação clínica e exames complementares.

<b>Não Patológicas</b>
Retardo constitucional de crescimento e puberdade
Baixa estatura familiar
Nutricional
<b>Retardo de Crescimento Intrauterino</b>
<b>Doenças Crônicas</b>
<b>Doenças Endócrinas</b>
Causas relacionadas ao GH: DGH, resistência ao GH, resistência ao IGF-1
Hipotireoidismo
Excesso de glicocorticoide: síndrome de Cushing, hiperplasia congênita de adrenal mal controlada
<b>Doenças Genéticas: síndrome de Turner, síndrome de Noonan, síndrome de Down, síndrome de Seckel, síndrome de Prader-Willi, displasias ósseas (hipocondroplasias, acondroplasias, displasia espôndilo-epifiseal), Progéria, mucopolissacaridoses, síndrome de Rothmund-Thompson</b>

**Quadro 4:** Causas de baixa estatura. Fonte: Adaptado de Dattani & Preece, 2004.

## 5.2. Deficiência de GH

### 5.2.1. Epidemiologia e Causas

A incidência da DGH é variável, situando-se entre 1/4.000 e 1/10.000 nascidos vivos (Lindsay et al., 1994). Esses valores são, provavelmente, superestimados considerando-se a reversibilidade da doença entre 25-75% dos pacientes (Maghnie et al., 1999; Loche et al., 2002; Donabauer et al., 2003; Arrigo et al., 2006). Uma das causas de variação na frequência de DGH são os diversos testes de secreção utilizados no diagnóstico e os critérios empregados em diferentes centros (Juul et al., 2002).

A DGH engloba um espectro de alterações de patogênese e características patológicas distintas. Pode ser congênita ou adquirida e ocorrer isoladamente (DGHI) ou associar-se à

deficiência de outro hormônio da hipófise anterior (DHHC). As causas congênitas compreendem três grupos (Kelberman et al., 2009): a) anomalias da síntese e secreção do GH, b) anomalias do desenvolvimento hipotálamo-hipofisário e c) resistência ao GH (pode também ser adquirida).

As anomalias da síntese e secreção do GH podem decorrer de mutações no gene GH ou no gene do receptor de GHRH, situações que levam à DGHI e não se associam a alterações morfológicas da região hipotálamo-hipofisária. Há quatro formas de DGHI transmitidas geneticamente: a) deficiência de GH do tipo IA (DGH IA) - forma grave de DGH, autossômica recessiva, que resulta de mutação ou deleção no gene que codifica o GH (GH-1); b) deficiência de GH do tipo IB (DGH IB) - forma mais frequente de DGHI familiar, é secundária a deleções ou mutações parciais no gene GH-1 e resulta em deficiência de GH parcial a grave; c) deficiência de GH do tipo II (DGH II) - forma autossômica dominante de DGHI e d) deficiência de GH do tipo III (DGH III) - ligada ao cromossomo X em pacientes com hipogamaglobulinemia, não há alteração no gene GH -1. Além de anomalias no gene GH, mutações no gene do receptor do GHRH podem levar à DGHI.

Como discutido anteriormente, mutações nos genes envolvidos na embriogênese hipofisária, associadas ou não a malformações hipotálamo-hipofisárias, são outras causas de DGH isolada ou associada a outras deficiências hipofisárias (Alatzoglou & Dattani, 2009).

As formas congênitas da resistência ao GH são secundárias a alterações no receptor de GH, causadas por mutações no gene do receptor, como descrito por Laron et al. (1966); anomalias pós-receptor de GH (Freeth et al., 1998) ou alterações na síntese e/ou ação do IGF-1 (Woods et al., 1996). Na resistência ao GH, os níveis de GH estão normais ou aumentados, a produção de IGF-1 está diminuída e os pacientes apresentam fenótipo similar ao daqueles com DGHI.

As causas adquiridas são responsáveis por cerca de 30% dos casos de DGH e incluem traumas cranianos, tumores do SNC, doenças infiltrativas e inflamatórias, histiocitose X e radioterapia craniana. Desnutrição, doenças renais e hepáticas, anticorpos circulantes anti-GH ou antirreceptor de GH são responsáveis por formas adquiridas de resistência ao GH.

### 5.2.2. Apresentação Clínica

A apresentação clínica de pacientes com hipopituitarismo é bastante variável em função das deficiências hormonais presentes e do momento de instalação das mesmas. Neonatos com hipopituitarismo congênito podem apresentar sintomas inespecíficos,



associados ou não a malformações oculares, de linha média ou genitais (Quadro 5) (Alatzoglou & Dattani, 2009). Outras vezes, neonatos inicialmente assintomáticos, desenvolvem sinais e sintomas de hipopituitarismo ao longo do tempo (Arrigo et al., 2006; Ahmad et al., 2008; Mehta et al.; 2009). Embora complicações pós-natais como hipoglicemia, letargia, hiponatremia sem hipercalemia, apneia, convulsões, colestase neonatal e icterícia prolongada, sepse recorrente, ocorram em até 52% dos pacientes com hipopituitarismo congênito, o diagnóstico só é feito no período neonatal em 23% dos casos (Mehta et al., 2005).

<b>Alterações Genitais: micropênis, criptorquidismo</b>
<b>Defeitos da linha média/anormalidades craniofaciais: lábio leporino, agenesia do corpo caloso, agenesia do septo pelúcido, holoprosencefalia</b>
<b>Defeitos oculares: anoftalmia/microftalmia bilateral, hipoplasia do nervo ótico, nistagmo</b>
<b>Malformações múltiplas caracterizando síndromes</b> <b>AEG (anoftalmia, atresia esofagiana, anormalidades genitais), PHACE(S): (malformações da fossa posterior - cisto de Dandy Walker, hemangiomas faciais e cervicais, malformações arteriais, defeitos cardíacos, anormalidades oculares, defeitos no esterno), síndrome de Riger, síndrome de Johanson-Blizzard, síndrome de Pallister Hall</b>

**Quadro 5:** Alterações clínicas associadas ao hipopituitarismo. Adaptado de: Alatzoglou & Dattani, 2009.

Na DGHI a principal apresentação é baixa estatura associada à diminuição da velocidade de crescimento para a idade (Pinto et al., 1999). Pacientes podem apresentar aparência infantil, caracterizada por fâcies típica: face arredondada, com protrusão do osso frontal e nariz em sela, decorrentes do pequeno desenvolvimento da ponte nasal. O fechamento das suturas cranianas é tardio. Em função da hipoplasia da laringe, voz fina, aguda e infantil é descrita em alguns casos. Maturação óssea e dentição atrasadas, diminuição da massa muscular e aumento da gordura subcutânea, cabelo fino e ralo e crescimento lento dos fâneros são outras manifestações de DGH. Anormalidades associadas incluem defeito da linha média da face, dente incisivo único ou hipoplasia do nervo ótico. Crianças com DGH grave não tratada alcançarão apenas 70% do seu potencial estatural, o que resultará em déficit de cerca de 38 e 33 cm nos meninos e meninas, respectivamente (Dattani & Preece, 2004).

Pacientes com DHHC, além da baixa estatura, poderão apresentar quadro clínico compatível com as demais deficiências hormonais da hipófise anterior, como sinais e

sintomas de hipotireoidismo, hipocortisolismo, hipogonadismo. Comprometimento da hipófise posterior, levando ao diabetes insipidus, é menos comum.

O quadro clínico de pacientes com NH ectópica e malformações do SNC é bastante variável. Parto pélvico e complicações neonatais são descritos em número elevado de pacientes. Baixa estatura ocorre precocemente ou a desaceleração estatural instala-se progressivamente. A DGH pode ser isolada ou se associar a outras deficiências hormonais, sendo essa última situação mais comum quando a haste hipofisária não é visualizada. Além disso, as deficiências hormonais podem se desenvolver ao longo do tempo, motivo pelo qual o acompanhamento dos pacientes deve ser contínuo.

### 5.2.3. Diagnóstico

O diagnóstico de DGH é estabelecido com base em critérios antropométricos (baixa estatura e desaceleração da velocidade de crescimento), associados a não resposta do GH a testes de estímulo farmacológicos (Rosenfeld et al., 1995; Rosenfeld, 1997). Habitualmente, são requeridos dois testes de estímulo para a confirmação diagnóstica, exceto nos indivíduos com lesões do SNC, DHHC, história de irradiação craniana ou doença genética sindrômica, onde apenas um teste se faz necessário.

Os testes de estímulo farmacológicos mais utilizados baseiam-se nas suas ações fisiológicas: GHRH e estimulador do GHRH (clonidina) e inibidores da somatostatina (arginina, insulina, glucagon, L-dopa). Embora o pico de GH diminuído após testes de estímulo seja o principal exame para o diagnóstico de DGH, esse critério ainda é muito controverso, uma vez que os valores de corte normais ainda não estão bem estabelecidos e há grande variedade de estímulos utilizados e de ensaios monoclonais para mensuração do GH (Rosenfeld et al., 1995; Rosenfeld, 1997). A definição de resposta normal do GH após estímulo é arbitrária. Nos primeiros relatos, pico de GH  $\geq 5$  ng/ml era considerado normal (Raiti et al., 1967; Kaplan et al., 1968; Root et al., 1969). À proporção que aumentou a disponibilidade do GH hipofisário, o que gerou maior experiência com os testes, muitos centros começaram a utilizar pico de GH  $\geq 7$  ng/ml como ponto de corte. Posteriormente, com a produção do GH biosintético, níveis superiores ou iguais a 10 ng/ml passaram a ser considerados normais. Não há dados consistentes que suportem esses pontos de corte. Além da inexistência de níveis diagnósticos precisos, obesidade, hipotireoidismo, uso crônico de glicocorticoides e retardo puberal podem prejudicar a resposta aos testes provocativos (Rose, 2007). Assim, mesmo empregando-se critérios rigorosos, muitos pacientes com diagnóstico

prévio de DGH, quando retestados um a seis meses após a suspensão do tratamento, apresentam respostas do GH normais após testes de estímulo (Maghnie et al., 1999; Loche et al., 2002; Donabauer et al., 2003; Arrigo et al., 2006).

Níveis diminuídos de IGF-1 e IGFBP-3, ambos regulados pelo GH, podem contribuir para o diagnóstico de DGH, embora, isoladamente, tenham especificidade e sensibilidade baixas (Tillmann et al., 1997; Mitchell et al., 1999). Esses exames são úteis, especialmente em crianças com menos de um ano de idade, nas quais a integridade do eixo somatotrófico não pode ser avaliada através de testes de estímulo.

A secreção de outros hormônios hipofisários como prolactina, TSH, ACTH e gonadotrofinas, avaliada pelos níveis basais dos mesmos ou após testes de estímulo, complementa a investigação dos pacientes com suspeita de DGH.

A RNMH tem sido utilizada como adjuvante no diagnóstico de DGH (Dattani & Preece, 2004; Maghnie et al., 2004; Argyropoulou & Kiortsis, 2005). O referido exame é útil para avaliação do tamanho da AH, localização da NH, definição do aspecto da haste hipofisária e descrição de outras alterações hipotálamo-hipofisárias. Há associação entre malformações neuro-hipofisárias e gravidade e evolução do hipopituitarismo (Metha et al., 2009). Atualmente, NH ectópica pode ser considerada marcador específico de DGH, especialmente quando a haste hipofisária não é visualizada (Maghnie et al., 1999; Coutant et al., 2001; Léger et al., 2005). Além disso, o risco de hipopituitarismo é 27,2 vezes maior nos pacientes que apresentam esta alteração quando comparados com aqueles nos quais a NH está normalmente posicionada. A RNMH também deve ser realizada em todos os pacientes com início tardio de DGH, com o objetivo de excluir tumores que possam estar ligados à gênese da doença.

#### 5.2.4. Tratamento

O GH recombinante é usado no tratamento da DGH e é administrado por via subcutânea, na dose de 0,025 a 0,035 mg/kg/dia (0,075 a 0,1 UI/kg/dia), seis a sete vezes/semana. A introdução do GH irá promover retomada rápida do crescimento e a estatura final será normal na maioria dos casos (Dattani & Preece, 2004). Entretanto, a resposta terapêutica depende de algumas variáveis como etiologia da deficiência hormonal, idade e estatura no início do tratamento, estatura no início da puberdade, duração do tratamento e frequência das injeções (Ranke et al., 1999; Cutfield et al., 1999; Thomas et al., 2001; Saenger 2002; Tanaka et al., 2002). Os resultados são melhores com a introdução precoce do

tratamento e quando há deficiência gonadotrófica associada, levando à puberdade mais tardia. Crianças que apresentam alterações anatômicas na região hipotálamo-hipofisária têm ganho estatural maior quando comparadas àquelas sem anomalias na RNMH (Coutant et al., 2001; Zenaty et al., 2003). A correção de outras deficiências hormonais é fundamental para que o tratamento seja eficaz.

Alguns estudos sugerem que ao final do crescimento, pelo menos um mês após a suspensão da medicação, a secreção do GH deve ser reavaliada. O objetivo é a confirmação da DGH, já que um percentual de indivíduos com testes de estímulos não responsivos antes do tratamento apresenta níveis normais de GH quando retestados (Maghnie et al., 1999; Loche et al., 2002; Donabauer et al., 2003; Arrigo et al., 2006). O teste farmacológico de escolha é a insulina (GH Research Society, 2000), mas, nos pacientes com contraindicação à realização do mesmo, tem-se como alternativa o uso de arginina associado ao GHRH (Donabauer et al., 2003). Quando a deficiência grave for confirmada (pico de GH inferior a 3 µg/l) o tratamento deve ser mantido na idade adulta.

***JUSTIFICATIVA***

Os critérios diagnósticos de deficiência de GH ainda não estão bem estabelecidos. O pico diminuído de GH após testes de estímulo farmacológicos, embora ainda seja o principal parâmetro para conclusão diagnóstica, está associado a resultados falso-positivos e falso-negativos (Rosenfeld, 1997; GH Research Society, 2000). A descrição de alterações anatômicas da região hipotálamo-hipofisária à RNMH ajudou na identificação de formas de DGH, previamente definidas como “idiopáticas” (Fujisawa et al., 1987; Kikuchi et al., 1988; Argyropoulou et al., 1991; Argyropoulou et al., 1992). Associado a esse fato, mutações em genes responsáveis pela formação e desenvolvimento da pituitária foram descritas em alguns desses pacientes (Kelberman et al., 2009). Mais recentemente, a ectopia da NH foi definida como marcador de DGH permanente, sobretudo quando se associa à haste hipofisária ausente (Maghnie et al., 1999; Maghnie et al., 2004). Muitos aspectos fisiopatológicos e moleculares relacionados à DGH ainda não estão esclarecidos e o melhor entendimento dessa patologia, sabidamente heterogênea, depende da descrição fenotípica detalhada dos pacientes.

Desde 1998 pacientes com DGH no estado da Bahia têm sido acompanhados no Centro de Endocrinologia e Diabetes do Estado da Bahia (CEDEBA), serviço público de referência para tratamento de doenças endócrino-metabólicas. Entre a instalação do programa, em dezembro/1998 e dezembro/2009, a NH ectópica foi diagnosticada em 130 pacientes com DGH, sendo esta a maior casuística já descrita de pacientes acompanhados num mesmo serviço. Por isso o presente estudo justifica-se, sendo que os resultados do mesmo poderão: a) corroborar resultados de estudos prévios; b) identificar peculiaridades da DGH associada à NH ectópica na população do estado da Bahia; c) indicar o melhor algoritmo de investigação da função somatotrófica e do restante da função hipofisária, evitando o retardo no diagnóstico e permitindo a instituição mais precoce do tratamento hormonal. O diagnóstico imediato, principalmente dos casos de hipopituitarismo congênito associado à DHHC, irá diminuir a morbidade dessa condição, sobretudo relacionada a quadros graves de hipoglicemia. Além disso, quanto mais cedo for iniciado o tratamento com GH, melhor será o prognóstico estatural.

***OBJETIVOS***

## Geral

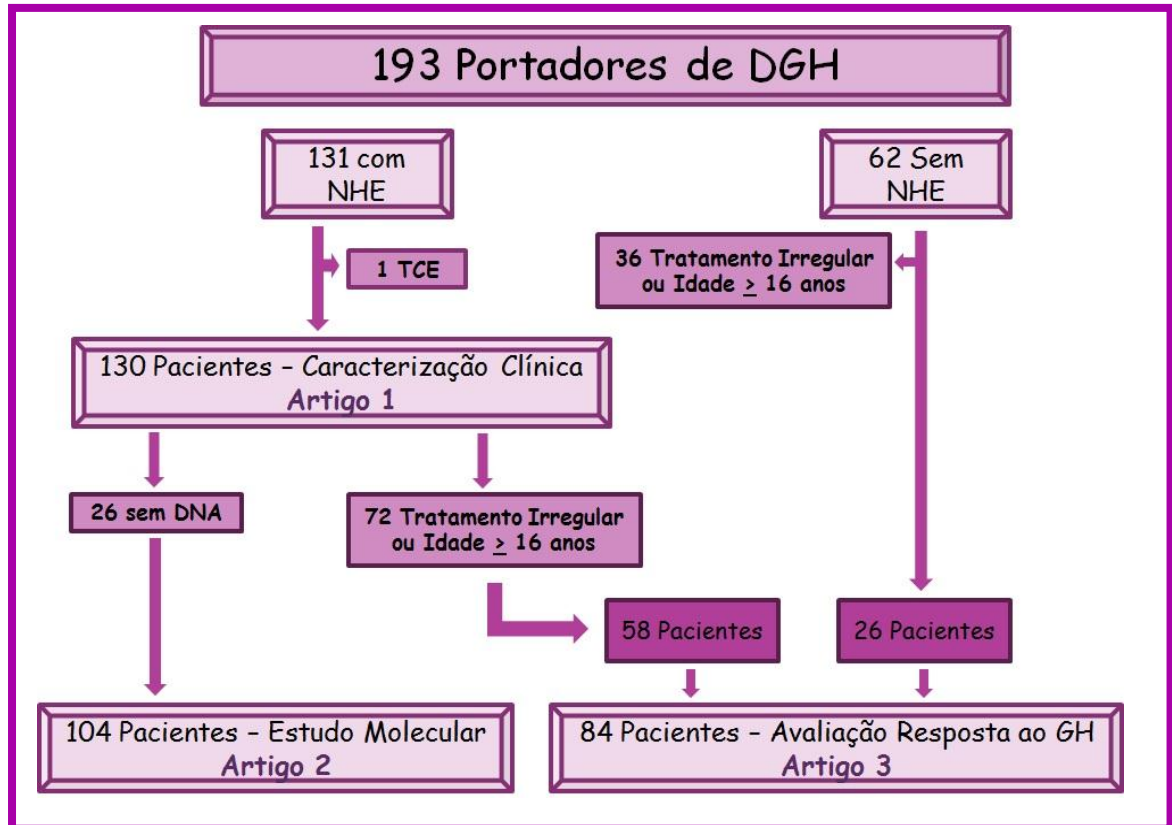
- Descrever o perfil clínico/hormonal e molecular de uma coorte de pacientes com DGH e NH ectópica, incluídos no Programa de Medicamentos Excepcionais (PROMEX) e acompanhados no Centro de Diabetes e Endocrinologia da Bahia (CEDEBA) entre dezembro de 1998 e dezembro de 2009.

## Específicos

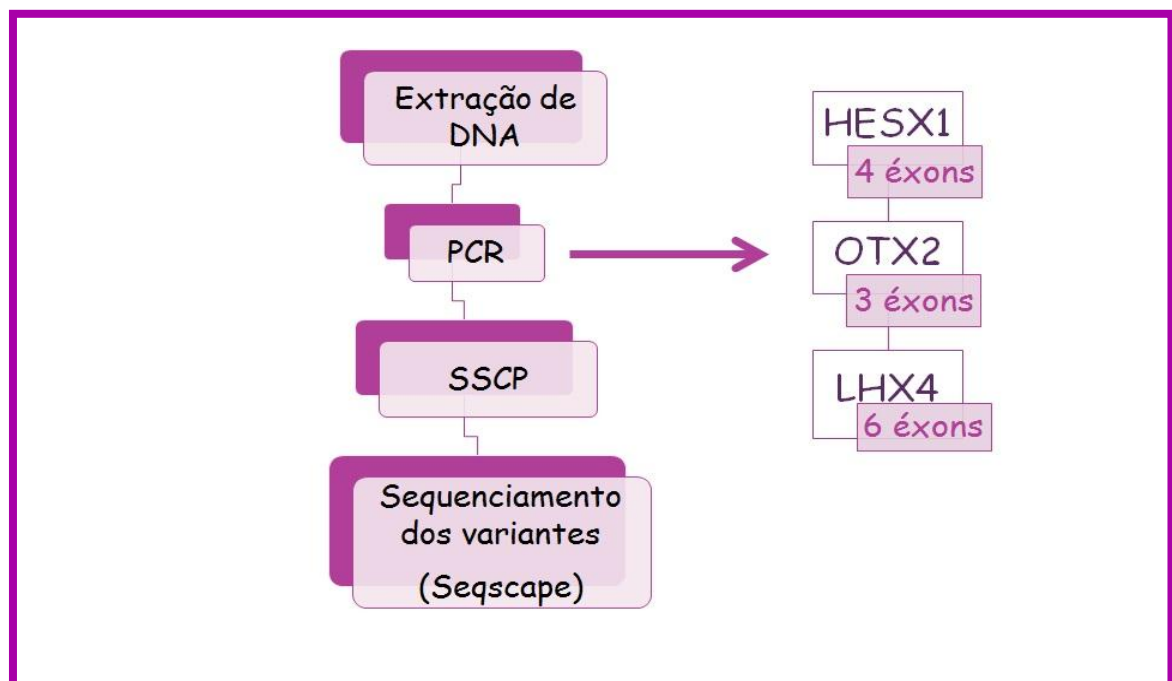
- Descrever as características clínicas, laboratoriais e radiológicas dos pacientes com DGH e NH ectópica;
- Estudar os genes HESX1, LHX4 e OTX2 nos pacientes com DGH e ectopia da NH, para avaliar a presença ou não de mutações que possam estar associadas à DGH;
- Descrever associação entre genótipo e fenótipo dos indivíduos com DGH e NH ectópica;
- Comparar os parâmetros antropométricos e a resposta ao tratamento com GH recombinante dos pacientes com e sem NH ectópica.



***MATERIAL E***  
***MÉTODOS***



**Figura 1:** Estratégia para seleção dos pacientes. NHE, neuro-hipófise ectópica; TCE, traumatismo crânio-encefálico.



**Figura 2:** Estratégia do estudo molecular.

***RESULTADOS E  
DISCUSSÃO***

## Resumo do Artigo 1

**Título:** Características clínicas e laboratoriais de 130 pacientes com ectopia do lobo posterior da hipófise e deficiência de hormônio do crescimento

Trata-se de um estudo ambispectivo que avaliou todos os pacientes com diagnóstico de ectopia do lobo posterior (ELP) e DGH acompanhados num serviço de referência de endocrinologia ao longo de 11 anos. O objetivo foi descrever as características clínicas, hormonais e radiológicas de 130 pacientes (93 homens) com ELP. O estudo demonstrou a presença de pico elevado de GH em 5,9% dos pacientes, reforçando a inexistência de marcadores biológicos inequívocos no diagnóstico de DGH. Houve predominância de DHHC, sobretudo quando a haste hipofisária não foi visualizada. A variabilidade fenotípica dos pacientes dessa casuística confirma resultados de estudos prévios e evidencia a importância da realização da RNMH nos pacientes com suspeita de DGH.

## Características clínicas e laboratoriais de 130 pacientes com ectopia do lobo posterior da hipófise e deficiência de hormônio do crescimento

Couto-Silva, A.C.<sup>1,2,3</sup>, Acosta, A.X.<sup>1,4</sup>, Bomfim, C.<sup>5</sup>, Vigolvinho, R.<sup>2</sup>, Alves, C.<sup>4</sup>, Bittencourt, A.V.<sup>4</sup>, Adan, L.<sup>3,4</sup>

1- Laboratório Avançado de Saúde Pública/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, 2- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), 3- Centro de Diabetes e Endocrinologia do Estado da Bahia (CEDEBA), 4- Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), 5- Hospital Aristides Maltez

### **Resumo**

**Introdução:** os marcadores biológicos para diagnóstico de deficiência de hormônio do crescimento (DGH) ainda não estão bem estabelecidos, mas a identificação de ectopia do lobo posterior da hipófise (ELP) na ressonância nuclear magnética de hipófise (RNMH) confirma o diagnóstico de DGH.

**Objetivo:** descrever as características clínicas, hormonais e radiológicas de pacientes com ELP e DGH.

**Material e Métodos:** estudo ambispectivo de pacientes com ELP e DGH avaliados no Centro de Diabetes e Endocrinologia do Estado da Bahia entre 1998 e 2009.

**Resultados:** este estudo foi constituído de 130 pacientes (93 do sexo masculino), com idade média ao início do tratamento de  $12,4 \pm 5,5$  (2,7 - 27,0) anos. Alterações no exame físico foram descritas em 16,9% dos pacientes. Sete pacientes (5,9%) tiveram resposta normal do GH após teste de estímulo farmacológico. A maioria dos pacientes (61,5%) tinha deficiência hormonal hipofisária combinada (DHHC), mais prevalente naqueles com haste hipofisária ausente. Adeno-hipófise (AH) hipoplásica, descrita em 90% dos pacientes, não diferiu nos grupos com deficiência isolada de GH (DGHI) e DHHC. Malformações cerebrais foram descritas em 12 pacientes (9,2%).

**Conclusão:** a heterogeneidade clínica da patologia, confirmada na maior casuística já descrita em pacientes com DGH e ELP, sugere o envolvimento de vários mecanismos na patogênese da doença.

**Descritores:** neuro-hipófise, ectópica, crescimento, deficiência, GH

## **Introdução**

O diagnóstico de deficiência de hormônio do crescimento (DGH) baseia-se na associação de critérios antropométricos (baixa estatura e desaceleração da velocidade de crescimento) e níveis séricos diminuídos de GH em resposta a testes de estímulo farmacológicos (Rosenfeld *et al.*, 1995; Rosenfeld, 1997). Muitos são os fatores que influenciam a resposta do GH a testes de estímulo, sendo, portanto, a utilização dos mesmos objeto de controvérsia (Rosenfeld, 1997; GH Research Society, 2000).

Com o advento da ressonância nuclear magnética de hipófise (RNMH), foi possível caracterizar a morfologia da glândula, o que permitiu a identificação de alterações hipotalâmicas e/ou hipofisárias em pacientes anteriormente diagnosticados como portadores de formas idiopáticas de DGH (Fujisawa *et al.*, 1987; Kikuchi *et al.*, 1988; Argyropoulou *et al.*, 1991; Argyropoulou *et al.*, 1992). A ectopia do lobo posterior da hipófise (ELP) é considerada o marcador permanente de DGH (Maghnie *et al.*, 1999; Maghnie *et al.*, 2004) e pode se associar à hipoplasia de adeno-hipófise (AH) e à ausência de haste hipofisária, caracterizando a síndrome de interrupção de haste hipofisária (PSIS) (Fujisawa *et al.*, 1987). Além da DGH, portadores da síndrome podem apresentar deficiências de outros hormônios hipofisários, constituindo a deficiência hormonal hipofisária combinada (DHHC).

A patogênese da ELP não está bem determinada, tendo sua ocorrência sido inicialmente associada a trauma perinatal, uma vez que tem frequência elevada em pacientes nascidos de parto pélvico (Kikuchi *et al.*, 1988). Atualmente, a hipótese congênito-genética é mais aceita, sendo a apresentação pélvica considerada consequência e não causa da disfunção hipofisária (Maghnie *et al.*, 1996; Genovese *et al.*, 1997).

A despeito das semelhanças à RNMH, há grande heterogeneidade fenotípica entre os portadores de ELP (Osório *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2007). O objetivo desse estudo foi descrever as características clínicas, hormonais e radiológicas de 130 pacientes com ELP e DGH.

## **Material e Métodos**

### *Pacientes*

Estudo ambispectivo longitudinal que avaliou 130 pacientes (93 do sexo masculino) com diagnóstico de DGH e ELP, acompanhados no Centro de Diabetes e Endocrinologia do Estado da Bahia (CEDEBA), serviço público de referência no estado da Bahia, Brasil, num

período de 11 anos (1998 a 2009). Duas pacientes, cujas neuro-hipófises não foram visualizadas, foram mantidas no estudo e uma paciente com ELP e história de traumatismo crânio-encefálico após acidente automobilístico foi excluída. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do CEDEBA e da FIOCRUZ e a inclusão no mesmo foi feita pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes ou seus responsáveis.

### *Métodos*

#### Avaliação Clínica

A estatura foi aferida com estadiômetro e o seu desvio-padrão (DP) foi calculado utilizando-se referências-padrão (Tanner *et al.*, 1966). Estatura-alvo foi calculada a partir das estaturas parentais (Tanner *et al.*, 1970). Dados referentes à consanguinidade, condições de parto e eventos adversos perinatais foram também obtidos. Micropênis foi definido como pênis de tamanho inferior a -2,5 DP (Lee *et al.*, 1980). O estágio puberal foi estabelecido segundo os critérios de Tanner (Marshall & Tanner, 1969, 1970). O desenvolvimento puberal foi classificado em: 1- Retardo puberal: ausência de mamas e testículo inferior a 4 ml entre 13 e 18 e 14 e 18 anos, respectivamente, nos sexos feminino e masculino; 2- Deficiência gonadotrófica completa: ausência de mamas e volume testicular inferior a 4 ml acima dos 18 anos; 3- Deficiência gonadotrófica parcial: telarca normal e amenorreia primária ou secundária com duração de pelo menos três meses e volume testicular entre 4 e 10 ml após 18 anos e 4- Puberdade normal: ciclos menstruais regulares e volume testicular acima de 11 ml, tendo o início da puberdade ocorrido antes dos 13 e dos 14 anos, respectivamente nos sexos feminino e masculino.

#### Exames Laboratoriais

O GH foi mensurado antes e 60 e 90 minutos após estimulação com clonidina (0,15 mg/m<sup>2</sup>, n=128) ou L-DOPA (10 mg/kg, n=6); ou antes e 20, 45, 60, 75 e 90 minutos após a estimulação com insulina (0,1 UI/kg, n=29). Pico de GH foi considerado diminuído quando inferior a 7 ng/ml. Dosagem de IGF-1 foi realizada em 78 pacientes. Para avaliação do restante da função hipofisária foram realizadas dosagens basais de T4 livre, TSH e prolactina. Teste do TRH foi realizado em quatro pacientes. Para avaliação da função corticotrófica, foi dosado o cortisol basal (n=113) ou após estímulo com insulina (n=4) ou ACTH (n=4). Deficiência de ACTH foi diagnosticada com níveis de cortisol basal inferiores a 5 µg/dl ou 19,8 µg/dl, nos casos onde o teste de estímulo foi realizado. Em pacientes com níveis basais

de cortisol entre 5 e 6,4 µg/dl a deficiência de ACTH foi considerada possível e níveis de cortisol acima de 6,4 µg/dl foram considerados normais. Dosagens de FSH, LH, testosterona e estradiol foram realizadas nos pacientes em idade puberal. Deficiência de hormônio antidiurético (ADH) foi diagnosticada na presença de osmolaridade urinária diminuída e diurese superior a 3 litros/24 horas em adolescentes e adultos e superior a 2 l/m<sup>2</sup> de superfície corporal em crianças.

#### Ressonância Nuclear Magnética de Hipófise (RNMH)

Foram obtidas imagens à RNMH em cortes finos de 3 mm de espessura nos planos sagital e coronal. A haste hipofisária foi definida como normal, ausente ou afilada após administração de gadolínio. A altura máxima da hipófise foi calculada através da medida perpendicular da maior distância entre a base e o topo da glândula. Considerou-se hipoplasia hipofisária quando a altura da glândula para a idade foi menor que - 2 DP quando comparada com os controles normais descritos na literatura (Argyropolou *et al.*, 1991). Malformações cerebrais associadas foram também observadas. Todos os exames foram revisados pelo mesmo neurorradiologista pediátrico.

#### *Análise estatística*

Os resultados foram expressos como média ± DP. Comparações de proporções intergrupos foram realizadas utilizando o X<sup>2</sup> ou teste exato de Fisher. P < 0,05 foi considerado significativo.

## **Resultados**

#### *Características Clínicas Gerais*

As idades médias ao início do tratamento com GH e na última consulta foram, respectivamente, 12,4 ± 5,5 (2,7 - 27,0) anos e 17,1 ± 5,7 (5,2 - 33,1) anos. Cento e vinte e sete pacientes estavam pré-púberes no início do tratamento. Parto vaginal e cesáreo foram descritos em 90 e 36 pacientes, respectivamente, não sendo a informação obtida em quatro pacientes. Apresentação pélvica ocorreu em 35 pacientes (40%) cujo parto foi vaginal. A apresentação fetal não foi relatada nos casos de cesarianas. História de consanguinidade estava presente em 13 dos 117 pacientes (11,1%) nos quais esta informação pode ser obtida. Um paciente tinha um irmão com DGH sem ELP.



Alterações do exame físico, isoladas ou associadas, foram descritas em 22 pacientes (16,9%): anoftalmia direita (n=1), criptorquidia (n=9), micropênis (n=10), lábio leporino (n=1), estrabismo (n=4) e pé torto congênito (n=2).

#### *Eixo Somatotrófico*

A estatura no início do tratamento com GH foi de  $-4,6 \pm 1,9$  (-9,5 a 0,5) DP. Cinco pacientes encontravam-se dentro da curva normal antes do tratamento, um que havia interrompido uso de GH iniciado aos três anos de idade e os demais nos quais a DGH foi investigada em função de desaceleração da velocidade de crescimento (n=2), anemia de Fanconi (n=1), história de micropênis e hipoglicemia neonatal (n=1). A diferença entre a estatura no início do tratamento e a estatura-alvo familiar (n= 121) foi de  $-3,8 \pm 1,8$  (-8,8 a 1) DP.

Cento e dezenove pacientes realizaram teste de estímulo do GH, sendo o exame repetido em 44 deles. O pico do GH foi normal em sete pacientes (5,9%), três no primeiro (25,2; 15,8 e 17,5 ng/ml) e quatro no segundo exame (65,0; 12,9; 10,9 e 8,1 ng/ml), sendo cinco testes realizados após clonidina e dois após insulina. Os níveis de IGF-1 estavam normais em dois dos sete pacientes que apresentaram pico de GH normal. O diagnóstico de DGH foi estabelecido em função dos seguintes critérios: um (n= 47) ou dois (n=13) testes de estímulo não responsivos associados à ELP na RNMH; dois testes de estímulo não responsivos (n=26); um teste de estímulo não responsivo associado a níveis diminuídos de IGF-1 (n=16); ELP na RNMH (n=12); DHHC (n=6); um teste de estímulo não responsivo associado à sela vazia na tomografia computadorizada de hipófise (n=1). Nove pacientes foram tratados com apenas um teste de estímulo, diante de quadro muito sugestivo de DGH, enquanto aguardava-se a RNMH.

#### *Eixo Tireotrófico e Prolactina*

Deficiência de TSH foi diagnosticada em 72 pacientes (55,4%) após teste do TRH (n= 04) ou diante de níveis de T4 diminuídos associados aos de TSH não aumentados. A prolactina estava elevada em 10 (8,5%) dos 117 pacientes nos quais a dosagem foi realizada.

#### *Eixo Corticotrófico*

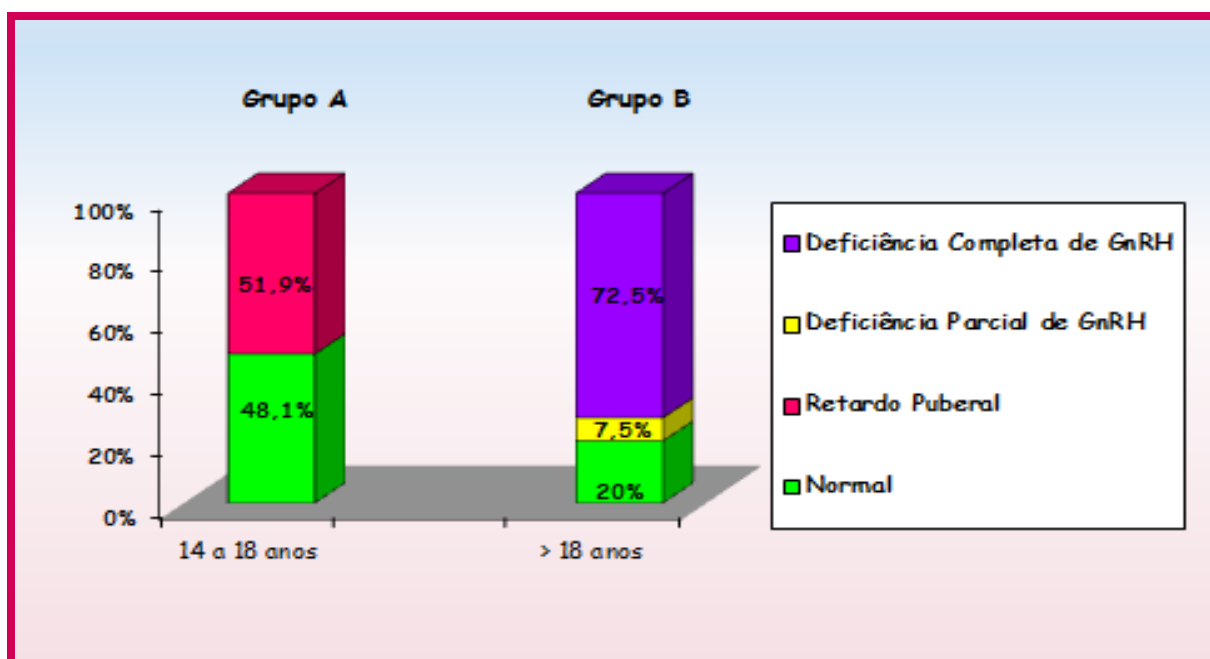
Em 48 pacientes (39,7%) o diagnóstico de deficiência ACTH foi confirmado. Em nove outros (7,4%), com níveis basais de cortisol entre 5 e 6,4 µg/dl, a deficiência de ACTH foi considerada possível. Nove pacientes não tiveram o eixo corticotrófico avaliado. Os pacientes

com diagnóstico de insuficiência adrenal não apresentavam sinais e sintomas compatíveis com o quadro, exceto aqueles com história de hipoglicemia neonatal e introdução precoce de corticoide (n= 5) e pacientes do sexo feminino, que, à época da puberdade não apresentavam pelos pubianos (n=8), sugerindo ausência de estímulo das zonas reticular e/ou fasciculada das adrenais.

### *Eixo Gonadotrófico*

#### Sexo Masculino

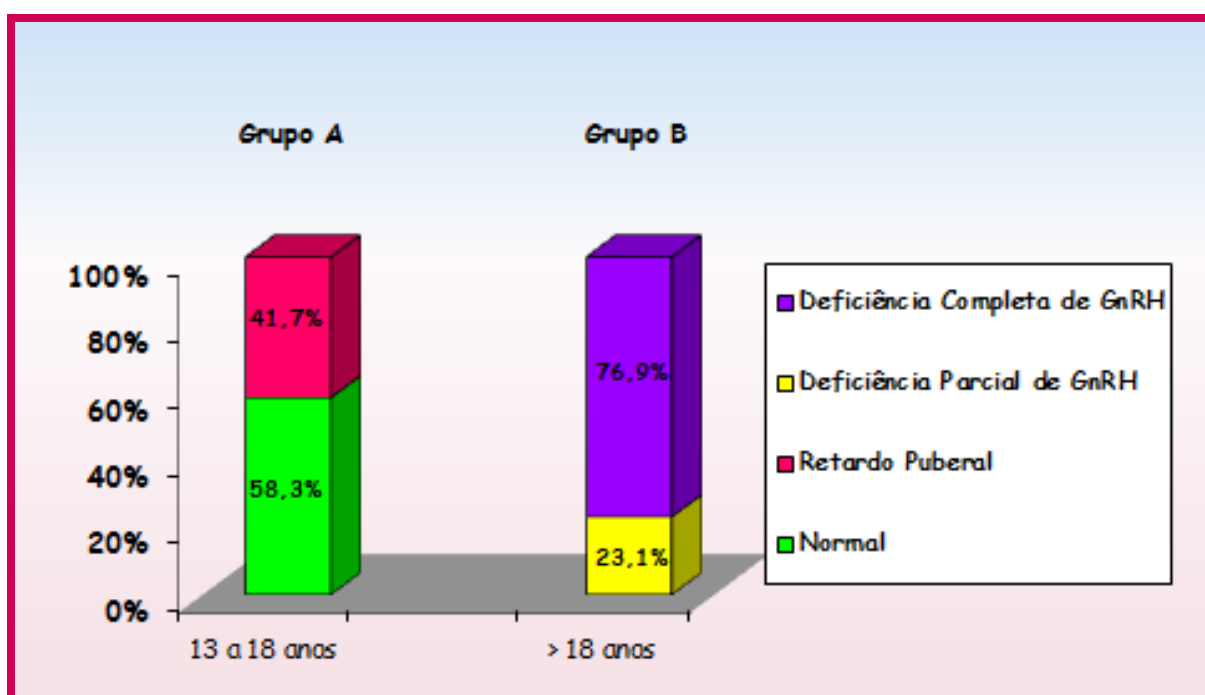
Na última avaliação, 27 pacientes (29%) tinham entre 14 e 18 anos (grupo A) e 40 (43%) tinham mais de 18 anos (grupo B). A idade média desses pacientes foi de  $20,1 \pm 4,7$  (14,1-33,1) anos. No grupo A, 13 pacientes (48,1%) não apresentavam deficiência gonadotrófica, enquanto 14 (51,9%) evoluíram com retardo puberal. No grupo B, oito pacientes (20%) tinham função gonadotrófica normal e 32 (80%) apresentavam deficiência gonadotrófica, sendo completa em 29 indivíduos (Figura 1). As frequências de micropênis e criptorquidia nos pacientes incluídos no estudo foram, respectivamente, 10,8 e 9,7 %. Na última consulta quatro pacientes com história de micropênis estavam abaixo dos 14 anos, quatro apresentavam retardo puberal e dois tinham deficiência gonadotrófica. Naqueles com criptorquidia, três eram pré-púberes, três apresentavam retardo puberal e dois tinham de deficiência gonadotrófica. Um dos pacientes com criptorquidia direita, previamente submetido a cirurgia, apresentava testículo de 8 ml aos 13,7 anos.



**Figura 1:** Status gonadotrófico dos 67 pacientes do sexo masculino acima de 14 anos na última avaliação. Os valores nas colunas representam o percentual de pacientes em cada grupo.

### Sexo Feminino

Na última consulta, 12 pacientes (32,4%) tinham entre 13 e 18 anos (grupo A) e 13 (35,1%) tinham mais de 18 anos (grupo B). A idade média dessas pacientes foi de  $18,9 \pm 3,6$  (14,9-27,1) anos. No grupo A, sete pacientes (58,3%) não apresentavam deficiência gonadotrófica, enquanto cinco (41,7%) tinham retardo puberal. No grupo B, todas as pacientes apresentavam deficiência gonadotrófica, sendo completa em dez (76,9%) (Figura 2). Uma paciente com deficiência parcial de gonadotrofinas apresentava amenorreia primária aos 24 anos e as demais referiram menarca aos 14,8 e 16 anos, com quadro posterior de amenorreia secundária.



**Figura 2:** Status gonadotrófico das 25 pacientes do sexo feminino acima de 13 anos na última avaliação. Os valores nas colunas representam o percentual de pacientes em cada grupo.

### Resumo da Função Hipofisária Anterior

Excluindo-se os casos de retardo puberal e deficiência corticotrófica possível, a frequência de DHHC foi de 61,5 % (Quadro 1), sendo esse percentual de 65,4%, quando foram incluídos os casos de retardo puberal e deficiência corticotrófica possível. Não houve diferença na prevalência de apresentação pélvica nos pacientes com deficiência de GH isolada (DGHI) e DHHC.

	n (%)
<b>TSH+ACTH+GnRH</b>	<b>24 (30)</b>
<b>TSH+ACTH</b>	<b>21 (26,3)</b>
<b>TSH+GnRH</b>	<b>14 (17,5)</b>
<b>TSH</b>	<b>13 (16,3)</b>
<b>GnRH</b>	<b>5 (6,2)</b>
<b>ACTH+GnRH</b>	<b>2 (2,5)</b>
<b>ACTH+DI</b>	<b>1 (1,2)</b>

**Quadro 1:** Prevalência da disfunção hormonal nos 80 casos de DHHC.

### *Características Radiológicas*

A RNMH foi realizada aos  $13,2 \pm 5,8$  anos (2,6 - 28,5) anos. A neuro-hipófise (NH) estava ectópica em 128 pacientes, sendo que em dois deles parte da NH encontrava-se em topografia normal. Em outros dois pacientes a NH não foi observada, um dos quais apresentava diabetes insipidus. A AH estava hipoplásica em 117 pacientes (90%), ausente em cinco (3,8%) e normal em oito (6,2%). A haste hipofisária não foi visualizada em 86 indivíduos (66,2%), e naqueles onde foi identificada, foi definida como interrompida (n=25), afilada (n=13) ou normal (n=6). Não houve associação entre parto pélvico e ausência de haste. Comparando-se os grupos com DGHI e DHHC, observou-se que a ausência da haste hipofisária foi mais frequente no segundo grupo (p= 0,007). A ocorrência de AH hipoplásica não diferiu nos dois grupos. Malformações do sistema nervoso central, isoladas ou combinadas, foram observadas em doze pacientes (9,2%), sendo descritas no Quadro 2.

	n
<b>Agnesia do corpo caloso</b>	<b>2</b>
<b>Hipoplasia do corpo caloso</b>	<b>2</b>
<b>Agnesia do septo pelúcido</b>	<b>1</b>
<b>Angioma venoso</b>	<b>2</b>
<b>Colpocefalia</b>	<b>3</b>
<b>Leucomalácia ventricular</b>	<b>1</b>
<b>Ausência da artéria cerebral média</b>	<b>1</b>
<b>Malformação de Chiari tipo 1</b>	<b>1</b>
<b>Gliose e desmielinização</b>	<b>2</b>

**Quadro 2:** Malformações cerebrais nos pacientes com ELP.

## Discussão

Embora a síndrome de interrupção de haste hipofisária (PSIS) tenha sido inicialmente descrita em 1987 (Fujisawa *et al.*, 1987), muitas questões envolvendo a mesma ainda carecem de resposta. O presente estudo descreve as características clínicas, hormonais e radiológicas de 130 pacientes com PSIS e baixa estatura, a maior casuística já publicada até o momento.

A predominância de pacientes do sexo masculino, com razão de 2,5:1, é similar à encontrada em outros estudos (Pinto *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2009), não havendo, entretanto, uma justificativa para esse achado. Discute-se que decorra do impacto social da baixa estatura, maior nos indivíduos do sexo masculino, que os levaria a buscar atendimento médico com maior frequência (Hughes *et al.*, 2010). Melo *et al.* (2007) sugerem que a maior prevalência de ELP no sexo masculino pode estar ligada ao cromossomo X, uma vez que alterações do SOX3, presentes naquele cromossomo foram descritas em meninos com baixa estatura e ELP (Woods *et al.*, 2005).

A média de idade quando da realização da RNMH e do início do tratamento foi elevada, ocasionando diagnóstico e tratamento tardios em alguns casos. O diagnóstico tardio pode ser justificado pelas dificuldades associadas à ausência de exames inequívocos para a detecção da DGH e à heterogeneidade clínica da doença (Rosenfeld *et al.*, 1995; Rosenfeld, 1997). Chama atenção que o retardo no diagnóstico ocorreu mesmo em alguns pacientes que apresentaram sinais ou sintomas sugestivos de deficiência hipofisária no período neonatal, o que também já foi descrito por outros autores (Tauber *et al.*, 2005). Importante também ressaltar que caso um pico de GH normal fosse considerado critério de exclusão de DGH, 5,9% dos pacientes do estudo não se beneficiariam do tratamento com GH. Esse achado reforça a importância da realização precoce da RNMH nos pacientes com baixa estatura, especialmente naqueles cuja etiologia não tenha sido esclarecida.

A clonidina, um agonista  $\alpha$ -adrenérgico, atua estimulando a liberação do GHRH e foi o teste utilizado por cinco dos sete pacientes com picos normais de GH. Essa substância é considerada por alguns autores mais potente estimulador da liberação de GH que a hipoglicemia insulínica (Lanes & Hurtado, 1982), podendo induzir resposta normal em pacientes que ainda têm alguma reserva hipofisária. A progressão da isquemia glandular provocada pela interrupção do sistema portal vascular nos portadores de alterações da haste pode contribuir para a falência hormonal progressiva e não resposta aos testes de estímulo (Di Iorgi *et al.*, 2007).

A ocorrência de apresentação pélvica foi de 40%, sendo, portanto, elevada já que na população geral situa-se entre 3 e 4% (Albrechtsen *et al.*, 1998). A associação entre ELP e eventos perinatais, especialmente apresentação pélvica, tem sido demonstrada por vários autores (Kikuchi *et al.*, 1988; Pinto *et al.*, 1997). Acreditava-se que trauma ao nascimento seria responsável pela transecção mecânica da haste hipofisária e consequente regeneração do lobo posterior da hipófise a nível hipotalâmico (Kikuchi *et al.*, 1988). Atualmente, a hipótese congênito-genética é mais aceita, em função da ocorrência de casos familiares e da ausência de eventos perinatais adversos em grande número de pacientes (Maghnie *et al.*, 1991; Argyropoulou *et al.*, 1992; Pinto *et al.*, 1997; Hamilton *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999), descrição em portadores de mutações de fatores de transcrição relacionados à embriogênese hipofisária e em associação com doenças cromossômicas e malformações do sistema nervoso central (Dattani *et al.*, 1998; Hamilton *et al.*, 1998; Machinis *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 2005; Dateki *et al.*, 2008; Diaczok *et al.*, 2008; Tajima *et al.*, 2009; Dateki *et al.*, 2010). No estudo, a descrição de consanguinidade em 11,1 % dos pacientes reforça a possibilidade da influência genética na gênese da doença. Simon *et al.* (2006), avaliando 60 pacientes com ELP, descreveram taxa de consanguinidade e de casos familiares de 12%. Entretanto, houve grande variabilidade fenotípica nos casos familiares, sugerindo que vários mecanismos podem estar associados à patogênese da doença.

Para excluir casos de retardo puberal e consequente superestimação de deficiência gonadotrófica, o diagnóstico de hipogonadismo só foi considerado de certeza nos pacientes acima de 18 anos, sendo descrita em 47,8 e 52% nos sexos masculino e feminino, respectivamente. Entretanto, a prevalência de deficiência gonadotrófica elevou-se para 67,8 e 72%, quando incluídos meninos e meninas acima de 14 e 13 anos, respectivamente. Em casuísticas menores de portadores de PSIS a ocorrência de hipogonadismo situou-se entre 40 e 94%. Rottembourg *et al.* (2008), avaliando 27 pacientes (15 do sexo masculino), observaram hipogonadismo em 73 e 91% dos homens e mulheres, respectivamente. Mas, falso-positivos podem ter sido incluídos, pois foram consideradas, como ponto de corte, as idades de 14,5 nos meninos e 13 anos nas meninas. Criptorquidismo e micropênis foram menos frequentes no presente estudo que em publicações anteriores (Pinto *et al.*, 1997; Rottembourg *et al.*, 2008). O mecanismo de desenvolvimento puberal incompleto nos pacientes com PSIS ainda não está definido. Embora a resposta gonadotrófica após administração de GnRH tenha sido normal em alguns pacientes, alterações da pulsatilidade das gonadotrofinas já foram descritas (Crottaz *et al.*, 1996; Rottembourg *et al.*, 2008). Não há

dados na literatura referentes à fertilidade em portadores de PSIS na idade adulta, sendo importante questão a ser respondida em estudos futuros.

A insuficiência adrenal foi menos prevalente que em estudos prévios (Pinto *et al.*, 1997; Kandemir *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2007). O diagnóstico de insuficiência adrenal é difícil, sendo habitualmente realizado diante de picos insuficientes de cortisol após administração de ACTH ou de insulina. Entretanto, a hipoglicemia induzida pela insulina pode ser grave, especialmente em pacientes com outras deficiências hormonais, tendo seu uso limitado. No presente estudo, apenas o cortisol basal foi mensurado na maioria dos casos, sendo considerado normal quando maior ou igual a 175 nmol/l (6,34 µg/dl), valor com sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 93,3 e 92,3% para detecção de insuficiência de ACTH (Mehta *et al.*, 2005). A diferença na prevalência de insuficiência adrenal nos diversos estudos pode decorrer dos critérios utilizados para definição da mesma, que pode ter sido superestimada em publicações anteriores. Conforme observado no estudo, meninas com deficiência corticotrófica não apresentavam pelos pubianos à época da puberdade, sendo esse um critério indireto de avaliação da produção de cortisol no sexo feminino. Chama atenção que pacientes não diagnosticados no período neonatal, não apresentavam sintomas compatíveis com deficiência corticotrófica, mesmo em situações de estresse. Além disso, alguns pacientes com história de hipoglicemia e convulsões no período neonatal evoluíram sem sintomas mesmo sem a instituição do tratamento, a despeito de, mais tardiamente, terem a confirmação de deficiência de ACTH. A razão para esses achados, também descritos por Tauber *et al.* (2005), é desconhecida.

Publicações anteriores evidenciaram que a DHHC é mais frequente em portadores de ELP (Ultman *et al.*, 1993; Maghnie *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; Osório *et al.*, 2002; Tauber *et al.*, 2005), especialmente quando a haste hipofisária está ausente (Maghnie *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2007), resultados também encontrados no estudo. A DHHC foi descrita em 61,5%, podendo essa frequência ser ainda maior, se pacientes mais jovens ao atingirem a idade puberal apresentarem deficiência gonadotrófica. Além disso, outras deficiências hormonais, especialmente de ACTH, podem se manifestar mesmo após o final do tratamento pelo GH, motivo pelo qual o acompanhamento desses pacientes deve ser mantido indefinidamente (Léger *et al.*, 2005). Localização da NH na eminência média também seria preditor de formas mais graves de insuficiência hipofisária (Léger *et al.*, 2005). AH hipoplásica, encontrada em 90% dos casos, não diferiu entre os portadores de deficiência isolada de GH (DGHI) e DHHC, similar ao descrito por outros autores, sendo considerado sinal não específico, observado tanto em crianças com DGH idiopática como com DHHC

(Garel & Léger, 2007). Malformações cerebrais, embora descritas em apenas 9,2%, menos prevalentes que em séries anteriores, devem sempre ser investigadas nos casos de ELP (Mitchell *et al.*, 2002; Tauber *et al.*, 2005; Simon *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2007).

Em conclusão, os dados referentes aos achados clínicos, radiológicos e hormonais na maior casuística já publicada de pacientes com ELP, confirmam a heterogeneidade clínica da doença e sugerem o envolvimento de vários mecanismos na gênese da mesma. Estudos moleculares têm demonstrado mutações em genes envolvidos na embriogênese hipofisária apenas em número muito restrito de casos, indicando que, embora a teoria genética esteja relacionada à ELP, todos os fatores associados à patogenia da doença ainda não foram elucidados. Diante da suspeita de DGH, a realização de RNMH é mandatória, pois pode ser conclusiva, quando ELP é identificada. Entretanto, como percentual elevado de pacientes com DGH não apresenta alterações radiológicas, a inexistência de exame padrão-ouro, torna necessária a utilização de vários elementos, como os parâmetros antropométricos, (incluindo a dissociação com a estatura-alvo familiar) e os marcadores biológicos clássicos, como dosagens de IGF-1 e testes de estímulo farmacológicos. A interpretação desses exames deve levar em consideração os falsos positivos e negativos associados aos mesmos, para evitar, sobretudo, que portadores de DGH não sejam adequadamente tratados.

### **Referências Bibliográficas**

Rosenfeld, R.G., Albertsson-Wikland, K., Cassorla, F., Frasier, S.D., Hasegawa, Y., Hintz, R.L., Lafranchi, S., Lippe, B., Loriaux, L., Melmed, S., Preece, M.A., Ranke, M.B., Reiter, E.O., Rogol, A.D., Underwood, L.E., Werther, G. (1995) Diagnostic controversy: the diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:1532-1540.

Rosenfeld, R.G. Is growth hormone deficiency a viable diagnosis? [Editorial] (1997) *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:349-351.

GH Research Society. (2000) Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH research society. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85:3990-3993.

Fujisawa, I., Kikuchi, K., Nishimura, K., Togashi, K., Itoh, K., Noma, S., Minami, S., Sagoh, T., Hiraoka, T., Momoi, T., Mikawa, H., Nakano, Y., Itoh, H., Konishi, J. (1987) Transection of the pituitary stalk: development of an ectopic posterior lobe assessed with MR imaging. *Radiology* 165:487-489.



Kikuchi, K., Fujisawa, I., Momoi, T., Yamanaka, C., Kaji, M., Nakano, Y., Konishi, J., Mikawa, H., Sudo, M. (1988) Hypothalamic-pituitary function in growth hormone-deficient patients with pituitary stalk transection. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67:817-823.

Argyropoulou, M., Perignon, F., Brauner, R., Rappaport, R. (1991) Height of normal pituitary gland as a function of age evaluated by magnetic resonance imaging in children. *Pediatric Radiology* 21:247-249.

Argyropoulou, M., Perignon, F., Brauner, R., Brunelle, F. (1992) Magnetic resonance imaging in the diagnosis of growth hormone deficiency. *The Journal of Pediatrics* 120:886-891.

Maghnie, M., Strigazzi, C., Tinelli, C., Autelli, M., Cisternino, M., Loche, S., Severi, F. (1999) Growth hormone (GH) deficiency (GHD) of childhood onset: reassessment of GH status and evaluation of the predictive criteria for permanent GHD in young adults. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84:1324-1328.

Maghnie, M., Ghirardello, S., Genovese, E. (2004) Magnetic resonance imaging of the hypothalamus-pituitary unit in children suspected of hypopituitarism: who, how and when to investigate. *Journal of Endocrinological Investigation* 27:496-509.

Maghnie, M., Genovese, E., Villa, A., Spagnolo, L., Campani, R., Severi, F. (1996) Dynamic MRI in the congenital agenesis of the neural pituitary stalk syndrome: the role of the vascular pituitary stalk in predicting residual anterior pituitary function. *Clinical Endocrinology* 45:281-290.

Genovese, E., Maghnie, M., Beluffi, G., Villa, A., Sammarchi, L., Severi, F., Campani, R. (1997) Hypothalamic-pituitary vascularization in pituitary stalk transection syndrome: is the pituitary stalk really transected? The role of gadolinium-DTPA with spin-echo T1 imaging and turbo-FLASH technique. *Pediatric Radiology* 27:48-53.

Osório, M.G., Marui, S., Jorge, A.A., Latronico, A.C., Lo, L.S., Leite, C.C., Estefan, V., Mendonca, B.B., Arnhold, I.J. (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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87:5076-5084.

Simon, D., Hadjiathanasiou, C., Garel, C., Czernichow, P., Léger, J. (2006) Phenotypic variability in children with growth hormone deficiency associated with posterior pituitary ectopia. *Clinical Endocrinology* 64:416-422.

Melo, M.E., Marui, S., Carvalho, L.R., Arnhold, I.J., Leite, C.C., Mendonça, B.B., Knoepfelmacher, M. (2007) Hormonal, pituitary magnetic resonance, LHX4 and HESX1 evaluation in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe. *Clinical Endocrinology* 66:95-102.

Tanner, J.M., Whitehouse, R.H., Takaishi, M. (1966) Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: british children. *Archives of Disease in Childhood* 41:613-635.

Tanner, J.M., Goldstein, H., Whitehouse, R.H. (1970) Standards for children's height at ages 2–9 years allowing for height of parents. *Archives of Disease in Childhood* 47:755-762.

Lee, P.A., Mazur, T., Danish, R., Amrhein, J., Blizzard, R.M., Money, J., Migeon, C.J. (1980) Micropenis I: criteria, etiologies and classification. *The Johns Hopkins Medical Journal* 146:156-163.

Marshal, W.A., Tanner, J.M. (1969) Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Archives of Disease in Childhood* 44:291-303.

Marshal, W.A., Tanner, J.M. (1970) Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Archives of Disease in Childhood* 45:13-24.

Pinto, G., Netchine, I., Sobrier, M. L., Brunnelle, F., Souberbielle, J.C., Brauner, R. (1997) Pituitary stalk interruption syndrome: a clinical-biological-genetic assessment of its pathogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:3450-3454.

Chen, S., Léger, 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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84:2408-2413.

Mehta, A., Hindmarsh, P.C, Mehta, H., Turton, P.G.T., Russell-Eggitt, I., Taylor, D., Chong, W.K., Dattani, M.T. (2009) Congenital hypopituitarism: clinical, molecular and neuroradiological correlates. *Clinical Endocrinology* 71:376-382.

Hughes, I.P., Choong, C.S., Cotterill, A., Harris, M., Davies, P.S.W. (2010) Gender bias in children receiving growth hormone treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95:1191-1198.

Woods, K.S., Cundall, M., Turton, J., Rizzoti, K., Mehta, A., Palmer, R., Wong, J., Chong, W.K., Al-Zyoud, M., El-Ali, M., Otonkoski, T., Martinez-Barbera, J.P., Thomas, P.Q., Robinson, I.C., Lovell-Badge, R., Woodward, K.J., Dattani, M.T. (2005) Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *American Journal of Human Genetics* 76:833-849.

Tauber, M., Chevrel, J., Diene, G., Moulin, P., Jouret, B., Oliver, I., Pienkowski, C., Sevely, A. (2005) Long-term evolution of endocrine disorders and effect of GH therapy in 35 patients with pituitary stalk interruption syndrome. *Hormone Research* 64:266-273.

Lanes, R., Hurtado, E. (1982) Oral clonidine – an effective growth hormone-releasing agent in prepubertal subjects. *Pediatrics* 100:710-714.

Di Iorgi, N., Secco, A., Napoli, F., Tinneli, C., Calcagno, A., Fratangeli, N., Ambrosini, L., Rossi, A., Lorini, R., Maghnie, M. (2007) Deterioration of growth hormone (GH) response and anterior pituitary function in young adults with childhood-onset GH deficiency and ectopic posterior pituitary: a two-year prospective follow-up study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92:3875-3884.

Albrechtsen, S., Rasmussen, S., Dalaker, K., Irgens, L.M. (1998) The occurrence of breech presentation in Norway 1967-1994. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 77:410-415.

Maghnie, M., Triulzi, F., Larizza, D., Preti, P., Priora, C., Scotti, G., Severi, F. (1991) Hypothalamic-pituitary dysfunction in growth hormone-deficient patients with pituitary abnormalities. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73:79-83.

Hamilton, J., Chitayat, D., Blaser, S., Cohen, L.E., Phillips, J.A., Daneman, D. (1998) Familial growth hormone deficiency associated with MRI abnormalities. *American Journal of Medical Genetics* 80:128-132.

Dattani, M.T., Martinez-Barbera, J.P., Thomas, P.Q., Brickman, J.M., Gupta, R., Mårtensson, I.L., Toresson, H., Fox, M., Wales, J.K., Hindmarsh, P.C., Krauss, S., Beddington, R.S., Robinson, I.C. (1998) Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septooptic dysplasia in human and mouse. *Nature Genetics* 19:125-133.

Machinis, K., Pantel, J., Netchine, I., Léger, J., Camand, O.J., Sobrier, M.L., Dastot-Le Moal, F., Duquesnoy, P., Abitbol, M., Czernichow, P., Amselem, S. (2001) Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *American Journal of Human Genetics* 69:961-968.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93:3697-36702.

Diaczok, D., Romero, C., Zurich, J., Marshall, I., Radovick, S. (2008) A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93:4351-4359.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94:314-319.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95:756-764.

Rottembourg, D., Linglart, A., Adamsbaum, C., Lahlou, N., Teinturier C., Bougnères, P., Carel, J.C. (2008) Gonadotrophic status in adolescents with pituitary stalk interruption syndrome. *Clinical Endocrinology* 69:105-111.

Crottaz, B., Uské, A., Reymond, M.J., Rey, F., Temler, E., Germond, M., Gomez, F. (1996) Normogonadotropic primary amenorrhea in a growth hormone-deficient woman with ectopic posterior pituitary: gonadotropin pulsatility and follicle-stimulating hormone bioactivity. *Journal of Endocrinological Investigation* 19:48-53.

Kandemir, N., Yordam, N., Cila, A., Besim, A. (2000) Magnetic resonance imaging in growth hormone deficiency: relationship between endocrine function and morphological findings. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 13:171-178.

Mehta, A., Hindmarsh, P.C., Dattani, M.T (2005) An update on the biochemical diagnosis of congenital ACTH insufficiency. *Clinical Endocrinology* 62:307-314.

Ulmann, M.C., Siegel, S.F., Hirsch, W.L., Finegold, D.N., Foley, T.P. (1993) Pituitary stalk and ectopic hyperintense T1 signal on magnetic resonance imaging: implications for anterior pituitary dysfunction. *American Journal of Diseases of Children* 147:647-652.

Léger, L., Danner, S., Simon, D., Gareil, C., Czernichow, P. (2005) Do all patients with childhood-onset growth hormone deficiency (GHD) and ectopic neurohypophysis have persistent GHD in adulthood? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:650-656.

Gareil, C., Léger, L. (2007) Contribution of magnetic resonance imaging in non-tumoral hypopituitarism in children. *Hormone Research* 67:194-202.

Mitchell, L.A., Thomas, P.Q., Zacharin, M.R., Scheffer, I.E. (2002) Ectopic posterior pituitary lobe and periventricular heterotopia: Cerebral malformations with the same underlying mechanism? *ANJR. American Journal of Neuroradiology* 23:1475-1481.

## Resumo do Artigo 2

**Título:** Análise de Mutações nos Genes HESX1, LHX4 e OTX2 em 104 Pacientes com Ectopia do Lobo Posterior Hipofisário

Esse estudo avaliou a presença de mutações em três genes codificadores de fatores transcricionais (HESX1, LHX4 e OTX2) em 104 (74 do sexo masculino) dos 130 pacientes da coorte de pacientes com NH ectópica e DGH, descrita no artigo 1. A escolha dos referidos genes baseou-se no fato de que mutações nos mesmos, além de no SOX3, já foram identificadas em número restrito de portadores de ELP. As mutações foram estudadas pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e polimorfismo conformacional de fita simples (*Single Strand Conformation Polymorphism* - SSCP) ou PCR seguida de sequenciamento. Mutações foram identificadas no éxon 3 do HESX1 e no éxon 6 do LHX4, em cinco e vinte e seis pacientes, respectivamente. Essas mutações não foram descritas previamente e serão investigadas em indivíduos normais para avaliar se estão associadas à ELP.

## Análise de Mutações nos Genes HESX1, LHX4 e OTX2 em 104 Pacientes Com Ectopia do Lobo Posterior Hipofisário

Couto-Silva, A.C.<sup>1,2,3</sup>, Rego, F. F. A.<sup>1</sup>, Oliveira, T.L.<sup>1</sup>, Adan, L.<sup>3,4</sup>, Bomfim, C.<sup>5</sup>, Alves, C.<sup>4</sup>, Bittencourt, A.V.<sup>4</sup>, Acosta, A.X.<sup>1,4</sup>

1- Laboratório Avançado de Saúde Pública/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, 2- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), 3- Centro de Diabetes e Endocrinologia do Estado da Bahia (CEDEBA), 4- Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (UFBA), 5- Hospital Aristides Maltez

### **Resumo**

**Introdução:** mutações em genes codificadores de fatores de transcrição têm sido descritas em pacientes apresentando ectopia do lobo posterior da hipófise (ELP) na ressonância nuclear magnética de hipófise (RNMH) e deficiência de hormônio do crescimento isolada (DGHI) ou associada a outras deficiências hormonais (DHHC).

**Objetivo:** pesquisar mutações nos genes codificadores de fatores transcricionais HESX1, LHX4 e OTX2 em pacientes com ELP.

**Material e Métodos:** utilizadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e polimorfismo conformacional de fita simples (*Single Strand Conformation Polymorphism* - SSCP) ou PCR seguida de sequenciamento, para investigação de mutações em pacientes com ELP e DGHI ou DHHC acompanhados em um mesmo centro de referência no período de onze anos.

**Resultados:** estudados 104 pacientes (74 do sexo masculino), 75 (72,1%) com DHHC. ELP foi descrita em 103 pacientes, não sendo a neuro-hipófise (NH) visualizada em um paciente. Mutação em heterozigose no éxon 3 do HESX1 (18A>G) foi descrita em cinco pacientes e mutação (205A>G) no éxon 6 do LHX4 foi descrita em 26 pacientes, estando em heterozigose em 19 deles. Essas mutações não foram previamente descritas.

**Conclusão:** foram identificadas mutações novas em 31 pacientes com ELP. Estudo posterior, avaliando indivíduos normais avaliará se essas mutações estão associadas à ELP.

**Descritores:** neuro-hipófise, ectópica, deficiência de hormônio do crescimento, OTX2, LHX4, HESX1, mutação.

## **Introdução**

A glândula hipofisária madura em humanos é formada pelos lobos anterior e posterior, cujas origens embriológicas são distintas (Sheng & Westphal, 1999). O lobo anterior deriva da bolsa de Rathke, uma invaginação do ectoderma oral e é constituído de cinco tipos celulares distintos, responsáveis pela produção de hormônio do crescimento (GH), hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio estimulador da tireoide (TSH) e prolactina. A neuro-hipófise (NH) deriva do neuroectoderma e é responsável pela secreção de ocitocina e vasopressina (Ikeda *et al.*, 1988; Kelberman & Dattani, 2006; Alatzoglou & Dattani, 2009). Uma cascata de fatores transcricionais (Hesx1, Pitx1, Pitx2, Lhx3, Lhx4, Prop1 e POU1F1) e moléculas sinalizadoras (Bmp2, Bmp4, Fgf8, Fgf4, Nkx2.1, Wn5 $\alpha$ , Wnt4, Shh) é requerida para a embriogênese hipofisária (Treier & Rosenfeld, 1996; Sheng *et al.*, 1996; Takuma *et al.*, 1998; Sheng & Westphal, 1999; Mullen *et al.*, 2007).

Alterações no desenvolvimento hipofisário podem levar à deficiência isolada de GH (DGHI) ou deficiência hormonal hipofisária combinada (DHHC). Em 1987, foi descrita, em pacientes com hipopituitarismo, a síndrome de interrupção de haste hipofisária (Fusijawa *et al.*, 1987), constituída de três elementos à RNMH: adeno-hipófise (AH) hipoplásica, haste hipofisária ausente ou interrompida e ectopia do lobo posterior hipofisário (ELP), sendo este último considerado marcador de DGH permanente (Ulmann *et al.*, 1993; Maghnie *et al.*, 1996; Genovese *et al.*, 1997; Léger *et al.*, 2005). Mutações nos genes HESX1 (Dattani *et al.*, 1998; Brickman *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2003; Tajima *et al.*, 2003; McNay *et al.*, 2007; Corneli *et al.*, 2008), LHX4 (Machinis *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2007; Castinetti *et al.*, 2008; Pfaeffle *et al.*, 2008; Dateki *et al.*, 2010; Tajima *et al.*, 2010), SOX3 (Woods *et al.*, 2005) e, mais recentemente, OTX2 (Diaczoc *et al.*, 2008; Tajima *et al.*, 2009; Ashkenazi-Hoffnung *et al.*, 2010; Dateki *et al.*, 2010) já foram identificadas em alguns pacientes com ELP.

A baixa prevalência de mutações nessa população, associada à heterogeneidade fenotípica dos pacientes com a mesma mutação, sugerem que outros fatores estão relacionados à gênese da ELP (Reynaud *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2007; Dateki *et al.*, 2010). O objetivo desse estudo foi investigar a presença de mutações nos genes HESX1, LHX4 e OTX2 em uma coorte de pacientes com ELP e DGH, acompanhada num mesmo centro de referência do estado da Bahia.

## **Material e Métodos**

### *Pacientes*

Estudados 104 pacientes (74 do sexo masculino) de uma coorte de 130 pacientes com diagnóstico de DGH e ELP acompanhados num serviço público de referência (CEDEBA), no estado da Bahia, Brasil, num período de 11 anos (1998 a 2009). O DNA não foi obtido de 26 pacientes, que foram excluídos do estudo. Uma paciente, cuja NH não foi visualizada, foi mantida no estudo e outra paciente com ELP e história de traumatismo crânio-encefálico após acidente automobilístico foi excluída. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do CEDEBA e da FIOCRUZ e a inclusão no mesmo foi feita pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes ou seus responsáveis.

### *Avaliação Laboratorial*

O GH foi mensurado antes e 60 e 90 minutos após estimulação com clonidina (0,15 mg/m<sup>2</sup>) ou L-DOPA (10 mg/kg); ou antes e 20, 45, 60, 75 e 90 minutos após a estimulação com insulina (0,1 UI/kg). Pico de GH foi considerado diminuído quando inferior a 7 ng/ml. Para avaliação do restante da função hipofisária foram realizadas dosagens basais de T4 livre, TSH e prolactina, além de cortisol basal ou após estímulo com insulina ou ACTH. Deficiência de ACTH foi diagnosticada com níveis de cortisol basal inferiores a 5 µg/dl ou 19,8 µg/dl, nos casos onde o teste de estímulo foi realizado. Em pacientes com níveis basais de cortisol entre 5 e 6,4 µg/dl a deficiência de ACTH foi considerada possível e níveis de cortisol acima de 6,4 µg/dl foram considerados normais. Dosagens de FSH, LH, testosterona e estradiol foram realizadas nos pacientes em idade puberal. Deficiência de hormônio antidiurético (ADH) foi diagnosticada na presença de osmolaridade urinária diminuída e diurese superior a 3 litros/24 horas em adolescentes e adultos e superior a 2 l/m<sup>2</sup> de superfície corporal em crianças.



### *Ressonância Nuclear Magnética de Hipófise (RNMH)*

Foram obtidas imagens à RNMH em cortes finos de 3 mm de espessura nos planos sagital e coronal. A haste hipofisária foi definida como normal, ausente ou afilada após administração de gadolínio. A altura máxima da hipófise foi calculada através da medida perpendicular da maior distância entre a base e o topo da glândula. Considerou-se hipoplasia hipofisária quando a altura da glândula para a idade foi menor que - 2 DP quando comparada com os controles normais descritos na literatura (Argyropoulou *et al.*, 1991). Malformações cerebrais associadas foram também observadas. Todos os exames foram revisados pelo mesmo neurorradiologista pediátrico.

### *Estudo Molecular*

#### Extração de DNA

O DNA foi extraído de 5 ml de sangue periférico pelo método de Lahiri & Nurnberger (1991) e foi armazenado a -20°C.

#### Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) e Polimorfismo conformacional de fita simples (*Single Strand Conformation Polymorphism - SSCP*)

Todos os éxons e limites éxon-intron do HESX1, LHX4 e OTX2 foram amplificados por PCR utilizando-se *primers* previamente descritos (Dattani *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 2007; Ragge *et al.*, 2005). O éxon 6 do LHX4 foi analisado por sequenciamento direto. Para os demais éxons de todos os genes, uma vez constatada a amplificação dos produtos de PCR em gel de agarose a 2%, a triagem mutacional foi realizada pela técnica de SSCP. Aproximadamente 10 µl de cada produto de PCR foram misturados a um tampão de corrida (5µl de formamida a 98% e 5µl de xilenocianol a 0,05%). As amostras foram desnaturadas a 94°C durante 6 minutos, mantidas no gelo e aplicadas em géis de acrilamida, que foram submetidos à eletroforese a 50 volts por 12 a 16 horas. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata em três etapas, de acordo com protocolo adaptado de Sanguinetti *et al.* (1994).

#### Sequenciamento

Os fragmentos com migração anormal ou aqueles que não foram adequadamente visualizados no gel foram sequenciados utilizando o *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems), em ambas as direções (*forward* e *reverse*). A análise das

alterações foi feita com base nas sequências de referência (HESX1: *NG\_008242*, LHX4: *NG\_008081* e OTX2: *NC\_000014*) do banco de dados de sequências gênicas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) disponível *online*. Os eletroferogramas obtidos foram analisados pelo programa *ABI Analysis Data Collection* e as sequências foram analisadas pelo *software* “Sequencher versão 3.1”.

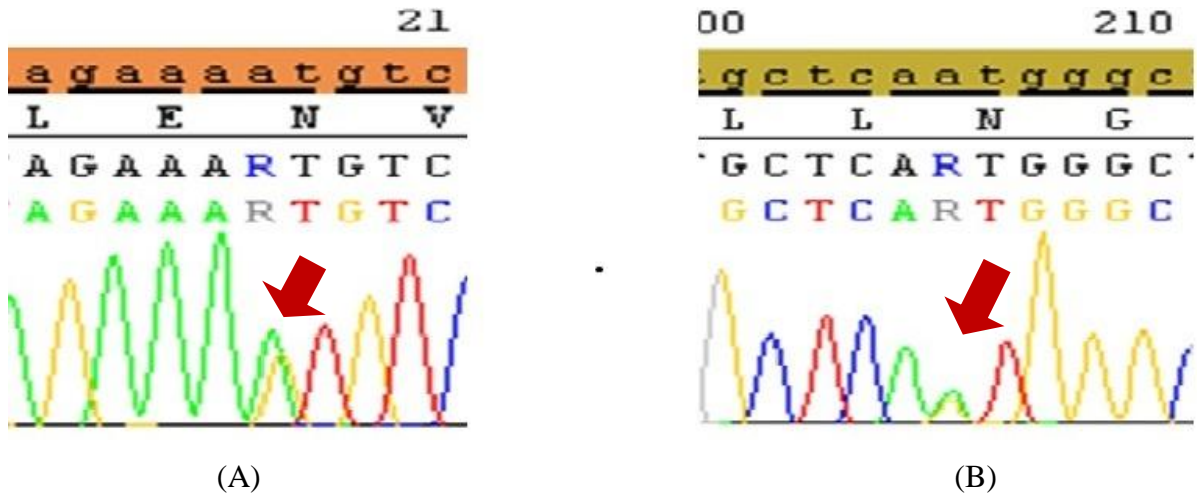
## **Resultados**

### *Características Clínicas, Laboratoriais e Radiológicas dos Pacientes*

A idade média ao diagnóstico de DGH foi  $12,3 \pm 5,6$  (2,7 - 27,0) anos. Parto vaginal e cesáreo foram descritos em 74 (73,3%) e 27 (26,7%) pacientes, respectivamente, não sendo a informação obtida em três pacientes. Apresentação pélvica ocorreu em 27 pacientes (36,5%) cujo parto foi vaginal. História de consanguinidade estava presente em 12 dos 101 pacientes (11,9%) nos quais esta informação pôde ser obtida. Alterações do exame físico foram descritas em 19 pacientes (18,7%): anoftalmia direita (n=1), criptorquidia (n=7), micropênis (n=8), lábio leporino (n=1), estrabismo (n=4) e pé torto congênito (n=2). O pico de GH estava diminuído em 93 (96,9%) dos 96 pacientes nos quais o teste de estímulo foi realizado e normal nos demais (3,1%). Vinte e nove pacientes (27,8%) apresentavam DGHI e 75 pacientes (72,1%) tinham várias combinações de deficiências hormonais. A NH estava ectópica em 103 pacientes e não foi visualizada em um. A haste hipofisária estava ausente em 72 indivíduos (69,2%), sendo visível nos demais. Malformações do sistema nervoso central (SNC), isoladas ou combinadas, foram observadas em onze pacientes (10,6%) colpocefalia (n=3), gliose e desmielinização (n=2), agenesia do corpo caloso (n=2), hipoplasia do corpo caloso (n=2), agenesia do septo pelúcido (n=1), angioma venoso (n=1), leucomalácia ventricular (n=1), ausência da artéria cerebral média (n=1) e malformação de Chiari tipo 1 (n=1).

### *Análise Molecular*

HESX1: cinco pacientes apresentaram transição em heterozigose no éxon 3 - 18A>G (Figura 1A). LHX4: vinte e seis pacientes apresentaram transição no éxon 6 - 205A>G, estando em heterozigose em dezenove deles (Figura 1B). OTX2: nenhuma mutação foi encontrada nos pacientes estudados.



**Figura 1:** (A) Transição de A para G no nucleotídeo 18 do éxon 3 do HESX1. (B) Transição de A para G no nucleotídeo 205 do éxon 6 do LHX4.

Ambas as mutações levam à substituição de uma base por outra da mesma categoria. Há troca de asparagina para serina, ambas da mesma família de aminoácidos. Essas mutações não foram descritas previamente.

Os fenótipos clínico, hormonal e radiológico dos pacientes com mutações estão descritos nas Tabelas 1 a 3.

**Tabela 1.** Características clínicas, hormonais e radiológicas dos 19 pacientes com mutações em heterozigose no éxon 6 do LHX4

S	ID	CON	AP	PRL	DTSH	DACTH	DGnRH	AH	NH	HASTE	AO
1	F	6,3	Não	Pélvica	Normal	Não	Não	NA	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
2	F	20,7	Não	Cefálica	Normal	Sim	Sim	Sim	Ausente	Ectópica	Ausente
3	F	24	Não	Pélvica	NR	Não	Não	Não	Hipoplástica	Ectópica	Visível
4	F	24	Não	Cefálica	Elevada	Sim	Sim	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
5	F	19,7	Não	Cefálica	Normal	Sim	Provável	Parcial	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
6	F	25,1	Não	Cefálica	Normal	Sim	Não	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
7	F	5,2	Não	Cefálica	Normal	Sim	Sim	NA	Hipoplástica	Ectópica	Visível RNMH: CC ausente/Dilatação dos ventrículos supra- tentoriais/Colpocefalia
8	F	16,2	Não	Cefálica	Normal	Sim	Sim	RP	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
9	M	16,6	Sim	Cefálica	Normal	Não	Não	Não	Hipoplástica	Ectópica	Visível RNMH: Dilatação do sistema ventricular/ Anoftalmia direita
10	M	18,3	Não	Cefálica	Normal	Não	Não	Não	Hipoplástica	Ectópica	Visível
11	M	11,1	Não	Cefálica	Normal	Não	Não	NA	Hipoplástica	Ectópica	Visível
12	M	14,6	Não	Cefálica	Normal	Não	Não	Não	Hipoplástica	Ectópica	Visível
13	M	17,4	Sim	Cefálica	NR	Não	Não	Não	Hipoplástica	Ectópica	Visível
14	M	28,3	Não	Pélvica	Normal	Sim	Sim	Sim	Ausente	Ectópica	Ausente Micropênis
15	M	22,4	ND	Pélvica	Elevada	Sim	Sim	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
16	M	26,3	Não	Pélvica	Normal	Sim	Sim	Parcial	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
17	M	17,1	Não	Cefálica	Normal	Sim	Sim	RP	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
18	M	22,4	Não	Pélvica	Normal	Sim	Sim	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente
19	M	21,5	ND	Cefálica	Normal	Sim	Sim	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente

S, sexo; ID, idade (em anos) na última consulta; CON, consanguinidade; AP, apresentação no parto; PRL, prolactina; DTSH, deficiência de TSH; DACTH, deficiência de ACTH; AH, adeno-hipófise; NH, neuro-hipófise; AO, alterações associadas; NR, não realizada; ND, não disponível; RP, retardo puberal; CC, corpo caloso; RNMH, ressonância nuclear magnética de hipófise; NA, não se aplica.

**Tabela 2.** Características clínicas, hormonais e radiológicas dos sete pacientes com mutações em homozigose no éxon 6 do LHX4

S	ID	Con.	AP	PRL	DTSH	DACTH	DGnRH	AH	NH	HASTE	AO	
1	M	16,2	Sim	Cefálica	Normal	Não	Não	RP	Hipoplástica	Ectópica	Ausente	
2	M	9,4	Não	Cefálica	Normal	Não	Não	NA	Hipoplástica	Ectópica	Ausente	Pé torto congênito e luxação congênita do quadril
3	M	24,4	Não	Cefálica	Normal	Sim	Não	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Visível	
4	M	14,5	Não	Cefálica	Normal	Sim	Sim	RP	Hipoplástica	Ectópica/Tópica	Ausente	Micropênis
5	M	18,3	Não	Cefálica	Normal	Não	Não	Não	Normal	Ectópica	Ausente	
6	M	13	Sim	Cefálica	Normal	Sim	Sim	NA	Hipoplástica	Ectópica	Visível	Micropênis/Criptorquidia
7	M	20,8	Não	Cefálica	Normal	Sim	Sim	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente	Micropênis/Criptorquidia

S, sexo; ID, idade (em anos) na última consulta; CON, consanguinidade; AP, apresentação no parto; PRL, prolactina; DTSH, deficiência de TSH; DACTH, deficiência de ACTH; AH, adeno-hipófise; NH, neuro-hipófise; AO, alterações associadas; RP, retardo puberal; NA, não se aplica.

**Tabela 3.** Características clínicas, hormonais e radiológicas dos cinco pacientes com mutações em heterozigose no éxon 3 do HESX1

S	ID	CON	AP	PRL	DTSH	DACTH	DGnRH	AH	NH	HASTE	AO	
1	F	8,1	Não	Cefálica	Normal	Não	Não	NA	Hipoplástica	Ectópica	Ausente	
2	F	25,1	Não	Cefálica	Normal	Sim	Não	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente	
3	M	18,9	Não	Pélvica	Normal	Sim	Sim	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente	RNMH: Gliose/Desmielinização
4	M	14,6	Não	Cefálica	Normal	Sim	Sim	RP	Hipoplástica	Ectópica	Ausente	Criptorquidia
5	M	31,6	Sim	Cefálica	Normal	Não	Não	Sim	Hipoplástica	Ectópica	Ausente	

S, sexo; ID, idade (em anos) na última consulta; CON, consanguinidade; AP, apresentação no parto; PRL, prolactina; DTSH, deficiência de TSH; DACTH, deficiência de ACTH; AH, adeno-hipófise; NH, neuro-hipófise; AO, alterações associadas; RP, retardo puberal; RNMH, ressonância nuclear magnética de hipófise; NA, não se aplica.

## Discussão

No presente estudo, foi relatado o resultado da triagem mutacional em genes codificadores de fatores transcricionais em coorte de pacientes, não aparentados, portadores de ELP associada à DGHI ou DHHC. Até o momento, a ELP só esteve associada a mutações nos genes HESX1 (Dattani *et al.*, 1998; Brickman *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2003; Tajima *et al.*, 2003; McNay *et al.*, 2007; Corneli *et al.*, 2008), LHX4 (Machinis *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2007; Castinetti *et al.*, 2008; Pfaeffle *et al.*, 2008; Dateki *et al.*, 2010; Tajima *et al.*, 2010), SOX3 (Woods *et al.*, 2005) e OTX2 (Diaczoc *et al.*, 2008; Tajima *et al.*, 2009; Ashkenazi-Hoffnung *et al.*, 2010; Dateki *et al.*, 2010), sendo a prevalência dessas mutações muito baixa (Reynaud *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2007; Dateki *et al.*, 2010). Na maioria dos estudos, as populações avaliadas eram heterogêneas, uma vez que se utilizava a DHHC, associada ou não a malformações da região hipotálamo-hipofisária, como critério para investigação mutacional. Melo *et al.* (2007), avaliando 62 pacientes com ELP, não identificaram mutações causadoras de doença no LHX4 e HESX1.

O conhecimento dos fatores transcricionais ligados à embriogênese hipofisária, associado à identificação de alterações morfológicas à RNMH, levou à investigação de mutações que pudessem justificar as alterações fenotípicas apresentadas pelos pacientes. Mutações no HESX1, fator repressor transcricional, envolvido nas primeiras etapas do desenvolvimento hipofisário e cujo desaparecimento é necessário para a expressão do PROP-1, foram inicialmente descritas em pacientes com displasia do septo ótico (DSO) (Dattani *et al.*, 1998; Dattani & Robinson, 2002), patologia caracterizada pela presença de duas das seguintes alterações: atrofia do nervo ótico, malformações da linha média e hipoplasia hipofisária. Mutação nesse gene foi a primeira descrita em pacientes com ELP (Dattani *et al.*, 1998). O fenótipo radiológico dos pacientes com mutação no HESX1 é muito heterogêneo, incluindo agenesia do corpo caloso, hipoplasia do nervo ótico, AH normal ou hipoplásica (Dattani, 2005; Sobrier *et al.*, 2005; Sobrier *et al.*, 2006). O perfil hormonal desses pacientes varia de DGHI a pan-hipopituitarismo (Dattani & Robinson, 2002; Dattani, 2005). A mutação encontrada no presente trabalho, não descrita previamente, será investigada em indivíduos sem ELP e nos pais dos pacientes afetados, para avaliar sua associação com a patologia.

Mutações no LHX4, não identificadas previamente, foram descritas em 26 pacientes. Similar ao descrito em trabalhos anteriores (Machinis *et al.*, 2001; Reynaud *et al.*, 2006; Tajima *et al.*, 2007; Castinetti *et al.*, 2008; Pfaeffle *et al.*, 2008; Dateki *et al.*, 2010; Tajima *et al.*, 2010), foi observada grande variação fenotípica nos portadores da mesma mutação.

Estudo da mutação, descrita no presente estudo, em indivíduos normais irá avaliar a associação da mesma com a ELP.

Como observado por outros autores, houve predominância de pacientes do sexo masculino. Embora não avaliadas no estudo, alterações do SOX3, na presença de ELP, devem ser consideradas no sexo masculino, uma vez que, apesar da prevalência não ter sido definida, essas alterações já foram associadas à ELP (Woods *et al.*, 2005).

Mutações no OTX2, não identificadas nessa coorte, mesmo no paciente com anoftalmia direita, também estão relacionadas a fenótipos diversos. Curiosamente, o referido paciente apresentou mutação no LHX4. Inicialmente as mutações do OTX2 foram associadas a grande espectro de malformações oculares (Ragge *et al.*, 2005; Wyatt *et al.*, 2008), manifestações consideradas obrigatórias para justificar a investigação de mutações nesse gene. Posteriormente, mutações foram descritas em pacientes com alterações da região hipotálamo-hipofisária, com ou sem achados oculares, que apresentavam DGHI ou DHHC (Diaczoc *et al.*, 2008; Ashkenazi-Hoffnung *et al.*, 2010; Tajima *et al.*, 2009; Dateki *et al.*, 2010). O fenótipo hipofisário é variável e independe da função *in vitro* da mutação. Esse achado estaria ligado à noção de que a haploinsuficiência de genes ligados ao desenvolvimento está associada à penetrância e à expressividade variáveis, na dependência de outros fatores genéticos e ambientais (Fisher & Scambler, 1994). O GH é o hormônio hipofisário mais vulnerável nos portadores de mutações no OTX2. A baixa estatura observada em pacientes com anomalias oculares e mutações do OTX2 corrobora esse dado e indica que DGH deve ser sistematicamente avaliada nesses pacientes.

Mutações nos genes envolvidos na embriogênese hipofisária têm em comum a diversidade fenotípica. As características clínicas, laboratoriais e radiológicas de pacientes com mutações no mesmo gene e até da mesma mutação são variáveis. Essas diferenças fenotípicas podem estar relacionadas à forma de investigação utilizada em cada estudo, sobretudo no que concerne à avaliação das deficiências hormonais nos pacientes afetados.

Quanto à baixa frequência de mutações encontrada nos pacientes com ELP, algumas possibilidades devem ser questionadas. A estratégia de investigação molecular utilizada na maioria dos estudos não teria permitido a identificação de deleções e duplicações nos genes conhecidos até o momento e a avaliação apenas dos éxons teria falhado em identificar mutações patológicas nas regiões não codificantes. Outra hipótese seria a existência de outros genes e moléculas sinalizadoras envolvidos na embriogênese hipofisária que, até o momento, não teriam sido identificados.

O avanço no conhecimento dos genes ligados à formação da hipófise, associado à avaliação molecular de casuísticas homogêneas e fenotipicamente bem caracterizadas de pacientes com ELP, poderá contribuir para o conhecimento mais aprofundado da fisiopatologia da doença. Dessa forma, será possível definir algoritmo para pesquisa mutacional.

### **Referências Bibliográficas**

Sheng, H.Z., Westphal, H. (1999) Early steps in pituitary organogenesis. *Trends in genetics: Tig* 15:236-40.

Ikeda, H., Suzuki, J., Sasano, N., Niizuma, H. (1988) The development and morphogenesis of the human pituitary gland. *Anatomy and Embryology* 178:327-336.

Kelberman, D., Dattani, M.T. (2006) The role of transcription factors implicated in anterior pituitary development in the aetiology of congenital hypopituitarism. *Annals of Medicine* 38:560-777.

Alatzoglou, K.S., Dattani, M.T. (2009) Genetic forms of hypopituitarism and their manifestation in the neonatal period. *Early Human Development* 85:705-712.

Treier, M., Rosenfeld, M.G. (1996) The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Current Opinion in Cell Biology* 8:833-843.

Sheng, H.Z., Zhadanov, A.B., Mosinger, B. Jr., Fujii, T., Bertuzzi, S., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., Mahon, K.A., Westphal, H. (1996) Specification of pituitary cell lineages by the Lim homeobox gene Lhx3. *Science* 272:1004-1007.

Takuma, N., Sheng, H.Z., Furuta, Y., Ward, J.M., Sharma, K., Hogan, B.L., Pfaff, S.L., Westphal, H., Kimura, S., Mahon, K.A. (1998) Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 125:4835-4840.

Mullen, R.D., Colvin, S.C., Hunter, C.S., Savage, J.J., Walvoord, E.C., Bhangoo, A.P., Ten, S., Weigel, J., Pfäffle, R.W., Rhodes, S.J. (2007) Roles of the LHX3 and LHX4 LIM-homeodomain factors in pituitary development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 265-266:190-195.

Fujisawa, I., Kikuchi, K., Nishimura, K., Togashi, K., Itoh, K., Noma, S., Minami, S., Sagoh, T., Hiraoka, T., Momoi, T., Mikawa, H., Nakano, Y., Itoh, H., Konishi, J. (1987) Transection of the pituitary stalk: development of an ectopic posterior lobe assessed with MR imaging. *Radiology* 165:487-489.

Ultmann, M.C., Siegel, S.F., Hirsch, W.L., Finegold, D.N., Foley, T.P. (1993) Pituitary stalk and ectopic hyperintense T1 signal on magnetic resonance imaging: implications for anterior pituitary dysfunction. *American Journal of Diseases of Children* 147:647-652.



Maghnie, M., Genovese, E., Villa, A., Spagnolo, L., Campani, R., Severi, F. (1996) Dynamic MRI in the congenital agenesis of the neural pituitary stalk syndrome: the role of the vascular pituitary stalk in predicting residual anterior pituitary function. *Clinical Endocrinology* 45:281-290.

Genovese, E., Maghnie, M., Beluffi, G., Villa, A., Sammarchi, L., Severi, F., Campani, R. (1997) Hypothalamic-pituitary vascularization in pituitary stalk transection syndrome: is the pituitary stalk really transected? The role of gadolinium-DTPA with spin-echo T1 imaging and turbo-FLASH technique. *Pediatric Radiology* 27:48-53.

Léger, L., 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? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:650-656.

Dattani, M.T., Martinez-Barbera, J.P., Thomas, P.Q., Brickman, J.M., Gupta, R., Mårtensson, I.L., Toresson, H., Fox, M., Wales, J.K., Hindmarsh, P.C., Krauss, S., Beddington, R.S., Robinson, I.C. (1998) Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septooptic dysplasia in human and mouse. *Nature Genetics* 19:125-133.

Brickman, J.M., Clements, M., Tyrell, R., McNay, D., Woods, K., Warner, J., Stewart, A., Beddington, R.S., Dattani, M. (2001) Molecular effects of novel mutations in HESX1/Hesx1 associated with human pituitary disorders. *Development* 128:5189-5199.

Thomas, P.Q., Dattani, M.T., Brickman, J.M., McNay, D., Warne, G., Zacharin, M., Cameron, F., Hurst, J., Woods, K., Dunger, D., Stanhope, R., Forrest, S., Robinson, I.C., Beddington, R.S. (2001) Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. *Human Molecular Genetics* 10:39-45.

Carvalho, L.R., Woods, K.S., Mendonça, B.B., Marcal, N., Zamparini, A.L., Stifani, S., Brickman, J.M., Arnhold, I.J.P., Dattani, M.T. (2003) A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. *The Journal of Clinical Investigation* 112:1192-1201.

Cohen, R.N., Cohen, L.E., Botero, D., Yu, C., Sagar, A., Jurkiewicz, M., Radovick, S. (2003) Enhanced repression by HESX1 as a cause of hypopituitarism and septooptic dysplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88:4832-4839.

Tajima, T., Hattori, T., Nakajima, T., Okuhara, K., Sato, K., Abe, N.S., Nakae, J., Fujieda, K. (2003) Sporadic heterozygous frameshift mutation in HESX1 causing sporadic pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88:45-50.

McNay, D.E., Turton, J.P., Kelberman, D., Woods, K.S., Brauner, R., Papadimitriou, A., Keller, E., Keller, A., Haufs, N., Krude, H., Shalet, S.M., Dattani, M.T. (2007) HESX1 mutations are an uncommon cause of septooptic dysplasia and hypopituitarism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92:691-697.

Corneli, G., Vivenza, D., Prodam, F., Di Dio, G., Vottero, A., Rapa, A., Bellone, S., Bernasconi, S., Bona, G. (2008) Heterozygous mutation in HESX1 causing hypopituitarism and multiple anatomical malformations without features of septo-optic dysplasia. *The Journal of Clinical Investigation* 31:689-693.

Machinis, K., Pantel, J., Netchine, I., Léger, J., Camand, O.J., Sobrier, M.L., Dastot-Le Moal, F., Duquesnoy, P., Abitbol, M., Czernichow, P., Amselem, S. (2001) Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *American Journal of Human Genetics* 69:961-968.

Tajima, T., Hattori, T., Nakajima, T., Okuhara, K., Tsubaki, J., Fujieda, K. (2007) A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica. *Endocrine Journal* 54:637-641.

Castinetti, F., Saveanu, A., Reynaud, R., Quentien, M.H., Buffin, A., Brauner, R., Kaffel, N., Albarel, F., Guedj, A.M., El Kholy, M., Amin, M., Enjalbert, A., Barlier, A., Brue, T. (2008) A novel dysfunctional LHX4 mutation with high phenotypical variability in patients with hypopituitarism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93:2790-2799.

Pfaeffle, R.W., Hunter, C.S., Savage, J.J., Duran-Prado, M., Mullen, R.D., Neeb, Z.P., Eiholzer, U., Hesse, V., Haddad, N.G., Stobbe, H.M., Blum, W.F., Weigel, J.F., Rhodes, S.J. (2008) Three novel missense mutations within the LHX4 gene are associated with variable pituitary hormone deficiencies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93:1062-1071.

Dateki, S., Fukami, M., Uematsu, A., Kaji, M., Isso, M., Ono, M., Mizota, M., Yokoya, S., Motomura, K., Kinoshita, E., Moriuchi, H., Ogata, T. (2010) Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with LHX4 deletion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95:4043-4047.

Tajima, T., Yorifuji, T., Ishizu, K., Fujieda, K. (2010) A novel mutation (V101A) of the LHX4 gene in a Japanese patient with combined pituitary hormone deficiency. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 118:405-409.

Woods, K.S., Cundall, M., Turton, J., Rizzoti, K., Mehta, A., Palmer, R., Wong, J., Chong, W.K., Al-Zyoud, M., El-Ali, M., Otonkoski, T., Martinez-Barbera, J.P., Thomas, P.Q., Robinson, I.C., Lovell-Badge, R., Woodward, K.J., Dattani, M.T. (2005) Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *American Journal of Human Genetics* 76:833-849.

Diaczok, D., Romero, C., Zunich, J., Marshall, I., Radovick, S. (2008) A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93:4351-4359.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94:314-319.

Ashkenazi-Hoffnung, L., Lebenthal, Y., Wyatt, A.W., Ragge, N.K., Dateki, S., Fukami, M., Ogata, T., Phillip, M., Gat-Yablonski, G. (2010) A novel loss-of-function mutation in OTX2 in a patient with anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. *Human Genetics* 127:721-729.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95:756-764.

Reynaud, R., Gueydan, M., Saveanu, A., Vallette-Kasic, S., Enjalbert, A., Brue, T., Barlier, A. (2006) Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: experience in 195 patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91:3329-3336.

Melo, M.E., Marui, S., Carvalho, L.R., Arnhold, I.J., Leite, C.C., Mendonça, B.B., Knoepfelmacher, M. (2007) Hormonal, pituitary magnetic resonance, LHX4 and HESX1 evaluation in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe. *Clinical Endocrinology* 66:95-102.

Argyropoulou, M., Perignon, F., Brauner, R., Rappaport, R. (1991) Height of normal pituitary gland as a function of age evaluated by magnetic resonance imaging in children. *Pediatric Radiology* 21:247-249.

Lahiri, D.K., Nurnberger, J.I. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP Studies. *Nucleic Acids Research* 19:5444.

Ragge, N.K., Brown, A.G., Poloschek, C.M., Lorenz, B., Henderson, R.A., Clarke, M.P., Russell-Eggitt, I., Fielder, A., Gerrelli, D., Martinez-Barbera, J.P., Ruddle, P., Hurst, J., Collin, Jr., Salt, A., Cooper, S.T., Thompson, P.J., Sisodiya, S.M., Williamson, K.A., Fitzpatrick, D.R., Van Heyningen, V., Hanson, I.M. (2005) Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *American Journal of Human Genetics* 76:1008-1022.

Sanguinetti, C.J, Dias Neto, E., Simpson, .A.J. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:914-921.

Dattani, M.T., Robinson, I.C. (2002) HESX1 and septo-optic dysplasia. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 3:289-300.

Dattani, M.T. (2005) Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? *Clinical Endocrinology* 63:121-130.

Sobrier, M.L., Netchine, I., Heinrichs, C., Thibaud, N., Vié-Luton, M.P., Van Vliet, G., Amselem, S. (2005) Alu-element insertion in the homeodomain of HESX1 and aplasia of the anterior pituitary. *Human Mutation* 25:503.

Sobrier, M.L., Maghnie, M., Vié-Luton, M.P., Secco, A., Di Iorgi, N., Lorini, R., Amselem, S. (2006) Novel HESX1 mutations associated with a life-threatening neonatal phenotype, pituitary aplasia, but normally located posterior pituitary and no optic nerve abnormalities. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91:4528-4536.

Wyatt, A., Bakrania, P., Bunyan, D.J., Osborne, R.J., Crolla, J.A., Salt, A., Ayuso, C., Newbury-Ecob, R., Abou-Rayyah, Y., Collin, J.R., Robinson, D., Ragge, N. (2008) Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma. *Human Mutation* 29:E278-E283.

Fisher, E., Scambler, P. (1994) Human haploinsufficiency - one for sorrow, two for joy. *Nature Genetics* 7:5-7.

### Resumo do Artigo 3

**Título:** Avaliação da Resposta no Primeiro ano de Tratamento com Hormônio do Crescimento em Portadores de Deficiência de GH com e sem Ectopia do Lobo Posterior Hipofisário

Trata-se de um estudo longitudinal retrospectivo que comparou a resposta no primeiro ano de tratamento com hormônio do crescimento (GH) nos portadores de DGH com (n=58) e sem ectopia (n=26) do lobo posterior hipofisário. O objetivo foi avaliar a resposta após um ano de terapia com GH em pacientes com e sem ectopia do lobo posterior hipofisário (ELP). Observou-se que os parâmetros antropométricos pré-tratamento não diferiram nos dois grupos e que a aceleração estatural após o uso de GH foi similar entre eles, dados divergentes de estudos prévios.

## **Avaliação da Resposta no Primeiro ano de Tratamento com Hormônio do Crescimento em Portadores de Deficiência de GH com e sem Ectopia do Lobo Posterior Hipofisário**

Couto-Silva, A.C.<sup>1,2,3</sup>, Adan, L.<sup>3,4</sup>, Bomfim, C.<sup>5</sup>, Alves, C.<sup>4</sup>, Acosta, A.X.<sup>1,4</sup>

1- Laboratório Avançado de Saúde Pública/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, 2- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), 3- Centro de Diabetes e Endocrinologia do Estado da Bahia (CEDEBA), 4- Faculdade de Medicina da Bahia (UFBA), 5- Hospital Aristides Maltez

### **Resumo**

**Introdução:** estudos prévios demonstraram que portadores de deficiência de hormônio do crescimento (DGH) não adquirida, com alterações anatômicas à ressonância nuclear magnética de hipófise (RNMH), tinham maior ganho estatural sob tratamento que aqueles sem alterações radiológicas.

**Objetivo:** comparar a resposta terapêutica após um ano de uso de GH em portadores de DGH com e sem ectopia do lobo posterior hipofisário (ELP).

**Material e Métodos:** estudo longitudinal retrospectivo de pacientes com DGH não adquirida acompanhados no Centro de Diabetes e Endocrinologia do Estado da Bahia entre 1998 e 2009.

**Resultados:** avaliados 84 pacientes (64 do sexo masculino), cinquenta e oito com ELP (Grupo A) e 26 sem ELP (Grupo B) à RNMH. Antes do tratamento, os parâmetros antropométricos eram similares em ambos os grupos. Um ano após a introdução do GH a aceleração significativa na velocidade de crescimento ( $p < 0,0001$ ) não diferiu entre os grupos.

**Conclusão:** o uso do GH promoveu padrão de crescimento similar em portadores de DGH com e sem ELP, diferente de dados de estudos anteriores.

**Descritores:** ectopia, lobo posterior hipofisário, deficiência do hormônio do crescimento, tratamento, GH.

## **Introdução**

O diagnóstico de DGH não adquirida baseia-se na associação de critérios antropométricos e ausência de pico do GH após testes de estímulo farmacológicos (Rosenfeld *et al.*, 1995; Rosenfeld, 1997; GH Research Society, 2000). Entretanto, o valor desses testes de estímulo tem sido questionado, uma vez que os pontos de cortes são arbitrários, os exames são caros e os resultados não são reprodutíveis (Rosenfeld *et al.*, 1997; GH Research Society, 2000). Diante da inexistência de teste considerado “padrão-ouro” e consequente incapacidade de se estabelecer diagnóstico definitivo de DGH, são tratados alguns pacientes cujo diagnóstico não é certeza e, alguns deles, apresentam pico de GH normal em testes de estímulo realizados após o final do crescimento (Cacciari *et al.*, 1992; Tauber *et al.*, 1997; Maghnie *et al.*, 1999). Nos últimos anos, RNMH tem sido utilizada na investigação de casos de DGH não tumoral, permitindo a identificação de alterações da região hipotálamo-hipofisária, especialmente a síndrome de interrupção da haste hipofisária (PSIS, *pituitary stalk interruption syndrome*) (Fusijawa *et al.*, 1987). Neuro-hipófise (NH) ectópica, associada ou não à hipoplasia da adeno-hipófise (AH) e interrupção da haste hipofisária, tem sido considerada marcador de DGH permanente (Ulmann *et al.*, 1993; Maghnie *et al.*, 1996; Genovese *et al.*, 1997; Léger *et al.*, 2005). Por outro lado, o achado isolado de AH hipoplásica é sinal inespecífico, podendo estar presente em pacientes com DGH isolada (DGHI) ou associada a outras deficiências hormonais (DHHC, deficiência hormonal hipofisária combinada) (Kornreich *et al.*, 1998; Bozzola *et al.*, 2000). Além disso, em pacientes com DGHI a AH pode aumentar espontaneamente após o final do desenvolvimento puberal (Bozzola *et al.*, 1996; Maghnie *et al.*, 1999).

Estudos recentes demonstraram que a presença de malformações cerebrais congênitas à RNMH é mais importante preditor da resposta terapêutica que o pico de GH após testes de estímulo (Coutant *et al.*, 2001; Zenaty *et al.*, 2005; Louvel *et al.*, 2009). Pacientes com as referidas alterações apresentariam velocidade de crescimento mais acentuada que os portadores de DGH com RNMH normal, grupo que responderia ao tratamento de forma similar aos indivíduos com baixa estatura idiopática (Coutant *et al.*, 2001). Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar a resposta no primeiro ano de tratamento com GH nos pacientes com e sem ELP.

## **Pacientes e Métodos**

### *Pacientes*

Estudo longitudinal retrospectivo que incluiu 84 pacientes (60 do sexo masculino) pré-púberes e com idade cronológica no início do tratamento inferior a 16 anos, portadores de DGH não adquirida, tratados num mesmo centro de referência (CEDEBA) de 1998 a 2009. Foram excluídos pacientes com doenças cromossômicas, síndromes malformativas e doenças crônicas. Os pacientes foram divididos em dois grupos em função dos achados à RNMH: Grupo A (n=58): pacientes com NH ectópica, com (n=9) ou sem (n=49) malformações associadas e Grupo B (n=26): pacientes com RNMH normal (n=16), com apenas uma malformação associada (n=1) ou hipoplasia hipofisária (n=9). GH recombinante foi administrado por via subcutânea, na dose de 0,5UI/kg/semana (0,16 mg/kg/semana), em seis ou sete injeções/semana, sendo a dose reajustada a cada seis meses em função do peso. Pacientes com deficiências hormonais combinadas receberam tratamento substitutivo.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do CEDEBA e da FIOCRUZ e a inclusão no mesmo foi feita pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes ou seus responsáveis.

### *Métodos*

Avaliação antropométrica: A estatura foi aferida com estadiômetro e o seu desvio-padrão (DP) foi calculado utilizando-se referências-padrão (Tanner *et al.*, 1966). Estatura-alvo foi calculada a partir das estaturas parentais (Tanner *et al.*, 1970), exceto para sete pacientes, um deles adotado. O índice de massa corpórea (IMC, peso em kg/estatura em m<sup>2</sup>) e a velocidade de crescimento (VC) foram expressos em DP para a idade cronológica (Sempe *et al.*, 1979; Rolland-Cachera *et al.*, 1991).

Avaliação laboratorial: o GH foi mensurado antes e 60 e 90 minutos após estimulação com clonidina (0,15 mg/m<sup>2</sup>) ou L-DOPA (10 mg/kg); ou antes e 20, 45, 60, 75 e 90 minutos após a estimulação com insulina (0,1 UI/kg). Pico de GH foi considerado diminuído quando inferior a 7 ng/ml. Dosagem de IGF-1 foi realizada por radioimunoensaio (RIE) ou quimioluminescência (QM) em 60 pacientes. Para avaliação do restante da função hipofisária foram realizadas dosagens basais de T4 livre, TSH e prolactina, além de cortisol basal ou após estímulo com insulina ou ACTH. Deficiência de hormônio antidiurético (ADH) foi



diagnosticada na presença de osmolaridade urinária diminuída e diurese superior a 3 litros/24 horas em adolescentes e adultos e superior a 2 l/m<sup>2</sup> de superfície corporal em crianças.

RNMH: Foram obtidas imagens à RNMH em cortes finos de 3 mm de espessura nos planos sagital e coronal. A haste hipofisária foi definida como normal, ausente ou afilada após administração de gadolínio. A altura máxima da hipófise foi calculada através da medida perpendicular da maior distância entre a base e o topo da glândula. Considerou-se hipoplasia hipofisária quando a altura da glândula para a idade foi menor que - 2 DP quando comparada com os controles normais descritos na literatura (Argyropolou *et al.*, 1991). Malformações cerebrais associadas foram também observadas. Todos os exames foram revisados pelo mesmo neurorradiologista pediátrico.

#### *Análise estatística*

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP. Variáveis contínuas foram comparadas pelo teste Mann-Whitey. Comparações de proporções intergrupos foram realizadas utilizando o X<sup>2</sup> ou teste exato de Fisher. Correlações foram realizadas pelo teste de Spearman. P < 0,05 foi considerado significativo.

### **Resultados**

#### *Características dos pacientes do Grupo A (n=58)*

Quarenta e um pacientes (70,7%) eram do sexo masculino. Teste de estímulo farmacológico de GH foi realizado em 55 pacientes, estando o pico de GH normal em quatro deles e diminuído nos restantes. Trinta e nove pacientes (67,2%) apresentavam DHHC, sendo TSH isolada (n=6), ACTH isolada (n=1), GnRH isolada (n=1), TSH e ACTH (n=11), TSH e GnRH (n=2), ACTH e GnRH (n=8) e pan-hipopituitarismo (n=10). Diabetes insipidus foi descrito em um paciente. Malformações à RNMH foram descritas em nove pacientes: angioma venoso (n=2), agenesia ou hipoplasia do corpo caloso (n=2), agenesia do septo pelúcido (n=1), leucomalácia associada à colpocefalia (n=1), ausência da artéria cerebral média (n=1), malformação de Chiari 1 (n=1) e gliose e desmielinização (n=1). A idade ao início de tratamento foi de  $9,3 \pm 3,4$  (2,7 - 15,9) anos. Na Tabela 1 estão dispostos os dados antropométricos antes e após o tratamento com GH.

**Tabela 1.** Parâmetros antropométricos dos 58 pacientes com DGH e ELP (Grupo A) antes e um ano após tratamento com GH

	<b>Antes do tratamento</b>	<b>Após tratamento</b>	<b>P</b>
<b>Estatura (DP)</b>	-4,2 ± 1,6	-3,3 ± 1,6	< 0,0001
<b>Velocidade de crescimento (DP) (n=42)</b>	-2,4 ± 1,8	4,8 ± 3,4	< 0,0001
<b>Estatura alvo - estatura pré-tratamento (DP)</b>	3,3 ± 1,4	2,4 ± 1,5	< 0,0001
<b>IMC (DP)</b>	-0,4 ± 1,8	-0,6 ± 1,6	0,6

*Características dos pacientes do Grupo B (n=26)*

Dezenove pacientes (73,1%) eram do sexo masculino. Vinte e cinco pacientes realizaram teste de estímulo farmacológico, estando o pico de GH diminuído em todos eles, resultado que foi confirmado nos 16 que realizaram o segundo teste. O diagnóstico de DGH nos pacientes restantes baseou-se no pico de GH não responsivo em um teste de estímulo associado a níveis diminuídos de IGF-1 (n=3) ou AH hipoplásica à RNHM (n=6). Um paciente não realizou teste de estímulo farmacológico, sendo o diagnóstico de DGH presumido diante de níveis diminuídos de IGF-1, associados à AH hipoplásica. Dois pacientes com pico de GH diminuído após dois testes de estímulo farmacológico apresentavam, adicionalmente, AH hipoplásica. DHHC foi descrita em seis pacientes (23,1%), sendo TSH isolada (n=3), TSH e ACTH (n=1), TSH e GnRH (n=2). Malformação de Chiari 1 foi descrita em um paciente e os demais não apresentavam malformações do SNC. A idade ao início de tratamento foi de  $9,9 \pm 2,6$  (3,5 - 14,5) anos. Na Tabela 2 estão dispostos os dados antropométricos antes e após o tratamento com GH.

**Tabela 2:** Parâmetros antropométricos dos 26 pacientes com DGH sem ELP (Grupo B) antes e um ano após o tratamento com GH

	<b>Antes do tratamento</b>	<b>Após tratamento</b>	<b>P</b>
<b>Estatura (DP)</b>	-3,8 ± 1,7	-3,0 ± 1,6	< 0,0001
<b>Velocidade de crescimento (DP) (n=19)</b>	-2,8 ± 1,5	3,4 ± 2,6	< 0,0001
<b>Estatura alvo - estatura pré-tratamento (DP)</b>	2,2 ± 1,9	1,4 ± 1,8	< 0,0001
<b>IMC (DP)</b>	-0,3 ± 1,5	-0,4 ± 1,5	0,2

*Comparação dos Grupos A e B*

A Tabela 3 mostra a comparação das características dos grupos A e B. Informação referente ao tipo de parto só não foi obtida em um paciente do grupo A. Parto vaginal foi referido em 37 pacientes do grupo A e 18 pacientes do grupo B, sendo que, nesse tipo de parto, apresentação pélvica foi descrita em 12 e dois pacientes, respectivamente, prevalência

que não diferiu significativamente entre os grupos. Os grupos também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quanto à distribuição por gênero, idade ao início do tratamento, estaturas pré e pós- tratamento, VC pré e pós-tratamento e IMC pré e pós-tratamento. O pico de GH foi significativamente menor nos pacientes com ELP ( $p=0,02$ ), enquanto que a diferença entre a estatura alvo e as estaturas pré e pós-tratamento diferiram nos dois grupos ( $p= 0,002$  e  $0,02$ ).

**Tabela 3:** Características dos 84 pacientes com DGH com (Grupo A) e sem (Grupo B) ELP

	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>P</b>
<b>Sexo masculino/feminino</b>	41/17	19/7	NS
<b>Parto pélvico (n)</b>	12/37	2/18	NS
<b>Idade início do tratamento (anos)</b>	9,3 ± 3,4	9,9 ± 2,6	NS
<b>Estatura pré-tratamento (DP)</b>	-4,2 ± 1,6	-3,8 ± 1,7	NS
<b>Estatura pós-tratamento (DP)</b>	-3,3 ± 1,6	-3,0 ± 1,6	NS
<b>Pico de GH (ng/dl)</b>	2,5 ± 4,6	2,6 ± 3,4	0,02
<b>VC pré-tratamento (DP)</b>	-2,4 ± 1,8	-2,8 ± 1,5	NS
<b>VC pós-tratamento (DP)</b>	4,8 ± 3,4	3,4 ± 2,6	NS
<b>Estatura alvo - estatura pré-tratamento (DP)</b>	3,3 ± 1,4	2,2 ± 1,9	0,002
<b>Estatura alvo-estatura pós-tratamento (DP)</b>	2,4 ± 1,5	1,4 ± 1,8	0,02
<b>Variação do crescimento sob tratamento (DP)</b>	0,9 ± 0,6	0,8 ± 0,5	NS
<b>IMC antes do tratamento (DP)</b>	-0,4 ± 1,8	-0,3 ± 1,5	NS
<b>IMC após tratamento (DP)</b>	-0,6 ± 1,6	-0,4 ± 1,5	NS

NS, não significante.

### *Correlações*

A velocidade de crescimento correlacionou-se negativamente com a idade ao início do tratamento ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,1$ ), não apresentando correlação com estatura no início do tratamento, IMC pré-tratamento e pico de GH.

### **Discussão**

Não há critérios inequívocos para diagnóstico de DGH, que é realizado diante da associação de baixa estatura com pico diminuído de GH em testes de estímulos. Entretanto, desde 1987, a RNMH tem sido utilizada como adjuvante no diagnóstico, sendo inicialmente o achado de PSIS (Fusijawa *et al.*, 1987) considerado marcador de DGH permanente. Posteriormente, observou-se que a ELP, um dos componentes da síndrome, era o preditor mais importante de DGH (Ulmann *et al.*, 1993; Maghnie *et al.*, 1996; Genovese *et al.*, 1997). Entretanto, alguns autores observaram que mesmo pacientes com essa alteração quando

retestados ao final do tratamento apresentavam pico responsivo de GH após testes de estímulo (Cacciari *et al.*, 1992; Tauber *et al.*, 1997; Maghnie *et al.*, 1999). Desde então, buscam-se os parâmetros mais importantes para a predição de graus mais acentuados de DGH, que estariam associados à melhor resposta terapêutica.

A resposta ao tratamento com GH é muito variável e os principais parâmetros responsáveis por essa variação são: etiologia da deficiência hormonal, idade e estatura no início do tratamento, estatura no início da puberdade e frequência das injeções (Ranke *et al.*, 1999; Cutfield *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001; Saenger, 2002; Tanaka *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, três estudos retrospectivos foram realizados com o objetivo de comparar o padrão de crescimento em pacientes com e sem alterações morfológicas da região hipotálamo-hipofisária. Todos evidenciaram melhor resposta terapêutica nos pacientes com alterações radiológicas, quando comparados aos sem as referidas alterações (Coutant *et al.*, 2001; Zenaty *et al.*, 2005; Louvel *et al.*, 2009), os quais se assemelhavam aos portadores de baixa estatura idiopática (Coutant *et al.*, 2001). A diferença nos padrões de crescimento foi observada no primeiro ano de tratamento em todos os estudos. O presente estudo, entretanto, evidenciou que, a despeito das características pré-tratamento serem similares em ambos os grupos, exceto por níveis menores de GH nos pacientes com ELP, as velocidades de crescimento e estaturas após um ano de tratamento com GH não diferiram entre eles. A divergência entre o estudo atual e os três anteriores pode ser secundária à inclusão no mesmo de pacientes mais velhos. É possível que o *catch-up growth* em portadores de ELP seja tanto maior no primeiro ano quanto mais precoce seja iniciado o GH. Outra possibilidade é que mais tempo de tratamento seja necessário para que as diferenças entre os dois grupos sejam evidenciadas. Não se pode desconsiderar, entretanto, que a inexistência de diferença entre os grupos deva-se à maior casuística de portadores de ELP no estudo atual quando comparada à dos dois dos trabalhos prévios, que avaliaram, respectivamente, 15 (Coutant *et al.*, 2001) e 37 (Zenaty *et al.*, 2005) pacientes.

Em conclusão, a velocidade de crescimento foi similar nos pacientes com e sem ELP e DGH. Dessa forma, a presença de ELP não foi preditor de melhor resposta ao GH no trabalho atual. Estudos prospectivos são necessários para esclarecer a relação entre ELP e resposta terapêutica.

## **Referências Bibliográficas**

Rosenfeld, R.G., Albertsson-Wikland, K., Cassorla, F., Frasier, S.D., Hasegawa, Y., Hintz, R.L., Lafranchi, S., Lippe, B., Loriaux, L., Melmed, S., Preece, M.A., Ranke, M.B., Reiter, E.O., Rogol, A.D., Underwood, L.E., Werther, G. (1995) Diagnostic controversy: the diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:1532-1540.

Rosenfeld, R.G. Is growth hormone deficiency a viable diagnosis? [Editorial] (1997) *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:349-351.

GH Research Society (2000) Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH research society. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85:3990-3993.

Cacciari, E., Tassoni, P., Parisi, G. (1992) Pitfalls in diagnosing impaired growth hormone (GH) secretion: retesting after replacement therapy of 63 patients defined as GH-deficient. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 74:1284-1289.

Tauber, M., Moulin, P., Pienkowski, C., Jouret, B., Rochiccioli, P. (1997) Growth hormone (GH) retesting and auxological data in 131 GH-deficient patients after completion of treatment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:352-356.

Maghnie, M., Strigazzi, C., Tinelli, C., Autelli, M., Cisternino, M., Loche, S., Severi, F. (1999) Growth hormone (GH) deficiency (GHD) of childhood onset: reassessment of GH status and evaluation of the predictive criteria for permanent GHD in young adults. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84:1324-1328.

Fujisawa, I., Kikuchi, K., Nishimura, K., Togashi, K., Itoh, K., Noma, S., Minami, S., Sagoh, T., Hiraoka, T., Momoi, T., Mikawa, H., Nakano, Y., Itoh, H., Konishi, J. (1987) Transection of the pituitary stalk: development of an ectopic posterior lobe assessed with MR imaging. *Radiology* 165:487-489.

Ulmann, M.C., Siegel, S.F., Hirsch, W.L., Finegold, D.N., Foley, T.P. (1993) Pituitary stalk and ectopic hyperintense T1 signal on magnetic resonance imaging: implications for anterior pituitary dysfunction. *American Journal of Diseases of Children* 147:647-652.

Maghnie, M., Genovese, E., Villa, A., Spagnolo, L., Campani, R., Severi, F. (1996) Dynamic MRI in the congenital agenesis of the neural pituitary stalk syndrome: the role of the vascular pituitary stalk in predicting residual anterior pituitary function. *Clinical Endocrinology* 45:281-290.

Genovese, E., Maghnie, M., Beluffi, G., Villa, A., Sammarchi, L., Severi, F., Campani, R. (1997) Hypothalamic-pituitary vascularization in pituitary stalk transection syndrome: is the pituitary stalk really transected? The role of gadolinium-DTPA with spin-echo T1 imaging and turbo-FLASH technique. *Pediatric Radiology* 27:48-53.

Léger, L., 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? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:650-656.

Kornreich, L., Horev, G., Lazar, L., Schwarz, M., Sulkes, J., Pertzalan, A. (1998) MR findings in growth hormone deficiency: correlation with severity of hypopituitarism. *ANJR. American Journal of Neuroradiology* 19:1495-1499.

Bozzola, M., Mengarda, F., Sartirana, P., Tato, L., Chaussain, J.L. (2000) Long-term follow-up evaluation of magnetic resonance imaging in the prognosis of permanent GH deficiency. *European Journal of Endocrinology* 143:493-496.

Bozzola, M., Adamsbaum, C., Biscaldi, I., Zecca, M., Cisternino, M., Genovese, E., Richard, I., Kalifa, G., Chaussain, J.L. (1996) Role of magnetic resonance imaging in the diagnosis and prognosis of growth hormone deficiency. *Clinical Endocrinology* 45:21-26.

Coutant, R., Rouleau, S., Despert, F., Magontier, N., Loisel, D., Limal, J.M. (2001) Growth and adult height in GH-treated children with nonacquired GH deficiency and idiopathic short stature: the influence of pituitary magnetic resonance imaging findings. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:4649-4654.

Zenaty, D., Garel, C., Limoni, C., Czernichow, P., Léger, J. (2003) Presence of magnetic resonance imaging abnormalities of the hypothalamic-pituitary axis is a significant determinant of the first 3 years growth response to human growth hormone treatment in prepubertal children with nonacquired growth hormone deficiency. *Clinical Endocrinology* 58:647-652.

Louvel, M., Marcu M., Trivin, C., Souberbielle, J.C., Brauner, R. (2009) Diagnosis of growth hormone (GH) deficiency: comparison of pituitary stalk interruption syndrome and transient GH deficiency. *BMC Pediatrics* 9:29.

Tanner, J.M., Whitehouse, R.H., Takaishi, M. (1966) Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children. *Archives of Disease in Childhood* 41:613-635.

Tanner, J.M., Goldstein, H., Whitehouse, R.H. (1970). Standards for children's height at ages 2-9 years allowing for height of parents. *Archives of Disease in Childhood* 47:755-762.

Sempe, M., Pedron, G., Roy-Pernot, M.P. *Auxologie, Méthodes et Séquences*. Paris: Theraplix; 1979.

Rolland-Cachera, M.F., Cole, T.J., Sempe, M., Tichet, J., Rossignol, C., Charraud, A. (1991) Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *European Journal of Clinical Nutrition* 45:13-21

Argyropoulou, M., Perignon, F., Brauner, R., Rappaport, R. (1991) Height of normal pituitary gland as a function of age evaluated by magnetic resonance imaging in children. *Pediatric Radiology* 21:247-249.

***CONSIDERAÇÕES***

***FINAIS***



Muitos foram os marcos importantes no conhecimento do funcionamento do eixo hipotálamo-hipofisário. Em meados de 1900, identificou-se a existência de um fator biológico - GH- fundamental para o crescimento linear, ausente em algumas crianças com baixa estatura (Hartog, 1964). Com a disponibilidade de extratos de hipófise de cadáveres, foi possível tratar pacientes com nanismo e observar que a resposta não ocorria em todos os casos. O segundo marco foi o desenvolvimento do método de radioimunoensaio para dosagem de GH, que possibilitou constatar que os níveis hormonais não eram constantes ao longo do dia (Rose, 2007), sendo necessário utilizar estímulos para que o referido hormônio fosse liberado. O conhecimento de que o GH aumentava após a administração de determinados estímulos fisiológicos ou farmacológicos levou à avaliação mais precisa dos níveis hormonais (Rose, 2007). Desde então, foi iniciada a busca por um teste padrão-ouro para o diagnóstico de DGH, questão até o momento não completamente elucidada (GH Research Society, 2000).

Em 1987, foi descrita, à RNMH, a PSIS (Fusijawa et al., 1987), associada ou não a malformações do SNC, em pacientes com hipopituitarismo e começou-se a associar a sua presença ao diagnóstico definitivo de DGH. Posteriormente, sugeriu-se que a ELP seria o elemento da síndrome capaz de prever a DGH. O teste padrão-ouro para diagnóstico de DGH parecia definido. Associado a isso, a partir de estudos em roedores, a embriogênese hipofisária começou a ser elucidada e mutações em genes envolvidos na mesma foram associadas à presença de malformações hipotálamo-hipofisárias, com e sem ELP (Kelberman et al., 2009). Então, PSIS, anteriormente relacionada a trauma perinatal, já que ocorria com maior frequência em pacientes com apresentação pélvica (Kikuchi et al., 1988), passou a ter etiologia congênita mais cogitada (Maghnie et al., 1996; Genovese et al., 1997), o que levou, inclusive, a se considerar o termo “interrupção de haste” inadequado. Entretanto, a etiologia da DGH só estava definida para número limitado de pacientes. A identificação da contribuição de genes codificantes de fatores transcricionais (genes homeobox) nas diversas etapas do desenvolvimento hipofisário possibilitou a definição preliminar dos fenótipos que se associariam às mutações nos referidos genes (Kelberman et al., 2009). O primeiro gene no qual se identificou mutação ligada a alterações morfológicas na região hipotálamo-hipofisária foi o HESX1 (Dattani et al., 1998; Brickman et al., 2001; Thomas et al., 2001; Carvalho et al., 2003; Cohen et al., 2003; Tajima et al., 2003; McNay et al., 2007; Corneli et al., 2008). Entretanto, estudos em grandes séries evidenciaram baixa prevalência de mutações nesse gene nessas populações. Seguiu-se o estudo de outros genes, como o LHX4, SOX3 e, mais recentemente, OTX2. Contudo, a prevalência de mutações em todos os genes estudados até o momento é baixa. Além disso, há grande heterogeneidade fenotípica, mesmo em pacientes

apresentando mutações no mesmo gene e ainda quando exibem a mesma mutação (Machinis et al., 2001; Tajima et al., 2007; Castinetti et al., 2008; Pfaeffle et al., 2008; Dateki et al., 2010; Tajima et al., 2010; Woods et al., 2005; Diaczoc et al., 2008; Tajima et al., 2009; Ashkenazi-Hoffnung et al., 2010; Dateki et al., 2010). Isso sugere que outros genes e outras moléculas sinalizadores podem estar envolvidos na embriogênese hipofisária. Além disso, fatores ambientais podem contribuir para as variações fenotípicas.

O presente estudo avalia as características da maior coorte de portadores de DGH e ELP já descrita. Os pacientes foram acompanhados num mesmo centro de referência ao longo de 11 anos. As principais limitações do estudo são: a) trata-se de estudo retrospectivo; b) ao longo do período, algumas metodologias para dosagens hormonais modificaram-se; c) no que tange ao estudo molecular, as técnicas utilizadas têm limitações. Além disso, o SOX3, um dos quatro genes já associados à ELP, não foi estudado. Entretanto, as limitações descritas não invalidam os principais achados do trabalho, sumarizados a seguir:

#### *Fenótipo Clínico/Biológico e Radiológico*

Similar ao descrito em outras casuísticas, houve predominância do sexo masculino, cuja causa, ainda não completamente esclarecida, poderia estar ligada ao fato da baixa estatura ter maior impacto nos pacientes daquele gênero. A apresentação pélvica foi mais frequente, mas não esteve relacionada ao maior número de deficiências hormonais. Embora mais provavelmente essa seja uma consequência e não causa da ELP, poderá decorrer de outros elementos ainda desconhecidos. Importante ainda notar que, como evidenciado no artigo 3, a prevalência de tal achado foi similar no grupo de pacientes com e sem ELP, embora esse estudo tenha incluído pequeno número de pacientes, o que pode ter introduzido algum viés.

A DHHC foi mais frequente que a DGHI, estando mais comumente associada a não visualização da haste. Entretanto, a prevalência das deficiências hormonais foi diferente de outros estudos, dado que não surpreende, uma vez que os trabalhos anteriores não são conclusivos quanto à frequência das deficiências hormonais, mostrando DHHC em combinações e prevalências diversas. Essa questão só poderá ser elucidada quando a) forem realizados estudos prospectivos, em longo prazo, com grandes coortes; b) critérios de avaliação dos eixos hormonais padronizados sejam utilizados universalmente.

### *Mutações em Genes Codificadores de Fatores Transcricionais*

O estudo molecular identificou mutação (transição de A>G), levando à troca de asparagina por serina, nos éxons 6 do LHX4 e 3 do HESX1. Essas mutações podem ser polimórficas e não causadoras de doença, mas avaliação de indivíduos não portadores de ELP será realizada e poderá sugerir se a mutação contribui para o fenótipo da doença.

A associação genótipo/fenótipo em portadores de DGH e ELP só poderá ser bem estabelecida quando: a) a caracterização clínica, laboratorial e radiológica for precisa; b) houver evolução do conhecimento da embriogênese hipofisária, com conhecimento de grande parte dos genes e fatores transcricionais relacionados à mesma. Só assim será possível definir algoritmo de investigação mutacional desses pacientes. Essa estratégia irá possibilitar a elucidação diagnóstica de alguns casos de DGH.

### *Resposta ao Tratamento com GH*

Os resultados encontrados nesse subgrupo foram os mais surpreendentes, pois diferiram de três estudos prévios (Coutant et al., 2001; Zenaty et al., 2005; Louvel et al., 2009), os únicos que compararam, especificamente, o crescimento em pacientes com e sem ELP. Esses estudos indicaram que a ELP é marcador de DGH mais grave, o que levaria à melhor resposta ao uso do GH. No nosso trabalho o crescimento sob tratamento foi similar nos pacientes com e sem ELP. Apesar de inesperado, esse resultado é mais uma evidência da heterogeneidade da população portadora de DGH e indica a necessidade de desenvolver estudos prospectivos para responder a essa e muitas outras questões referentes à evolução da DGH com e sem ELP.

A variabilidade fenotípica apresentada pelos pacientes no que diz respeito a dados clínicos, biológicos, radiológicos e resposta terapêutica sugerem que outros genes, ainda não identificados, além de influência do ambiente e penetrância das mutações estariam relacionados.

***CONCLUSÕES***

No presente estudo:

- Pacientes com ELP exibiram grande variabilidade fenotípica clínica, hormonal e radiológica. Em 5,9 % dos casos o pico de GH foi normal após teste de estímulo farmacológico. DHHC ocorreu em 61,5% dos casos, com diversos padrões de deficiências hormonais combinadas. AH hipoplásica, descrita em 90% dos pacientes, não diferiu nos grupos DGHI e DHHC. Malformações cerebrais foram descritas em 12 pacientes (9,2%).

- Mutação (Transição de A>G) ocorreu nos éxons 3 do HESX1 e 6 do LHX4 dos pacientes com ELP. Avaliação adicional será realizada em indivíduos não portadores de ELP para avaliar a relação das referidas mutações com a gênese da ELP.

- A velocidade de crescimento no primeiro ano de tratamento com GH foi similar nos portadores de DGH com e sem ELP, não sendo, portanto, o achado de malformação congênita da região hipotálamo-hipofisária preditor da resposta terapêutica. Esse dado requer confirmação através de estudos prospectivos, sobretudo em função dos resultados divergentes, quando comparado aos três trabalhos previamente publicados.

***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

AARSKOG, D., EIKEN, H.G., BJERKNES, R., MYKING, O.L. (1997) Pituitary dwarfism in the R271W Pit-1 gene mutation. **European Journal of Pediatrics** 156:829-834.

ACAMPORA, D., MAZAN, S., LALLEMAND, Y., AVANTAGGIATO, V., MAURY, M., SIMEONE, A., BRÛLET P. (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. **Development** 121:3279-3290.

AHMAD, T., BORCHERT, M., GEFFNER, M. (2008) Optic nerve hypoplasia and hypopituitarism. **Pediatric Endocrinology Reviews** 5:772-777.

ALATZOGLOU, K.S., DATTANI, M.T. (2009) Genetic forms of hypopituitarism and their manifestation in the neonatal period. **Early Human Development** 85:705-712.

ALBRECHTSEN, S., RASMUSSEN, S., DALAKER, K., IRGENS, L.M. (1998) The occurrence of breech presentation in Norway 1967-1994. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica** 77:410-415.

ARGYROPOULOU, M., KIORTSIS, D. (2005) MRI of the hypothalamic-pituitary axis in children. **Pediatric Radiology** 35:1045-1055.

ARGYROPOULOU, M., PERIGNON, F., BRAUNER, R., BRUNELLE, F. (1992) Magnetic resonance imaging in the diagnosis of growth hormone deficiency. **The Journal of Pediatrics** 120:886-891.

ARGYROPOULOU, M., PERIGNON, F., BRAUNER, R., RAPPAPORT, R. (1991) Height of normal pituitary gland as a function of age evaluated by magnetic resonance imaging in children. **Pediatric Radiology** 21:247-249.

ARNHOLD, I.J., NERY, M., BROWN, M.R., VOSS, T.C., VANDERHEYDEN, T.C., ADESS, M.E., HURLEY, D.L., WAJCHENBERG, B.L., PARKS, J.S. (1998) Clinical and molecular characterization of a Brazilian patient with Pit-1 deficiency. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism** 11:623-630.

ARRIGO, T., WASNIEWSKA, M., De LUCA, F., VALENZISE, M., LOMBARDO, F., VIVENZA, D., VACCARO, T., CORADI, E., BIASON-LAUBER, A. (2006) Congenital adeno-hypophysis aplasia: clinical features and analysis of the transcriptional factors for embryonic pituitary development. **Journal of Endocrinological Investigation** 29:208-213.

ASHKENAZI-HOFFNUNG, L., LEBENTHAL, Y., WYATT, A.W., RAGGE, N.K., DATEKI, S., FUKAMI, M., OGATA, T., PHILLIP, M., GAT-YABLONSKI, G. (2010) A novel loss-of-function mutation in *OTX2* in a patient with anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. **Human Genetics** 127:721-729.

BELLONI, E., MUENKE, M., ROESSLER, E., TRAVERSO, G., SIEGEL-BARTELT, J., FRUMKIN, A., MITCHELL, H.F., DONIS-KELLER, H., HELMS, C., HING, A.V., HENG, H.H., KOOP, B., MARTINDALE, D., ROMMENS, J.M., TSUI, L.C., SCHERER, S.W. (1996) Identification of sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. **Nature Genetics** 14:353-356.

BHANGOO, A.P., HUNTER, C.S., SAVAGE, J.J., ANHALT, H., PAVLAKIS, S., WALVOORD, E.C., TEN, S., RHODES, S.J. (2006) Clinical case seminar: a novel LHX3 mutation presenting as combined pituitary hormonal deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 91:747-753.

BONA, G., PARACCHINI, R., GIORDANO, M., MOMIGLIANO-RICHIARDI, P. (2004) Genetic defects in GH synthesis and secretion. **European Journal of Endocrinology** 151:S3-S9.

BONCINELLI, E. (1997) Homeobox genes and disease. **Current Opinion in Genetics & Development** 7:331-337.

BOZZOLA, M., MENGARDA, F., SARTIRANA, P., TATO, L., CHAUSSAIN, J.L. (2000) Long-term follow-up evaluation of magnetic resonance imaging in the prognosis of permanent GH deficiency. **European Journal of Endocrinology** 143:493-496.

BRICKMAN, J.M., CLEMENTS, M., TYRELL, R., MCNAY, D., WOODS, K., WARNER, J., STEWART, A., BEDDINGTON, R.S., DATTANI, M. (2001) Molecular effects of novel mutations in *Hesx1/HESX1* associated with human pituitary disorders. **Development** 128:5189-5199.

CACCIARI, E., TASSONI, P., PARISI, G. (1992) Pitfalls in diagnosing impaired growth hormone (GH) secretion: retesting after replacement therapy of 63 patients defined as GH-deficient. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 74:1284-1289.

CACCIARI, E., ZUCCHINI, S., AMBROSETTO, P., TANI, G., CARLÀ, G., CICOGNANI, A., PIRAZZOLI, P., SGANGA, T., BALSAMO, A., CASSIO, A., ZAPPULLA, F. (1994) Empty sella in children and adolescents with possible hypothalamic-pituitary disorders. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 78:767-771.

CARA, J.F., ROSENFELD, R.L., FURLANETTO, R.W. (1987) A longitudinal study of the relationship of plasma somatomedin-C concentration to the pubertal growth spurt. **American Journal of Diseases of Children** 141:562-564.

CARVALHO, L.R., WOODS, K.S., MENDONÇA, B.B., MARCAL, N., ZAMPARINI, A.L., STIFANI, S., BRICKMAN, J.M., ARNHOLD, I.J.P., DATTANI, M.T. (2003) A homozygous mutation in *HESX1* is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. **The Journal of Clinical Investigation** 112:1192-1201.

CASTINETTI, F., SAVEANU, A., REYNAUD, R., QUENTIEN, M.H., BUFFIN, A., BRAUNER, R., KAFFEL, N., ALBAREL, F., GUEDJ, A.M., EL KHOLY, M., AMIN, M., ENJALBERT, A., BARLIER, A., BRUE, T. (2008) A novel dysfunctional LHX4 mutation with high phenotypical variability in patients with hypopituitarism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 93:2790-2799.

CÉSAR & SEZAR. **Biologia** 2. São Paulo, Ed Saraiva, 2002.

CHARLES, M.A., SUH, H., HJALT, T.A., DROUIN, J., CAMPER, S.A., GAGE, P.J. (2005) *PITX* genes are required for cell survival and *Lhx3* activation. **Molecular Endocrinology** 19:1893-1903.



CHEN, S., LÉGER, 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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 84:2408-2413.

COHEN, R.N., COHEN, L.E., BOTERO, D., YU, C., SAGAR, A., JURKIEWICZ, M., RADOVICK, S. (2003) Enhanced repression by HESX1 as a cause of hypopituitarism and septo-optic dysplasia. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 88:4832-4839.

COHEN, L.E., RADOVICK, S. (2002) Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. **Endocrine Reviews** 23:431-442.

COHEN, L.E., WONDISFORD, F.E., SALVATONI, A., MAGHNIE, M., BRUCKER-DAVIS, F., WEINTRAUB, B.D., RADOVICK, S. (1995) A "hot spot" in the Pit-1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency: clinical and molecular correlates. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 80:679-684.

CORNELI, G., VIVENZA, D., PRODAM, F., DI DIO, G., VOTTERO, A., RAPA, A., BELLONE, S., BERNASCONI, S., BONA, G. (2008) Heterozygous mutation in HESX1 causing hypopituitarism and multiple anatomical malformations without features of septo-optic dysplasia. **The Journal of Clinical Investigation** 118:689-693.

COUTANT, R., ROULEAU, S., DESPERT, F., MAGONTIER, N., LOISEL, D., LIMAL, J.M. (2001) Growth and adult height in GH-treated children with nonacquired GH deficiency and idiopathic short stature: the influence of pituitary magnetic resonance imaging findings. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 86:4649-4654.

COYA, R., VELA, A., PÉREZ DE NANCLARES, G., RICA, I., CASTAÑO, L., BUSTURIA, M.A., MARTUL, P., GEDPIT GROUP. (2007) Panhypopituitarism: genetic versus acquired etiological factors. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism** 20:27-36.

CROTTAZ, B., USKÉ, A., REYMOND, M.J., REY, F., TEMLER, E., GERMOND, M., GOMEZ, F. (1996) Normogonadotropic primary amenorrhea in a growth hormone-deficient woman with ectopic posterior pituitary: gonadotropin pulsatility and follicle-stimulating hormone bioactivity. **Journal of Endocrinological Investigation** 19:48-53.

CUTFIELD, W., LINDBERG, A., ALBERTSSON WIKLAND, K., CHATELAIN, P., RANKE, M.B., WILTON, P. (1999) Final height in idiopathic growth hormone deficiency: the KIGS experience. KIGS International Board. **Acta Paediatrica** 88:S72-S755.

DASEN, J.S., BARBERA, J.P., HERMAN, T.S., CONNELL, S.O., OLSON, L., JU, B., TOLLKUH, J., BAEK, S.H., ROSE, D.W., ROSENFELD, M.G. (2001) Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. **Genes and Development** 15:3193-3207.

DASEN, J.S., O'CONNELL, S.M., FLYNN, S.E., TREIER, M., GLEIBERMAN, A.S., SZETO, D.P., HOOSHMAND, F., AGGARWAL, A.K., ROSENFELD, M.G. (1999) Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. **Cell** 97:587-598.

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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 93:3697-3672.

DATEKI, S., FUKAMI, M., UEMATSU, A., KAJI, M., ISSO, M., ONO, M., MIZOTA, M., YOKOYA, S., MOTOMURA, K., KINOSHITA, E., MORIUCHI, H., OGATA, T. (2010) Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with LHX4 deletion. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 95:4043-4047.

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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 95:756-764.

DATTANI, M.T. (2005) Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? **Clinical Endocrinology** 63:121-130.

DATTANI, M.L., MARTINEZ-BARBERA, J., THOMAS, P.Q., BRICKMAN, J.M., GUPTA, R., WALES, J.K., HINDMARSH, P.C., BEDDINGTON, R.S., ROBINSON, I.C. (2000) Molecular genetics of septo-optic dysplasia. **Hormone Research** 53:26-33.

DATTANI, M.T., MARTINEZ-BARBERA, J.P., THOMAS, P.Q., BRICKMAN, J.M., GUPTA, R., MÅRTENSSON, I.L., TORESSON, H., FOX, M., WALES, J.K., HINDMARSH, P.C., KRAUSS, S., BEDDINGTON, R.S., ROBINSON, I.C. (1998) Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. **Nature Genetics** 19:125-133.

DATTANI, M.T., PREECE, M.A. (2004) Growth hormone deficiency and related disorders: insights into, causation, diagnosis, and treatment. **Lancet** 363:1977-1987.

DATTANI, M.T., ROBINSON, I.C. (2002) HESX1 and septo-optic dysplasia. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders** 3:289-300.

DATTANI, M.L., ROBINSON, I.C. (2000) The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man. **Clinical Genetics** 57:337-346.

DE ROBERTIS, E.M., OLIVER, G., WRIGHT, C.V. (1990) Homeobox genes and the vertebrate body plan. **Scientific American** 263:46-52.

DELADOËY, J., FLÜCK, C., BÜYÜKGEBİZ, A., KUHLMANN, B.V., EBLÉ, A., HINDMARSH, P.C., WU, W., MULLIS, P.E. (1999) "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 84:1645-1650.

DI IORGI, N., SECCO, A., NAPOLI, F., TINNELI, C., CALCAGNO, A., FRATANGELI, N., AMBROSINI, L., ROSSI, A., LORINI, R., MAGHNIE, M. (2007) Deterioration of growth hormone (GH) response and anterior pituitary function in young adults with childhood-onset GH deficiency and ectopic posterior pituitary: A two-year prospective follow-up study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 92:3875-3884.

DIACZOK, D., ROMERO, C., ZUNICH, J., MARSHALL, I., RADOVICK, S. (2008) A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 93:4351-4359.

DIETRICH, R.B., LIS, L.E., GREENSITE, F.S., PITT, D. (1995) Normal MR appearance of the pituitary gland in the first 2 years of life. **ANJR. American Journal of Neuroradiology** 16:1413-1419.

DONAUBAUER, J., KIESS, W., KRATZSCH, J., NOWAK, T., STEINKAMP, H., WILLGERODT, H., KELLER, E. (2003) Re-assessment of growth hormone secretion in young adult patients with childhood-onset growth hormone deficiency. **Clinical Endocrinology** 58:456-463.

DROUIN, J., LAMOLET, B., LAMONERIE, T., LANCTÔT, C., TREMBLAY, J.J. (1998) The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary development. **Molecular and Cellular Endocrinology** 140:31-36.

DRUMMOND, J.B., MARTINS, J.C.T., SOARES, M.M.S., DIAS, E.P. (2003) Alterações da haste hipofisária e suas implicações clínicas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** 47:458-466.

DUQUESNOY, P., ROY, A., DASTOT, F., GHALI, I., TEINTURIER, C., NETCHINE, I., CACHEUX, V., HAFEZ, M., SALAH, N., CHAUSSAIN, J.L., GOOSSENS, M., BOUGNÈRES, P., AMSELEM, S. (1998) Human Prop-1: cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. **FEBS Letters** 437:216-220.

ELSTER, A.D. (1993) Modern imaging of the pituitary. **Radiology** 187:1-14.

FISHER, E., SCAMBLER, P. (1994) Human haploinsufficiency- -one for sorrow, two for joy. **Nature Genetics** 7:5-7.

FOFANOVA, O.V., TAKAMURA, N., KINOSHITA, E., YOSHIMOTO, M., TSUJI, Y., PETERKOVA, V.A., EVGRAFOV, O.V., DEDOV, I.I., GONCHAROV, N.P., YAMASHITA, S. (1998) Rarity of PIT1 involvement in children from Russia with combined pituitary hormone deficiency. **American Journal of Medical Genetics** 77:360-365.

FREETH, J.S., SILVA, C.M., WHATMORE, A.J., CLAYTON, P.E. (1998) Activation of the signal transducers and activators of transcription signaling pathway by growth hormone (GH) in skin fibroblasts from normal and GH binding protein-positive Laron Syndrome children. **Endocrinology** 139:20-28.

FUJISAWA, I., KIKUCHI, K., NISHIMURA, K., TOGASHI, K., ITOH, K., NOMA, S., MINAMI, S., SAGOH, T., HIRAOKA, T., MOMOI, T., MIKAWA, H., NAKANO, Y., ITOH, H., KONISHI, J. (1987) Transection of the pituitary stalk: development of an ectopic posterior lobe assessed with MR imaging. **Radiology** 165:487-489.

GAGE, P.J., CAMPER, S.A. (1997) Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. **Human Molecular Genetics** 6:457-464.

GAGE, P.J., SUH, H., CAMPER, S.A. (1999) Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. **Development** 126:4643-4651.

GAREL, C., LÉGER, L. (2007) Contribution of magnetic resonance imaging in non-tumoral hypopituitarism in children. **Hormone Research** 67:194-202.

GENOVESE, E., MAGHNIE, M., BELUFFI, G., VILLA, A., SAMMARCHI, L., SEVERI, F., CAMPANI, R. (1997) Hypothalamic-pituitary vascularization in pituitary stalk transection syndrome: is the pituitary stalk really transected? The role of gadolinium-DTPA with spin-echo T1 imaging and turbo-FLASH technique. **Pediatric Radiology** 27:48-53.

GH RESEARCH SOCIETY. (2000) Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH research society. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 85:3990-3993.

GOLDMAN, J. Crescimento normal e baixa estatura- etiologia e diagnóstico diferencial. In Lieberman B, Cukiert A (eds): **Fisiologia e fisiopatologia do hormônio de crescimento**, São Paulo, Lemos Editorial, 2004, PP 41-63.

HAGSTROM, S.A., PAUER, G.J., REID, J., SIMPSON, E., CROWE, S., MAUMENEE, I.H., TRABOULSI, E.I. (2005) SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. **American Journal of Medical Genetics** 138A:95-98.

HAMILTON, J., CHITAYAT, D., BLASER, S., COHEN, L.E., PHILLIPS, J.A., DANEMAN, D. (1998) Familial growth hormone deficiency associated with MRI abnormalities. **American Journal of Medical Genetics** 80:128-132.

HAMILTON, B.E., SALZMAN, K.L., OSBORN, A.G. (2007) Anatomic and pathologic spectrum of pituitary infundibulum lesions. **AJR. American Journal of Neuroradiology** 188:W223-W232.

HARTOG, M. (1964) Physiological and pathological roles of growth hormone. **Postgraduate Medical Journal** 40:470-478.

HERMESZ, E., MACKEM, S., MAHON, K.A. (1996) Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. **Development** 122:41-52.

HUGHES, I.P., CHOONG, C.S., COTTERILL, A., HARRIS, M., DAVIES, P.S.W. (2010) Gender bias in children receiving growth hormone treatment. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 95:1191-1198.

IKEDA, H., SUZUKI, J., SASANO, N., NIIZUMA, H. (1988) The development and morphogenesis of the human pituitary gland. **Anatomy and Embryology** 178:327-336.

IRIE, Y., TATSUMI, K., OGAWA, M., KAMIJO, T., PREEYASOMBAT, C., SUPRASONGSIN, C., AMINO, M. (1995) A novel E250X mutation of the PIT1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. **Endocrine Journal** 42:351-354.

JUUL, A., BERNASCONI, S., CLAYTON, P.E., KIESS, W., DEMUINCK-KEIZER SCHRAMA, S., DRUGS AND THERAPEUTICS COMMITTEE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC ENDOCRINOLOGY (ESPE). (2002) European audit of current practice in diagnosis and treatment of childhood growth hormone deficiency. **Hormone Research** 58:233-241.

KANDERMIR, N., YORDAM, N., CILA, A., BESIM, A. (2000) Magnetic resonance imaging in growth hormone deficiency: relationship between endocrine function and morphological findings. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism** 13:171-178.

KAPLAN, S.L., ABRAMS, C.A., BELL, J.J., CONTE, F.A., GRUMBACH, M.M. (1968) Growth and growth hormone I. Changes in serum level of growth hormone following hypoglycemia in 134 children with growth retardation. **Pediatric Research** 2:43-63.

KELBERMAN, D., DATTANI, M.T. (2006) The role of transcription factors implicated in anterior pituitary development in the aetiology of congenital hypopituitarism. **Annals of Medicine** 38:560-777.

KELBERMAN, D., DATTANI, M.T. (2007) Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology. **European Journal of Endocrinology** 157 Suppl 1:S3-14.

KELBERMAN, D., DE CASTRO, S.C., HUANG, S., CROLLA, J.A., PALMER, R., GREGORY, J.W., TAYLOR, D., CAVALLO, L., FAIENZA, M.F., FISCHETTO, R., ACHERMANN, J.C., MARTINEZ-BARBERA, J.P., RIZZOTI, K., LOVELL-BADGE, R., ROBINSON, I.C., GERRELLI, D., DATTANI, M.T. (2008) SOX2 plays a critical role in the pituitary, forebrain, and eye during human embryonic development. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 93:1865-1873.

KELBERMAN, D., RIZZOTI, K., AVILION, A., BITNER-GLINDZICZ, M., CIANFARANI, S., COLLINS, J., CHONG, W.K., KIRK, J.M., ACHERMANN, J.C., ROSS, R., CARMIGNAC, D., LOVELL-BADGE, R., ROBINSON, I.C., DATTANI, M.T. (2006) Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. **The Journal of Clinical Investigation** 116:2442-2445.

KELBERMAN, D., RIZZOTI, K., LOVELL-BADGE, R., ROBINSON, I.C., DATTANI, M.T.(2009) Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. **Endocrine Reviews** 30:790-829.

KIKUCHI, K., FUJISAWA, I., MOMOI, T., YAMANAKA, C., KAJI, M., NAKANO, Y., KONISHI, J., MIKAWA, H., SUDO, M. (1988) Hypothalamic-pituitary function in growth hormone-deficient patients with pituitary stalk transection. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 67:817-823.

KITAMURA, K., MIURA, H., MIYAGAWA-TOMITA, S., YANAZAWA, M., KATOH-FUKUI, Y., SUZUKI, R., OHUCHI, H., SUEHIRO, A., MOTEGI, Y., NAKAHARA, Y., KONDO, S., YOKOYAMA, M. (1999) Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonar isomerism. **Development** 126:5749-5758.

KORNREICH, L., HOREV, G., LAZAR, L., SCHWARZ, M., SULKES, J., PERTZELAN, A. (1998) MR findings in growth hormone deficiency: correlation with severity of hypopituitarism. **ANJR. American Journal of Neuroradiology** 19:1495-1499.

KOUTKIA, P., CANAVAN, B., BREU, J., JOHNSON, M.L., GRINSPOON, S.K. (2004) Nocturnal ghrelin pulsatility and response to growth hormone secretagogues in healthy men. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism** 287:E506-512.

KRZISNIK, C., BATTELINO, T., BROWN, M., PARKS, J.S., LARON, Z. (1999) The "Little People" of the island of Krk - Revisited. Etiology of hypopituitarism revealed. **The Journal of Endocrine Genetics: JEG** 1:9-19.

KUROKAWA, D., KIYONARI, H., NAKAYAMA, R., KIMURA-YOSHIDA, C., MATSUO, I., AIZAWA, S. (2004) Regulation of Otx2 expression and its functions in mouse forebrain and midbrain. **Development** 131:3319-3331.

KUROKAWA, D., TAKASAKI, N., KIYONARI, H., NAKAYAMA, R., KIMURA-YOSHIDA, C., MATSUO, I., AIZAWA, S. (2004) Regulation of Otx2 expression and its functions in mouse epiblast and anterior neuroectoderm. **Development** 131:3307-3317.

LAHIRI, D.K., NURNBERGER, J.I. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research** 19:5444.

LAMOLET, B., PULICHINO, A.M., LAMONERIE, T., GAUTHIER, Y., BRUE, T., ENJALBERT, A., DROUIN, J. (2001) A pituitary cell-restricted Tbox factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. **Cell** 104:849-859.

LANCTÔT, C., GAUTHIER, Y., DROUIN, J. (1999) Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. **Endocrinology** 140:1416-1422.

LANCTÔT, C., LAMOLET, B., DROUIN, J. (1997) The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. **Development** 124:2807-2817.

LANES, R., HURTADO, E. (1982) Oral clonidine – an effective growth hormone-releasing agent in prepubertal subjects. **Pediatrics** 100:710-714.

LARON, Z., PERTZELAN, A., MANNHEIMER, S. (1966) Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone--a new inborn error of metabolism? **Israel Journal of Medical Sciences** 2:152-155.

LAUMONNIER, F., RONCE, N., HAMEL, B.C., THOMAS, P., LESPINASSE, J., RAYNAUD, M., PARINGAUX, C., VAN BOKHOVEN, H., KALSCHEUER, V., FRYNS, J.P., CHELLY, J., MORAINÉ, C., BRIAULT, S. (2002) Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. **American Journal of Human Genetics** 71:1450-1455.

LEE, P.A., MAZUR, T., DANISH, R., AMRHEIN, J., BLIZZARD, R.M., MONEY, J., MIGEON, C.J. (1980) Micropenis I: criteria, etiologies and classification. **The Johns Hopkins Medical Journal** 146:156-163.

LÉGER, L., 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? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 90:650-656.

LI, S., CRENSHAW, E.B. 3RD, RAWSON, E.J., SIMMONS, D.M., SWANSON, L.W., ROSENFELD, M.G. (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU domain gene pit-1. **Nature** 347:528-533.

LIN, C.R., KIOUSSI, C., O'CONNELL, S., BRIATA, P., SZETO, D., LIU, F., IZPISU, A., BELMONTE, J.C., ROSENFELD, M.G. (1999) Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis **Nature** 401:279-282.

LINDSAY, R., FELDKAMP, M., HARRIS, D., ROBERTSON, J., RALLISON, M. (1994) Utah growth study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. **The Journal of Pediatrics** 125:29-35.

LOCHE, S., BIZZARRI, C., MAGHNIE, M., FAEDDA, A., TZIALLA, C., AUTELLI, M., CASINI, M.R., CAPPÀ, M. (2002) Results of early reevaluation of growth hormone secretion in short children with apparent growth hormone deficiency. **The Journal of Pediatrics** 140:445-449.

LOUVEL, M., MARCU M., TRIVIN, C., SOUBERBIELLE, J.C., BRAUNER, R. (2009) Diagnosis of growth hormone (GH) deficiency: comparison of pituitary stalk interruption syndrome and transient GH deficiency. **BMC Pediatrics** 9:29.

LU, M.F., PRESSMAN, C., DYER, R., JOHNSON, R.L., MARTIN, J.F. (1999) Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. **Nature** 401:276-278.

MACHINIS, K., AMSELEM, S. (2005) Functional relationship between LHX4 and POU1F1 in light of the LHX4 mutation identified in patients with pituitary defects. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 90:5456-62.

MACHINIS, K., PANTEL, J., NETCHINE, I., LÉGER, J., CAMAND, O.J., SOBRIER, M.L., DASTOT-LE MOAL, F., DUQUESNOY, P., ABITBOL, M., CZERNICHOW, P., AMSELEM, S. (2001) Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. **American Journal of Human Genetics** 69:961-968.

MAGHNIE, M., GENOVESE, E., VILLA, A., SPAGNOLO, L., CAMPANI, R., SEVERI, F. (1996) Dynamic MRI in the congenital agenesis of the neural pituitary stalk syndrome: the role of the vascular pituitary stalk in predicting residual anterior pituitary function. **Clinical Endocrinology** 45:281-290.

MAGHNIE, M., GHIRARDELLO, S., GENOVESE, E. (2004) Magnetic resonance imaging of the hypothalamus-pituitary unit in children suspected of hypopituitarism: who, how and when to investigate. **The Journal of Endocrinological Investigation** 27:496-509.

MAGHNIE, M., STRIGAZZI, C., TINELLI, C., AUTELLI, M., CISTERNINO, M., LOCHE, S., SEVERI, F. (1999) Growth hormone (GH) deficiency (GHD) of childhood onset: reassessment of GH status and evaluation of the predictive criteria for permanent GHD in young adults. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 84:1324-1328.

MAGHNIE, M., TRIULZI, F., LARIZZA, D., PRETI, P., PRIORA, C., SCOTTI, G., SEVERI, F. (1991) Hypothalamic-pituitary dysfunction in growth hormone-deficient patients with pituitary abnormalities. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 73:79-83.

MARSHAL, W.A., TANNER, J.M. (1969) Variations in the pattern of pubertal changes in girls. **Archives of Disease in Childhood** 44:291-303.

MARSHAL, W.A., TANNER, J.M. (1970) Variations in the pattern of pubertal changes in boys. **Archives of Disease in Childhood** 45:13-24.

MCNAY, D.E., TURTON, J.P., KELBERMAN, D., WOODS, K.S., BRAUNER, R., PAPADIMITRIOU, A., KELLER, E., KELLER, A., HAUF, N., KRUEDE, H., SHALET, S.M., DATTANI, M.T. (2007) HESX1 mutations are an uncommon cause of septo-optic dysplasia and hypopituitarism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 92:691-697.

MEHTA, A., HINDMARSH, P.C., MEHTA, H., TURTON, P.G.T., RUSSELL-EGGITT, I., TAYLOR, D., CHONG, W.K., DATTANI, M.T. (2009) Congenital hypopituitarism: clinical, molecular and neuroradiological correlates. **Clinical Endocrinology** 71:376-382.

MEHTA, A., HINDMARSH, P.C., DATTANI, M.T. (2005) An update on the biochemical diagnosis of congenital ACTH insufficiency. **Clinical Endocrinology** 62:307-314.



MELO, M.E., MARUI, S., CARVALHO, L.R., ARNHOLD, I.J., LEITE, C.C., MENDONÇA, B.B., KNOEPFELMACHER, M. (2007) Hormonal, pituitary magnetic resonance, LHX4 and HESX1 evaluation in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe. **Clinical Endocrinology** 66:95-102.

MENDONCA, B.B., OSORIO, M.G.F., LATRONICO, A.C., ESTEFAN, V., LO, L.S.S., ARNHOLD, I.J.P. (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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 84:942-945.

MITCHELL, H., DATTANI, M.T., NANDURI, V., HINDMARSH, P.C., PREECE, M.A., BROOK, C.G. (1999) Failure of IGF-I and IGFBP-3 to diagnose growth hormone insufficiency. **Archives of Disease in Childhood** 80:443-447.

MITCHELL, L.A., THOMAS, P.Q., ZACHARIN, M.R., SCHEFFER, I.E. (2002) Ectopic posterior pituitary lobe and periventricular heterotopia: cerebral malformations with the same underlying mechanism? **ANJR. American Journal of Neuroradiology** 23:1475-1481.

MULLEN, R.D., COLVIN, S.C., HUNTER, C.S., SAVAGE, J.J., WALVOORD, E.C., BHANGOO, A.P., TEN, S., WEIGEL, J., PFÄFFLE, R.W., RHODES, S.J. (2007) Roles of the LHX3 and LHX4 LIM-homeodomain factors in pituitary development. **Molecular and Cellular Endocrinology** 265-266:190-195.

MULLIS, P.E. (2000) Transcription factors in pituitary gland development and their clinical impact on phenotype. **Hormone Research** 54:107-119.

NETCHINE, I., SOBRIER, M.L., KRUDE, H., SCHNABEL, D., MAGHNIE, M., MARCOS, E., DURIEZ, B., CACHEUX, V., MOERS, A., GOOSSENS, M., GRÜTERS, A., AMSELEM, S. (2000) Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. **Nature Genetics** 25:182-186.

ODENT, S., ATTI-BITACH, T., BLAYAU, M., MATHIEU, M., AUG, J., DELEZO, DE A.L., GALL, J.Y., LE MAREC, B., MUNNICH, A., DAVID, V., VEKEMANS, M. (1999) Expression of the sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. **Human Molecular Genetics** 8:1683-1689.

OHTA, K., NOBUKUNI, Y., MITSUBUCHI, H., FUJIMOTO, S., MATSUO, N., INAGAKI, H., ENDO, F., MATSUDA, I. (1992) Mutations in the Pit-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 189:851-855.

OSÓRIO, M.G., MARUI, S., JORGE, A.A., LATRONICO, A.C., LO, L.S., LEITE, C.C., ESTEFAN, V., MENDONCA, B.B., ARNHOLD, I.J. (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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 87:5076-5084.

PARKS, J.S., BROWN, M.R., HURLEY, D.L., PHELPS, C.J., WAJNRAJCH, M.P. (1999) Heritable disorders of pituitary development. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 84:4362-4370.

PELLEGRINI-BOUILLER, I., BELICAR, P., BARLIER, A., GUNZ, G., CHARVET, J.P., JAQUET, P., BRUE, T., VIALETTES, B., ENJALBERT, A. (1996) A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 81:2790-2796.

PERNASETTI, F., MILNER, R.D., AL ASHWAL, A.A., DE ZEGHER, F., CHAVEZ, V.M., MULLER, M., MARTIAL, J.A. (1998) Pro239Ser: a novel recessive mutation of the Pit-1 gene in seven middle eastern children with growth hormone, prolactin, and thyrotropin deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 83:2079-2083.

PERNASETTI, F., TOLEDO, S.P., VASILYEV, V.V., HAYASHIDA, C.Y., COGAN, J.D., FERRARI, C., LOURENÇO, D.M. JR., MELLON, P.L. (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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 85:390-397.

PEVNY, L., PLACZEK, M. (2005) SOX genes and neural progenitor identity. **Current Opinion in Neurobiology** 15:7-13.

PFAFFLE, R.W., DIMATTIA, G.E., PARKS, J.S., BROWN, M.R., WIT, J.M., JANSEN, M., VAN DER NAT, H., VAN DEN BRANDE, J.L., ROSENFELD, M.G., INGRAHAM, H.A. (1992) Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. **Science** 257:1118-1121.

PFAEFFLE, R.W., HUNTER, C.S., SAVAGE, J.J., DURAN-PRADO, M., MULLEN, R.D., NEEB, Z.P., EIHLZER, U., HESSE, V., HADDAD, N.G., STOBBE, H.M., BLUM, W.F., WEIGEL, J.F., RHODES, S.J. (2008) Three novel missense mutations within the LHX4 gene are associated with variable pituitary hormone deficiencies. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 93:1062-1071.

PFAEFFLE, R.W., SAVAGE, J.J., HUNTER, C.S., PALME, C., AHLMANN, M., KUMAR, P., BELLONE, J., SCHOENAU, E., KORSCH, E., BRÄMSWIG, J.H., STOBBE, H.M., BLUM, W.F., RHODES, S.J. (2007) Four novel mutations of the LHX3 gene cause combined pituitary hormone deficiencies with or without limited neck rotation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 92:1909-1919.

PINTO, G., ADAN, L., SOUBERBIELLE, J.C., THALASSINOS, C., BRUNELLE, F., BRAUNER, R. (1999) Idiopathic growth hormone deficiency: presentation, diagnostic and treatment during childhood. **Annales d'Endocrinologie** 60:224-231.

PINTO, G., NETCHINE, I., SOBRIER, M. L., BRUNNELLE, F., SOUBERBIELLE, J.C., BRAUNER, R. (1997) Pituitary stalk interruption syndrome: a clinical-biological-genetic assessment of its pathogenesis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 82:3450-3454.

RADOVICK, S., NATIONS, M., DU, Y., BERG, L.A., WEINTRAUB, B.D., WONDISFORD, F.E. (1992) A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. **Science** 257:1115-1118.

RAETZMAN, L.T., WARD, R., CAMPER, S.A. (2002) Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia. **Development** 129:4229-4239.

RAGGE, N.K., BROWN, A.G., POLOSCHEK, C.M., LORENZ, B., HENDERSON, R.A., CLARKE, M.P., RUSSELL-EGGITT, I., FIELDER, A., GERRELLI, D., MARTINEZ-BARBERA, J.P., RUDDLE, P., HURST, J., COLLIN, J.R.O., SALT, A., COOPER, S.T., THOMPSON, P.J., SISODIYA, S.M., WILLIAMSON, K.A., FITZPATRICK, D.R., VAN HEYNINGEN, V., HANSON, I.M. (2005) Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. **American Journal of Human Genetics** 76:1008-1022.

RAITI, S., DAVIS, W.T., BLIZZARD, R.M. (1967) A comparison of the effects of insulin hypoglycaemia and arginine infusion on release of human growth hormone. **Lancet** 2:1182-1183.

RAJAB, A., KELBERMAN, D., DE CASTRO, S.C., BIEBERMANN, H., SHAIKH, H., PEARCE, K., HALL, C.M., SHAIKH, G., GERRELLI, D., GRUETERS, A., KRUDE, H., DATTANI, M.T. (2008) Novel mutations in LHX3 are associated with hypopituitarism and sensorineural hearing loss. **Human Molecular Genetics** 17:2150-2159.

RANKE, M.B., SCHWEIZER, R., WOLLMANN, H.A., SCHWARZE, P. (1999) Dosing of growth hormone in growth hormone deficiency. **Hormone Research** 51(Suppl 3):70-4.

REYNAUD, R., GUEYDAN, M., SAVEANU, A., VALLETTE-KASIC, S., ENJALBERT, A., BRUE, T., BARLIER, A. (2006) Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: experience in 195 patients. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 91:3329-3336.

RHINN, M., DIERICH, A., LE MEUR, M., ANG, S. (1999) Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. **Development** 126:4295-4304.

RIZZOTI, K., BRUNELLI, S., CARMIGNAC, D., THOMAS, P.Q., ROBINSON, I.C., LOVELL-BADGE, R. (2004) SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. **Nature Genetics** 36:247-255.

RODRIGUES MARTINELLI, A.M., BRAGA, M., DE LACERDA, L., RASKIN, S., GRAF, H. (1998) Description of a Brazilian patient bearing the R271W Pit-1 gene mutation. **Thyroid** 8:299-304.

ROESSLER, E., BELLONI, E., GAUDENZ, K., VARGAS, F., SCHERER, S.W., TSUI, L.C., MUENKE, M. (1997) Mutations in the C-terminal domain of sonic hedgehog cause holoprosencephaly. **Human Molecular Genetics** 6:1847-1853.

ROESSLER, E.Y.Z., MULLOR, J.L., CASAS, E., ALLEN, W.P., GILLESSEN-KAESBACH, G., ROEDER, E.R., MING, J.E., ALTABA, A., MUENKE, M. (2003) Loss-of-function mutations in the human *GLI2* gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100:13424-13429.

ROLLAND-CACHERA, M.F., COLE, T.J., SEMPE, M., TICHET, J., ROSSIGNOL, C., CHARRAUD, A. (1991) Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. **European Journal of Clinical Nutrition** 45:13-21.

ROOT, A.W., SAENZ-RODRIGUEZ, C., BONGIOVANNI, A.M., EBERLEIN, W.R. (1969) The effect of arginine infusion on plasma growth hormone and insulin in children. **The Journal of Pediatrics** 74:187-197.

ROSE, S.R. Growth hormone deficiency: growth hormone tests and growth hormone measurements. In Ranke MB, Price DA, Reiter EO (eds): **Growth Hormone Therapy in Pediatrics - 20 Years of KIGS**. Basel, Karger, 2007, pp 38-46.

ROSE, S.R, MUNICCHI, G., BARNES, K.M., KAMP, G.A., URIARTE, M.M., ROSS, J.L., CASSORLA, F., CUTLER, G.B. JR. (1991) Spontaneous growth hormone secretion increases during puberty in normal girls and boys. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 73:428-435.

ROSENFELD, R.G. Is growth hormone deficiency a viable diagnosis? [Editorial] (1997) **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 82:349-351.

ROSENFELD, R.G., ALBERTSSON-WIKLAND, K., CASSORLA, F., FRASIER, S.D., HASEGAWA, Y., HINTZ, R.L., LAFRANCHI, S., LIPPE, B., LORIAUX, L., MELMED, S., PREECE, M.A., RANKE, M.B., REITER, E.O., ROGOL, A.D., UNDERWOOD, L.E., WERTHER, G. (1995) Diagnostic controversy: the diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 80:1532-1540.

ROTTEMBOURG, D., LINGLART, A., ADAMSBAUM, C., LAHLOU, N., TEINTURIER C., BOUGNÈRES, P., CAREL, J.C. (2008) Gonadotrophic status in adolescents with pituitary stalk interruption syndrome. **Clinical Endocrinology** 69:105-111.

SAENGER, P. (2002) Growth hormone in growth hormone deficiency. **BMJ** (Clinical research ed.) 325:58-59.

SANGUINETTI, C.J., DIAS NETO, E., SIMPSON, A.J. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 17:914-921.

SAVAGE, J.J., YADEN, B.C., KIRATIPRANON, P., RHODES, S.J. (2003) Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development. *Gene* 319:1-19.

SCOTT, M.P., TAMKUN, J.W., HARTZELL, G.W. 3RD. (1989) The structure and function of the homeodomain. **Biochimica et Biophysica Acta** 989:25-48.

SEMPE, M., PEDRON, G., ROY-PERNOT, M.P. **Auxologie, Méthodes et Séquences**. Paris: Theraplix; 1979.

SHENG, H.Z., MORIYAMA, K., YAMASHITA, T., LI, H., POTTER, S.S., MAHON, K.A., WESTPHAL, H. (1997) Multistep control of pituitary organogenesis. **Science** 278:1809-1812.

SHENG, H.Z., WESTPHAL, H. (1999) Early steps in pituitary organogenesis. **Trends in Genetics: TIG** 15:236-40.

SHENG, H.Z., ZHADANOV, A.B., MOSINGER, B. JR., FUJII, T., BERTUZZI, S., GRINBERG, A., LEE, E.J., HUANG, S.P., MAHON, K.A., WESTPHAL, H. (1996) Specification of pituitary cell lineages by the Lim homeobox gene Lhx3. **Science** 272:1004-1007.

SIMEONE, A., ACAMPORA, D., MALLAMACI, A., STORNAIUOLO, A., D'APICE, M.R., 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** 7:2735-2747.

SIMON, D., HADJIATHANASIOU, C., GAREL, C., CZERNICHOW, P., LÉGER, J. (2006) Phenotypic variability in children with growth hormone deficiency associated with posterior pituitary ectopia. **Clinical Endocrinology** 64:416-422.

SLOOP, K.W., MEIER, B.C., BRIDWELL, J.L., PARKER, G.E., SCHILLER, A.M., RHODES, S.J. (1999) Differential activation of pituitary hormone genes by human Lhx3 isoforms with distinct DNA binding properties. **Molecular Endocrinology** 13:2212-2225.

SLOOP, K.W., SHOWALTER, A.D., VON KAP-HERR, C., PETTENATI, M.J., RHODES, S.J. (2000) Analysis of the human LHX3 neuroendocrine transcription factor gene and mapping to the subtelomeric region of chromosome 9. **Gene** 245:237-243.

SOBRIER, M.L., MAGHNIE, M., VIÉ-LUTON, M.P., SECCO, A., DI IORGI, N., LORINI, R., AMSELEM, S. (2006) Novel HESX1 mutations associated with a life-threatening neonatal phenotype, pituitary aplasia, but normally located posterior pituitary and no optic nerve abnormalities. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 91:4528-4536.

SOBRIER, M.L., NETCHINE, I., HEINRICHS, C., THIBAUD, N., VIÉ-LUTON, M.P., VAN VLIET, G., AMSELEM, S. (2005) Alu-element insertion in the homeodomain of HESX1 and aplasia of the anterior pituitary. **Human Mutation** 26:503.

SOLOMON, N.M., NOURI, S., WARNE, G.L., LAGERSTROM-FERMER, M., FORREST, S.M., THOMAS, P.Q. (2002) Increased gene dosage at Xq26-q27 is associated with X-linked hypopituitarism. **Genomics** 79:553-559.

SOLOMON, N.M., ROSS, S.A., MORGAN, T., BELSKY, J.L., HOL, F.A., KARNES, P.S., HOPWOOD, N.J., MYERS, S.E., TAN, A.S., WARNE, G.L., FORREST, S.M., THOMAS, P.Q. (2004) Array comparative genomic hybridization analysis of boys with X linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3. **Journal of Medical Genetics** 41:669-678.

SORNSON, M.W., WU, W., DASEN, J.S., FLYNN, S.E., NORMAN, D.J., O'CONNELL, S.M., GUKOVSKY, I., CARRIÈRE, C., RYAN, A.K., MILLER, A.P., ZUO, L., GLEIBERMAN, A.S., ANDERSEN, B., BEAMER, W.G., ROSENFELD, M.G. (1996) Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. **Nature** 384:327-333.

STEVANOVIĆ, M., LOVELL-BADGE, R., COLLIGNON, J., GOODFELLOW, P.N. (1993) SOX3 is an X-linked gene related to SRY. **Human Molecular Genetics** 2:2013-2018.

SZETO, D.P., RODRIGUEZ-ESTEBAN, C., RYAN, A.K., O'CONNELL, S.M., LIU, F., KIOUSSI, C., GLEIBERMAN, A.S., IZPISÚA-BELMONTE, J.C., ROSENFELD, M.G. (1999) Role of the bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. **Genes & Development** 13:484-494.

SZETO, D.P., RYAN, A.K., O'CONNELL, S.M., ROSENFELD, M.G. (1996) P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93:7706-7710.

TAJIMA, T., HATTORI, T., NAKAJIMA, T., OKUHARA, K., SATO, K., ABE, N.S., NAKAE, J., FUJIEDA, K. (2003) Sporadic heterozygous frameshift mutation in HESX1 causing sporadic pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 88:45-50.

TAJIMA, T., HATTORI, T., NAKAJIMA, T., OKUHARA, K., TSUBAKI, J., FUJIEDA, K. (2007) A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica. **Endocrine Journal** 54:637-41.

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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 94:314-319.

TAJIMA, T., YORIFUJI, T., ISHIZU, K., FUJIEDA, K. (2010) A novel mutation (V101A) of the LHX4 gene in a Japanese patient with combined pituitary hormone deficiency. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes** 118:405-409.

TAKUMA, N., SHENG, H.Z., FURUTA, Y., WARD, J.M., SHARMA, K., HOGAN, B.L., PFAFF, S.L., WESTPHAL, H., KIMURA, S., MAHON, K.A. (1998) Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. **Development** 125:4835-4840.

TANAKA, T., COHEN, P., CLAYTON, P.E., LARON, Z., HINTZ, R.L., SIZONENKO, P.C. (2002) Diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence--part 2: growth hormone treatment in growth hormone deficient children. **Growth Hormone & IGF Research** 12:323-341.

TANNENBAUM, G.S. (1991) Neuroendocrine control of growth hormone secretion. **Acta Paediatrica Scandinavica Supplement** 372:5-16.

TANNER, J.M., GOLDSTEIN, H., WHITEHOUSE, R.H. (1970) Standards for children's height at ages 2-9 years allowing for height of parents. **Archives of Disease in Childhood** 47:755-762.

TANNER, J.M., WHITEHOUSE, R.H., TAKAISHI, M. (1966) Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children. **Archives of Disease in Childhood** 41:613-635.

TATSUMI, K., MIYAI, K., NOTOMI, T., KAIBE, K., AMINO, N., MIZUNO, Y., KOHNO, H. (1992) Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. **Nature Genetics** 1:56-58.

TAUBER, M., CHEVREL, J., DIENE, G., MOULIN, P., JOURET, B., OLIVER, I., PIENKOWSKI, C., SEVELY, A. (2005) Long-term evolution of endocrine disorders and effect of GH therapy in 35 patients with pituitary stalk interruption syndrome. **Hormone Research** 64:266-273.

THOMAS, M., MASSA, G., BOURGUIGNON, J.P., CRAEN, M., DE SCHEPPER, J., DE ZEGHER, F., DOOMS, L., DU CAJU, M., FRANÇOIS, I., HEINRICH, C., MALVAUX, P., ROOMAN, R., THIRY-COUNSON, G., VANDEWEGHE, M., MAES, M. (2001) Final height in children with idiopathic growth hormone deficiency treated with recombinant human growth hormone: the belgian experience. **Hormone Research** 55:88-94.

THOMAS, P.Q., DATTANI, M.T., BRICKMAN, J.M., MCNAY, D., WARNE, G., ZACHARIN, M., CAMERON, F., HURST, J., WOODS, K., DUNGER, D., STANHOPE, R., FORREST, S., ROBINSON, I.C., BEDDINGTON, R.S. (2001) Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. **Human Molecular Genetics** 10:39-45.

TILLMANN, V., BUCKLER, J.M., KIBIRIGE, M.S., PRICE, D.A., SHALET, S.M., WALES, J.K., ADDISON, M.G., GILL, M.S., WHATMORE, A.J., CLAYTON, P.E. (1997) Biochemical tests in the diagnosis of childhood growth hormone deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 82:531-535.

TILLMANN, V., TANG, V.W.M., HUGHES, D.G., WRIGHT, N.B., CLAYTON, P.E. (2000) Magnetic resonance imaging of the hypothalamic-pituitary axis in the diagnosis of growth hormone deficiency. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism** 13:1577-1583.

TREIER, M., ROSENFELD, M.G. (1996) The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. **Current Opinion in Cell Biology** 8:833-843.

TREMBLAY, J.J., GOODYER, C.G., DROUIN, J. (2000) Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. **Neuroendocrinology** 71:277-286.

ULTMANN, M.C., SIEGEL, S.F., HIRSCH, W.L., FINEGOLD, D.N., FOLEY, T.P. (1993) Pituitary stalk and ectopic hyperintense T1 signal on magnetic resonance imaging: implications for anterior pituitary dysfunction. **American Journal of Diseases of Children** 147:647-652.

VALLETTE-KASIC, S., PELLEGRINI-BOUILLER, I., SAMPIERI, F., GUNZ, G., DIAZ, A., RADOVICK, S., ENJALBERT, A., BRUE, T. (2001) Combined pituitary hormone deficiency due to the F135C human Pit-1 (pituitary-specific factor 1) gene mutation: functional and structural correlates. **Molecular Endocrinology** 15:411-20.

VELDHUIS, J.D. (1998) Neuroendocrine control of pulsatile growth hormone release in the human: relationship with gender. **Growth Hormone & IGF Research Suppl B**:49-59.

VOSS, L.D., MULLIGAN, J., BENS, P.R., WILKIN, T.J. (1992) Poor growth in school entrants as an index of organic disease: the Wessex growth study. **British Medical Journal** 305:1400-1402.

VOSS, L.D. (2000) Growth hormone therapy for the short normal child: who needs it and who wants it?-the case against growth hormone therapy. **The Journal of Pediatrics** 136:103-106.

VOUTETAKIS, A., ARGYROUPOULOU, M., SERTEDAKI, A., LIVADAS, S., XEKOUKI, P., MANIATI-CHRISTIDI, M., BOSSIS, I., THALASSINOS, N., PATRONAS, N., DACOU-VOUTETAKIS, C. (2004) Pituitary magnetic resonance imaging in 15 patients with Prop1 gene mutations: pituitary enlargement may originate from the intermediate lobe. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 89:2200-2206.

WARD, L., CHAVEZ, M., HUOT, C., LECOCQ, P., COLLU, R., DÉCARIE, J.C., MARTIAL, J.A., VAN VLIET, G. (1998) Severe congenital hypopituitarism with low prolactin levels and age-dependent anterior pituitary hypoplasia: a clue to a PIT-1 mutation. **The Journal of Pediatrics** 132:1036-1038.

WATKINS-CHOW, D.E., CAMPER, S.A. (1998) How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? **Trends in Genetics: TIG** 14:284-290.

WILLIAMSON, K.A., HEVER, A.M., RAINGER, J., ROGERS, R.C., MAGEE, A., FIEDLER, Z., KENG, W.T., SHARKEY, F.H., MCGILL, N., HILL, C.J., SCHNEIDER, A., MESSINA, M., TURNPENNY, P.D., FANTES, J.A., VAN HEYNINGEN, V., FITZ PATRICK, D.R. (2006) Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. **Human Molecular Genetics** 15:1413-1422.

WOODS, K.S., CUNDALL, M., TURTON, J., RIZZOTI, K., MEHTA, A., PALMER, R., WONG, J., CHONG, W.K., AL-ZYUOD, M., EL-ALI, M., OTONKOSKI, T., MARTINEZ-BARBERA, J.P., THOMAS, P.Q., ROBINSON, I.C., LOVELL-BADGE, R., WOODWARD, K.J., DATTANI, M.T. (2005) Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. **American Journal of Human Genetics** 76:833-849.



WOODS, K.A., CAMACHO-HÜBNER, C., SAVAGE, M.O., CLARK, A.J. (1996) Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. **The New England Journal of Medicine** 335:1363-1367.

WU, W., COGAN, J.D., PFÄFFLE, R.W., DASEN, J.S., FRISH, H., O'CONNELL, S.M., FLYNN, S.E., BROWN, M.R., MULLIS, P.E., PARKS, J.S., PHILLIPS, J.A. 3RD, ROSENFELD, M.G. (1998) Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. **Nature Genetics** 18:147-149.

WYATT, A., BAKRANIA, P., BUNYAN, D.J., OSBORNE, R.J., CROLLA, J.A., SALT, A., AYUSO, C., NEWBURY-ECOB, R., ABOU-RAYYAH, Y., COLLIN, J.R., ROBINSON, D., RAGGE, N. (2008) Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma. **Human Mutation** 29:E278-E283.

ZENATY, D., GAREL, C., LIMONI, C., CZERNICHOW, P., LÉGER, J. (2003) Presence of magnetic resonance imaging abnormalities of the hypothalamic-pituitary axis is a significant determinant of the first 3 years growth response to human growth hormone treatment in prepubertal children with nonacquired growth hormone deficiency. **Clinical Endocrinology** 58:647-652.

ZHU, X., WANG, J., JU, B.G., ROSENFELD, M.G. (2007) Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. **Current Opinion in Cell Biology**. 19:605-611.

# *APÊNDICES*

**APÊNDICE A - FICHA CLÍNICA****1) IDENTIFICAÇÃO:**Nome: \_\_\_\_\_ Sexo:  M  F

D.N: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Pai: \_\_\_\_\_ Estatura: \_\_\_\_\_

Mãe: \_\_\_\_\_ Estatura: \_\_\_\_\_

História de Consanguinidade(especificar) \_\_\_\_\_

**2) DADOS PESSOAIS:**Local do nascimento: Hospitalar  Domiciliar Assistência ao parto: Médico  Parteira  Curiosa Tipo de parto: Cefálico  Pélvico  Fórceps  Cesáreo 

Peso: \_\_\_\_\_ Comprimento \_\_\_\_\_ Idade gestacional: \_\_\_\_\_

**Complicações:**. Gestacionais:  não  sim Precisar: \_\_\_\_\_. Obstétricas:  não  sim Precisar: \_\_\_\_\_. Neonatais:  não  sim hipoglicemia  infecção micropênis  icterícia criptorquidia  convulsão hipóxia  outras: \_\_\_\_\_

**3) DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS:**

	1ª consulta	2ª consulta	Última consulta
DATA			
ESTATURA			
PESO			
IDADE			
I. ÓSSEA			
Estágio Puberal (Tanner)			

**Dados adicionais**

- Desenvolvimento neuropsicomotor: \_\_\_\_\_
- Patologias associadas: \_\_\_\_\_
- Alterações ao exame físico: \_\_\_\_\_

**EXAMES LABORATORIAIS:**

## 7.2. Avaliação somatotrófica:

Teste	Data	Método	Estímulo	GH basal	Pico GH	Menor Glicemia	IGF1	IGF BP-3
1								
2								
3								
4								

## 7.3. Avaliação tireoidiana:

T4 livre: \_\_\_\_\_ TSH: \_\_\_\_\_

## c) Avaliação gonadotrófica (em idade puberal):

LH \_\_\_\_\_ FSH \_\_\_\_\_ Testosterona (M) \_\_\_\_\_ Estradiol (F) \_\_\_\_\_ d) Avaliação

corticotrófica:

## e) Dosagem de prolactina:



**APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(Paciente)**

O (a) seu (sua) filho (a) ou tutelado (a) está sendo convidado (a), como voluntário (a), a participar da pesquisa “Estudo Molecular em uma Coorte de Portadores de Deficiência de Hormônio do Crescimento na Bahia”, sob a coordenação da Dra. Angelina Xavier Acosta e Dra. Ana Cláudia Couto Santos da Silva. Esta pesquisa tem como objetivo identificar se seu (sua) filho (a) ou tutelado (a) tem alguma mutação (alteração no DNA - molécula responsável pela informação genética, ou seja, molécula que define as características dos indivíduos) responsável pela deficiência de hormônio do crescimento (DGH). Os portadores de DGH não produzem o hormônio do crescimento (GH) em quantidade suficiente, por isso não conseguem crescer adequadamente e apresentam baixa estatura. Em alguns pacientes a DGH é causada por mutações, sendo assim uma doença genética. Essas mutações podem ou não ser transmitidas pelos pais. O trabalho atual tem como objetivo o defeito genético. A participação do (da) seu (sua) filho (a) ou tutelado (a) não é obrigatória e a qualquer momento o (a) mesmo (a) pode abandonar o estudo, sem que haja prejuízo ao seu atendimento ou tratamento. Os dados do (a) seu (sua) filho (a) ou tutelado (a) serão mantidos em sigilo, sendo utilizados, resguardando a sua identificação, para fins de publicação científica em revistas especializadas e de relatórios técnicos dirigidos para organizações de saúde e instituições de pesquisa, ou seja, os dados serão publicados em revista médica sem constar o nome do (a) seu (sua) filho (a) (ou iniciais do seu nome) e o seu endereço. Caso você concorde com a participação do seu (sua) filho (a) nesse estudo, o (a) mesmo (a) será submetido (a) à coleta de 10 ml de sangue (cerca de uma colher das de sopa) da veia do braço, para realização do exame laboratorial. Algumas pessoas podem “perder os sentidos” ou desmaiar quando veem sangue. Outras pessoas ainda podem ter hematoma (ou “calombo de sangue”) no local de retirada do sangue no braço, devido ao sangue que saiu da veia, mas que esse problema é passageiro na grande maioria das pessoas que o tem e que pode ser mais rapidamente resolvido colocando compressas com água gelada de quatro a seis vezes por dia. Caso sejam identificadas mutações, você e seu (sua) filho (a) serão orientados quanto à possibilidade das mesmas serem transmitidas a outras gerações.

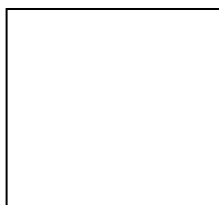
Eu, \_\_\_\_\_, pai (mãe) ou responsável pelo (a) menor \_\_\_\_\_, declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação do meu (minha) filho (a) ou tutelado (a) na pesquisa e concordo com a participação do (a) mesmo (a). Autorizo a retirada de 10 ml de sangue do (a) meu (minha) filho (a) ou tutelado (a), para que possam ser realizadas análises laboratoriais. Autorizo, ainda, que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em análises futuras, desde que os estudos adicionais sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde e possam contribuir para novos conhecimentos relacionados à doença. Estou ciente de que esse material coletado será processado e analisado no Laboratório de Biologia Molecular do LASP/CPqGM/FIOCRUZ (Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz), para se identificar as mutações causadoras da doença.

Nome do Genitor ou Responsável (letra de forma): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

ou

Assinatura a rogo



Endereço: \_\_\_\_\_

Número de Identidade: \_\_\_\_\_

Data (dd/mm/aaaa) \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Investigadores

<b>Dra. Ana Cláudia Couto Santos da Silva</b>	<b>Dra. Angelina Xavier Acosta</b>
CEDEBA Avenida Antônio Carlos Magalhães, SN, 3º andar. Iguatemi. Salvador-Bahia Tel: (71) 3270-5683.	LASP/CPqGM/FIOCRUZ Rua Waldemar Falcão 121, Brotas. Salvador-Bahia. Tel: (71) 3176-2255.

**APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(Paciente Maior que 18 Anos)**

Você está sendo convidado (a), como voluntário (a), a participar da pesquisa “Estudo Molecular em uma Coorte de Portadores de Deficiência de Hormônio do Crescimento na Bahia”, sob a coordenação da Dra. Angelina Xavier Acosta e Dra. Ana Cláudia Couto Santos da Silva. Esta pesquisa tem como objetivo identificar se você tem alguma mutação (alteração no DNA - molécula responsável pela informação genética, ou seja, molécula que define as características dos indivíduos) responsável pela deficiência de hormônio do crescimento (DGH). Os portadores de DGH não produzem o hormônio do crescimento (GH) em quantidade suficiente, por isso não conseguem crescer adequadamente e apresentam baixa estatura. Em alguns pacientes a DGH é causada por mutações, sendo assim uma doença genética. Essas mutações podem ou não ser transmitidas pelos pais. O trabalho atual tem como objetivo o defeito genético. A sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você pode abandonar o estudo, sem que haja prejuízo ao seu atendimento ou tratamento. Os seus dados serão mantidos em sigilo, sendo utilizados, resguardando a sua identificação, para fins de publicação científica em revistas especializadas e de relatórios técnicos dirigidos para organizações de saúde e instituições de pesquisa, ou seja, os dados serão publicados em revista médica sem constar seu o nome (ou iniciais do seu nome) e o seu endereço. Caso você concorde em participar nesse estudo, será submetido (a) à coleta de 10 ml de sangue (cerca de uma colher das de sopa) da veia do braço, para realização do exame laboratorial. Algumas pessoas podem “perder os sentidos” ou desmaiar quando veem sangue. Outras pessoas ainda podem ter hematoma (ou “calombo de sangue”) no local de retirada do sangue no braço, devido ao sangue que saiu da veia, mas que esse problema é passageiro na grande maioria das pessoas que o tem e que pode ser mais rapidamente resolvido colocando compressas com água gelada de quatro a seis vezes por dia. Caso sejam identificadas mutações, você será orientado quanto à possibilidade das mesmas serem transmitidas aos seus filhos.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da minha participação na pesquisa e concordo em participar. Autorizo a retirada de 10 ml de sangue para que possam ser realizadas análises laboratoriais. Autorizo, ainda, que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em análises futuras, desde que os estudos adicionais sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde e possam contribuir para novos conhecimentos relacionados à doença. Estou ciente de que esse material coletado será



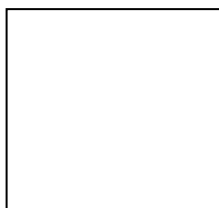
processado e analisado no Laboratório de Biologia Molecular do LASP/CPqGM/FIOCRUZ (Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz), para se identificar as mutações causadoras da doença.

Nome (letra de forma): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

ou

Assinatura a rogo



Endereço: \_\_\_\_\_

Número de Identidade: \_\_\_\_\_

Data (dd/mm/aaaa) \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Investigadores

<b>Dra. Ana Cláudia Couto Santos da Silva</b>	<b>Dra. Angelina Xavier Acosta</b>
CEDEBA Avenida Antônio Carlos Magalhães, SN, 3º andar. Iguatemi. Salvador-Bahia Tel: (71) 3270- 5683.	LASP/CPqGM/FIOCRUZ Rua Waldemar Falcão 121, Brotas. Salvador-Bahia. Tel: (71) 3176-2255.

**APÊNDICE D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(Genitores)**

Você está sendo convidado (a), como voluntário (a), a participar da pesquisa “Estudo Molecular em uma Coorte de Portadores de Deficiência de Hormônio do Crescimento na Bahia”, sob a coordenação da Dra. Angelina Xavier Acosta e Dra. Ana Cláudia Couto Santos da Silva. Esta pesquisa tem como objetivo identificar se seu (sua) filho (a) tem alguma mutação (alteração no DNA - molécula responsável pela informação genética, ou seja, molécula que define as características dos indivíduos), responsável pela deficiência de hormônio do crescimento. Caso seja identificada uma mutação no seu (sua) filho (a), será investigado se a mesma foi transmitida pelos genitores. Os portadores de DGH não produzem o hormônio do crescimento (GH) em quantidade suficiente, por isso não conseguem crescer adequadamente e apresentam baixa estatura. Em alguns pacientes a DGH é causada por mutações, sendo assim uma doença genética. Essas mutações podem ou não ser transmitidas pelos pais. O trabalho atual tem como objetivo o defeito genético. A sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você pode abandonar o estudo, sem que haja prejuízo ao atendimento ou tratamento do seu (sua) filho (a). Os seus dados serão mantidos em sigilo, sendo utilizados, resguardando a sua identificação, para fins de publicação científica em revistas especializadas e de relatórios técnicos dirigidos para organizações de saúde e instituições de pesquisa, ou seja, os dados serão publicados em revista médica sem constar seu o nome (ou iniciais do seu nome) e o seu endereço. Caso você concorde em participar nesse estudo, será submetido (a) à coleta de 10 ml de sangue (cerca de uma colher das de sopa) da veia do braço, para realização do exame laboratorial. Algumas pessoas podem “perder os sentidos” ou desmaiar quando veem sangue. Outras pessoas ainda podem ter hematoma (ou “calombo de sangue”) no local de retirada do sangue no braço, devido ao sangue que saiu da veia, mas que esse problema é passageiro na grande maioria das pessoas que o tem e que pode ser mais rapidamente resolvido colocando compressas com água gelada de quatro a seis vezes por dia. Caso sejam identificadas mutações, você será orientado quanto à possibilidade das mesmas serem transmitidas aos seus filhos e netos.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da minha participação na pesquisa e concordo em participar. Autorizo a retirada de 10 ml de sangue para que possam ser realizadas análises laboratoriais. Autorizo, ainda, que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em análises futuras, desde que os estudos adicionais sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções

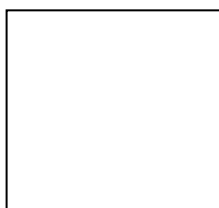
196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde e possam contribuir para novos conhecimentos relacionados à doença. Estou ciente de que esse material coletado será processado e analisado no Laboratório de Biologia Molecular do LASP/CPqGM/FIOCRUZ (Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz), para se identificar as mutações causadoras da doença.

Nome (letra de forma): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

ou

Assinatura a rogo



Endereço: \_\_\_\_\_

Número de Identidade: \_\_\_\_\_

Data (dd/mm/aaaa) \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Investigadores

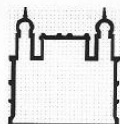
<b>Dra. Ana Cláudia Couto Santos da Silva</b>	<b>Dra. Angelina Xavier Acosta</b>
CEDEBA Avenida Antônio Carlos Magalhães, SN, 3º andar. Iguatemi. Salvador-Bahia Tel: (71) 3270-5683.	LASP/CPqGM/FIOCRUZ Rua Waldemar Falcão 121, Brotas. Salvador-Bahia. Tel: (71) 3176-2255.

***ANEXOS***

**ANEXO A** - Sequência de *primers* e temperatura de pareamento utilizados na amplificação dos éxons dos genes HESX1, LHX4 e OTX2

	<i>Forward</i> (5-3')	<i>Reverse</i> (5-3')	TP (°C)
<b>HESX1</b> (Dattani <i>et al.</i> , 1998)			
E1	AGCTGTTGCTCTGTGCAGACCACGAGA	ACAAAGAATTGAAACAATTAAGCTGTGGCA	65
E2	TGGAACATAAGATTGACCATCTAAGACA	AGCCTTTATATTATCATTATTGGGTGAA	55
E3	AGCTCATTTTTGGAGACATACTGAATA	TAACATTTCAACATCATGAATAACAACACT'	60
E4	GAATAATAAAATAATGTTTCTGAGACCTAT	TCATGCTCTGCAATTAGAAGATAATTTTAC	60
<b>LHX4</b> (Melo <i>et al.</i> , 2007)			
E1	ATCTCCGTAGACTGCGACT	TTGGGCTGGAGATGCGGGGT	63
E2	TAGCAGGGCTGTGTGGAAG	CTTGGGGAGAGGCAGAGAC	62
E3	AGATCCCTTGCTCCCTGTGT	AAACAAAGGCCTGGAGAGG	62
E4	CAGATAGGCCGAAGCCAGTA	AGGATACCTTCCACCCCTGT	60
E5	GGCTTTGGGTTTGTGGTG	CCCAGGGGACTTTCCTAAG	60
E 6	TCCTGGCAGCTGACAATAAA	TTGGCGTACTTTCGATCCTT	60
<b>OTX2</b> (Ragge <i>et al.</i> , 2005)			
E1	TTTAAAAGCCTCTGCCTCG	GAACAGGGTGTTGCA TCC	55
E2	GAGAGCATTGGTAGGCTCC	TCTCCACAGTCCCATACTCG	55
E3A	GAGCCATTCTTGTCTTAAGG	GAAGCTGGTGATGCATAG G	55
E3B	CCACTGTCAGATCCCTTGT	AATGCCTGGCTAAAACCTGG	55

E, éxon; TP, temperatura de pareamento.

**ANEXO B - Aprovação CEP FIOCRUZ**

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**

Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

**PARECER Nº 134/2007****Protocolo: 225****Projeto de Pesquisa: "Estudo Molecular em uma Coorte de Portadores de Deficiência de Hormônio do Crescimento na Bahia".****Pesquisadora Responsável: Drª Angelina Xavier Acosta****Instituição ou Departamento: LASP – Laboratório Avançado de Saúde Pública****Considerações:**

Após análise ética do projeto, o CEP/CPqGM considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 28 de maio de 2007.

  
\_\_\_\_\_  
**Drª Marilda de Souza Gonçalves**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CPqGM/FIOCRUZ

---

Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40296-710, Brasil

Tel: (71) 3176-2285 ramal: 285 Fax: (71) 3176-2327  
e-mail: mramos@cpqgm.fiocruz.br

**ANEXO C-Aprovação CEP CEDEBA**

GOVERNO ESTADO DA BAHIA  
SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DA BAHIA  
CENTRO DE DIABETES E ENDOCRINOLOGIA DA BAHIA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

---

**Formulário de Aprovação do CEP**

**Data de aprovação:** 27 de julho de 2007

**Título:** "Estudo Molecular em uma Coorte de Portadores de Deficiência do Hormônio de Crescimento na Bahia."

Nome do investigador principal: Dr<sup>a</sup> Angelina Xavier Acosta

**Aprovação do CEP**

O CEP avaliou e aprovou

(X) Protocolo

(X) TCLE

Membros do Comitê:

ADRIANA COIMBRA  
EDNA RESENDE  
JEANE MEIRE SALES DE MACEDO  
JUDITH CARRERA POUSADA  
RAUL CHAVES FILHO  
ZOLÂNDIA OLIVEIRA CONCEIÇÃO

  
**JEANE MEIRE SALES DE MACEDO**  
**Coordenadora do CEP**