

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAPHAELLA DE MIRANDA RODRIGUES GARCIA

**ESTUDO DE VARIANTES DO GENE *PROP1* ASSOCIADOS AO
HIPOPITUITARISMO**

CURITIBA - PR

2017

RAPHAELLA DE MIRANDA RODRIGUES GARCIA



**ESTUDO DE VARIANTES DO GENE *PROP1* ASSOCIADOS AO
HIPOPITUITARISMO**

Trabalho de conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

CURITIBA
2017

AGRADECIMENTOS

Desde que entrei na graduação em ciências biológicas as linhas de pesquisa do Laboratório de Polimorfismos e Ligação me despertaram grande interesse. A priori, optei por me iniciar cientificamente em outro laboratório, mas sempre almejei fazer parte desta equipe. Em determinado momento da minha vida acadêmica, decidi correr atrás dos meus sonhos. Enviei um e-mail à professora Lupe Furtado-Alle pedindo a oportunidade de, mesmo que voluntariamente, contribuir às pesquisas do laboratório. Por sorte, naquela mesma semana surgiu a vaga para uma iniciação científica e tive a felicidade de ocupar esta vaga. Sou muito grata à professora Lupe pela oportunidade de ingressar no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

O primeiro projeto de pesquisa em que fiz parte foi o projeto Canta Sabiá. Nele obtive prática nos procedimentos básicos do laboratório como coleta de sangue e extração de DNA. Esses passos foram importantes para que posteriormente, a execução de um trabalho como este fosse possível, e trabalhar em grupo com a doutoranda Betina Moreschi e mestrandas Stephanie Quadrado foi de grande aprendizado.

Quando surgiu a chance de trabalhar com uma nova linha de pesquisa, estudos acerca o hipopituitarismo, abracei a oportunidade sem pensar duas vezes. Sob orientação do professor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza e treinamento com as doutorandas Carla Sulzbach e Vanessa Zanette, aprendi as principais técnicas exploradas neste trabalho, as quais foram adaptadas quando necessário a fim de obter um melhor resultado. Por eles fui instruída de maneira didática, e sempre bem acolhida pelo professor Ricardo quando me surgiram dúvidas no decorrer da pesquisa. A prontidão do professor Ricardo, em especial nos últimos meses, foi de suma importância para desenvolver este trabalho visto que inúmeros ajustes foram necessários e uma rápida orientação facilitou muito a agilidade do processo.

Fui acolhida e instruída por todo o grupo e isso, aliado à minha grande vontade de aprender, fez a diferença. Aproveito o ensejo para dizer: Muito obrigada, a essa equipe e também as pessoas externas ao laboratório, que me prestaram auxílio e incentivo quando mais precisei.

Agradeço aos meus pais, Ronaldo Rodrigues Garcia e Ione Cit de Miranda Garcia, que embora distantes fisicamente, sempre estiveram presentes em meu coração. Sou grata também aos meus irmãos, em especial, à Josiane Miranda da Silva Villas Boas, que além de irmã, sempre foi uma grande amiga.

Agradeço, por fim, a todos aqueles, que mesmo não sendo citados, contribuíram, direta ou indiretamente, para o êxito da minha jornada.

RESUMO

A hipófise é responsável pela síntese e secreção de hormônios que têm como função permitir a adaptação do organismo ao ambiente. A deficiência de pelo menos um hormônio produzido pela hipófise pode acarretar no hipopituitarismo. A produção destes hormônios pode ser afetada por mutações nos genes envolvidos no desenvolvimento da glândula pituitária. Onze genes estão relacionados com o desenvolvimento da hipófise, sendo que mutações no gene *PROP1* representam 50% dos casos de hipopituitarismo. Amostras de sangue de pacientes com diagnóstico de hipopituitarismo que apresentam perfil clínico relacionado à deficiências no gene *PROP1* (N = 33) foram coletadas no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Paraná, do Hospital de Clínicas. Com o objetivo de detectar mutações no gene *PROP1*, amostras de sangue dos pacientes foram submetidas à extração de DNA e posterior sequenciamento. O sequenciamento foi feito a partir do produto de PCR de 330 pares de base, o qual foi purificado com acetato de amônia e após a reação de sequenciamento foi realizada nova purificação com acetato de amônia. As análises do sequenciamento foram efetuadas com o programa BioEdit Sequence Alignment, e submetidas a alinhamento pelo ClustalW, para comparação da sequência encontrada nas amostras com a correspondente disponível no banco de dados do NCBI. Até o momento foi sequenciado o exon 2 do gene *PROP1* nas amostras dos pacientes e foi detectada em um dos pacientes a deleção de duas bases em um cromossomo e uma deleção maior no outro, sendo um heterozigoto composto. É provável que este paciente seja portador de mais uma mutação ainda não encontrada. Essas deleções provocam alteração do quadro de leitura e ainda não foram descritas na literatura.

Palavras-chave: Hipopituitarismo. *PROP1*. Hipófise.

ABSTRACT

The hypophysis is responsible for the synthesis and secretion of hormones that allow the adaptation of the organism to the environment. The deficiency of at least one hormone produced by the hypophysis can result into the hypopituitarism, and the production of these hormones can be affected by mutations at the genes of the development of the pituitary gland. It has been described eleven genes involved at the hypophysis development, being half of the cases mutations on *PROP1* gene. Blood samples of patients with hypopituitarism diagnosis that exhibit clinical profile similar to deficiencies on *PROP1* gene (N=33), were collected at Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Paraná, of Hospital de Clínicas. In order to detect mutations on *PROP1* gene, the blood samples were submitted to DNA extraction, and then sequenced. PCR product of 330 pairs of base are sequenced, which went purified by ammonium acetate, and after the sequencing, a new purification was realized with ammonium acetate. The sequencing analysis were realized by BioEdit Sequence Alignment program, and submitted to alignment with ClustalW system to compare the sequences obtained at the samples with the sequence correspondent available at NCBI database. The second exon of *PROP1* gene were sequenced, and was detected a deletion of 2 bases in heterozygosis and a bigger deletion the other chromosome in one of the patients. Thus, it's possible that this patient may be carrier of one more mutation not yet found. This case of deletion causes a frameshift, and was not described in papers until then.

Keywords: Hypopituitarism. *PROP1*. Pituitary gland.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo geral.....	2
2.2	Objetivos específicos.....	2
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	3
3.1	Coleta de sangue e extração de DNA.....	3
3.1.1	Protocolo, reagentes e soluções para extração de DNA	3
3.2	Quantificação e diluição do DNA.....	4
3.3	Desenho dos primers, produto de PCR e diluição dos primers	4
3.4	Primeira purificação do produto da PCR	6
3.5	Sequenciamento.....	6
3.6	Segunda purificação do produto da PCR	6
3.7	Análise de dados	6
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
5	CONCLUSÃO	8
6	REFERÊNCIAS.....	9

INTRODUÇÃO

A hipófise, também conhecida como glândula pituitária, é responsável pela síntese e secreção de hormônios que têm como função permitir a adaptação do organismo ao ambiente (SCHNEIDER et al. 2007). A glândula é situada na base do cérebro, composta por dois lobos, anterior e posterior, e produz: hormônio do crescimento, hormônio estimulante da tireóide, prolactina, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante, hormônio adrenocorticotrófico, hormônio antidiurético e ocitocina - GH, TSH, PRL, FSH, LH, ACTH, ADH e OT, respectivamente (RHOADES & TANNER, 2005; GUYTON et al, 2002).

Esses hormônios, atuando em conjunto, são capazes de estimular o crescimento de diversos tecidos, em especial o tecido ósseo, de regular o metabolismo celular, estimular a produção de cortisol e aldosterona, além de promover a reabsorção de água nos túbulos renais (GUYTON; HALL, 2002). Os hormônios hipofisários têm papel distinto em homens e mulheres em relação aos caracteres sexuais: nos homens, estimulam a formação dos espermatozoides e síntese de testosterona; já nas mulheres, estimulam a produção de leite nas glândulas mamárias, e promovem contração uterina durante o trabalho de parto, a contração de músculos lisos nas glândulas mamárias para a expulsão do leite, o desenvolvimento e ruptura dos folículos ovarianos, assim como a liberação do óvulo (GUYTON; HALL, 2002).

A deficiência de um ou mais hormônios produzidos pela hipófise é capaz de acarretar o hipopituitarismo, uma doença endócrina que se desenvolve ao longo da vida do paciente, sendo caracterizada pela incapacidade da hipófise em suprir ao paciente os hormônios que produz em quantidades suficientes para a correta função do organismo (SCHNEIDER *et al.* 2007). O crescimento, puberdade, resposta a estresse, metabolismo, reprodução e lactação são funções que podem ser afetadas pela doença, uma vez que esses sistemas são regulados por hormônios hipofisários (MEHTA & DATTANI, 2008; RHOADES & TANNER, 2005).

A produção desses hormônios pode ser influenciada pela presença de mutações em algum dos genes envolvidos no desenvolvimento da glândula pituitária (MEHTA & DATTANI, 2008). Apesar de existirem causas diversas para o hipopituitarismo, uma pequena parcela dos casos se deve à mutações genéticas em algum dos genes envolvidos no desenvolvimento da glândula pituitária. O perfil clínico da doença se correlaciona com os genes afetados nos casos de mutação, assim como está relacionado à atividade da hipófise e ao tempo embrionário no qual é esperada a atividade no gene (ALATZOGLOU & DATTANI, 2009).

Onze genes estão relacionados com o desenvolvimento da hipófise, sendo mutações no gene *PROP1* responsáveis por 50% dos casos de hipopituitarismo de origem genética, com um fenótipo particular: aumento de tamanho da hipófise, sendo possível evolução ou regressão do quadro, ausência quase total de somatotrofos, lactotrofos, tireotrofos, gonadotrofos e em alguns casos, puberdade atrasada (ALATZOGLOU & DATTANI, 2009). Mutações nesse gene implicam na deficiência de GH, TSH, PRL, FSH, LH, (ALATZOGLOU & DATTANI, 2009).

Com o objetivo de detectar mutações no gene *PROP1*, amostras de sangue de pacientes portadores de hipopituitarismo que apresentam perfil clínico relacionado à deficiências no gene *PROP1* – localizado no braço longo do cromossomo 5, na posição 35.3, foram submetidas à análise, através de sequenciamento, a fim de localizar e identificar possíveis mutações presentes no gene *PROP1*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Detectar mutações no gene *PROP1* em amostras de pacientes adultos portadores de hipopituitarismo idiopático.

2.2 Objetivos específicos

- Sequenciar o gene *PROP1* em amostras de pacientes para identificação das variantes responsáveis pelo quadro clínico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de sangue e extração de DNA

As amostras de sangue dos pacientes (N = 33) foram coletadas no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Paraná, do Hospital de Clínicas.

O DNA das amostras obtidas foi extraído pelo método de *salting out*, no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. O protocolo de extração de DNA por *salting out* inclui etapas onde a camada leucocitária do sangue é submetida a reagentes e soluções químicas no intuito de romper as células, precipitar e desnaturar as proteínas para obtenção do DNA genômico, que foi armazenado em microtubos.

3.1.1 Protocolo, reagentes e soluções para extração de DNA

O sangue com EDTA foi centrifugado a 2500rpm por 20 minutos para separação leucocitária. A camada leucocitária foi depositada em um falcon, adicionado 125µL de IGEPAL CA-630 autoclavado e o volume foi ajustado com TKM1 autoclavado para completar 10mL. A solução foi agitada manualmente, até completa dissolução dos reagentes, e centrifugada por 20 minutos a 2500rpm. O sobrenadante foi desprezado, o volume do falcon foi completado até 10mL com TKM1 autoclavado e o precipitado foi ressuscitado com pipeta Pasteur. A solução foi centrifugada a 2500rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado e a lavagem com TKM1 foi repetida duas vezes. Após desprezar o sobrenadante, foi adicionado 800µL de TKM2- autoclavado e o precipitado foi ressuscitado com a ponteira, e o volume foi transferido para um microtubo de 1,5ml. Foi adicionado 50µL de SDS 10% autoclavado, a solução foi homogeneizada, e incubada em banho-maria a 55°C por duas horas. Em seguida, o microtubo foi retirado do banho-maria, foi adicionado 300µl de solução saturada de NaCl 5M autoclavado e homogeneizado. O microtubo foi centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos e 550µl de sobrenadante foi transferido para microtubo de 2mL. Foi adicionado 1100µl de etanol absoluto gelado, da marca Merck, misturado cuidadosamente por inversão, até aparecimento do precipitado de DNA. O tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 5min, o sobrenadante foi desprezado por inversão com cuidado, para manter o precipitado no tubo. O procedimento foi repetido, com o restante do sobrenadante, no mesmo tubo. O DNA foi lavado com 500µl de etanol (Merck) 70%, centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com pipeta, preservando o precipitado. O microtubo foi colocado em estufa a 37°C para evaporação do álcool, até estar completamente seco. Em seguida, o DNA foi ressuscitado com 200µl de TE autoclavado e incubado em banho-maria a 55°C por 45 minutos, e em seguida, estocado a -20°C.

TKM1		
Tris-HCl – pH 7,6	1M	5MI
KCl	1M	5mL
MgCl ₂	1M	5mL
EDTA – pH 7,6	0,1M	10mL
Água Destilada		475mL
Volume Total		500mL

TKM2		
Tris-HCl – pH 7,6	1M	0,5mL
KCl	1M	0,5mL
MgCl ₂	1M	0,5mL
EDTA	0,1M	1mL
NaCl	1M	20mL
Água Destilada		27,5mL
Volume Total		50mL

TE		
Tris-HCl – pH 8,0	1M	0,5mL
EDTA – pH 8,0	0,1M	0,5mL
Água Destilada		49mL
Volume Total		50mL

3.2 Quantificação e diluição de DNA

As amostras foram quantificadas no Nanodrop, pelo método de espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Após as quantificações, foram realizadas as diluições das amostras em água ultra pura deionizada de acordo com a concentração de cada amostra, para obter uma concentração final de 100 ng/microlitro de DNA.

3.3 Desenho dos primers, produto de PCR e diluição dos primers

Os primers foram desenhados conforme figuras 1 e 2, sendo a figura 1 referente ao primer “a” e a figura 2 correspondente ao primer “b”. Os trechos em azul representam as regiões codificantes dos exons 1 e 2, os trechos em demais cores não são codificadores. As sequencias dos primers, tamanho do fragmento, porcentagem de GC também estão descritas nas figuras.

Figura 1 – Desenho do primer “a”

```

accttcctcatccggcttgtgatcctccc
tgagcaaggggctctggtgaccgtgtagtgtgattggatgggcccacagggcgaggagga
ggtcactcctccaagactcaggggtgggatgggaaagtaggcagctgacagaagggagca
GCATCCCCGTGGGAGAAAGGGCCAGGCCAGAGAAAAGTAGTCAGAAAACAGAGCAACAGGTG
ACGCTGAGGCAGGAGATTGACTGACACTCAAGCCAAGCAAGGGGGAATTAGGAACAAT
TAGAAAAAAGTAAAGACAGTGAAAAGTCAAGACAGCTGCCTGCACCTACACACACAT
TCAGAGACAGAGTCCCAGAGGGTGGCACTACCAAGAGGAGAGAGGGGAGGGAACAGGTGTG
CAAGGAGGCTGCCGAAGCAGACAAAATCTCAAGTCAGAGATTCAGGGACACTTGGTCCCG
TGGCGAGCCAAGGAAGGCAGAAAGGAGGCCCCAGGCTAGAGAGCCAAAGAAGCGCGAGTCG
GCCAGCAACCTCTTGCCTGAGAGACACCCCGCCACTGGCACCCCACCACCACGGTGG
gtgagtgaccgtcccgggtgtgctggtgggtccctgaggaggcGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
cataggctccatgaagaaggttaggaggagaaattaaaacccgaatcctatcatgtttaa
actgtgggaaccttgaagtaaaagggac

```

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	CCAGAGGGTGGCATAACAG	Plus	20	15	34	60.11	60.00	3.00	1.00
Reverse primer	CTTTCAGCCTCACACCGCT	Minus	20	298	279	62.74	60.00	3.00	1.00
Product length	284								

Figura 2 – Desenho do primer “b”

```

tccagtctgggagacagagcaagactctgt
ctcaaaaaaagactggagcagcacaggacgcactgagcgcaatccccgggacaggcacatg
tggtccagcaccgagagcgtcctcctcagaagccgcGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
ACTCGAGTGTCCAGCCTGCAGAAGCTCCCTGGTGCAGGAGGGGCAGCATCAAGGTTCT

```

C C C C A A G G A G G A C A G A G G G C C G C C C G C A C T C C C G G C C G C C C A C C A C C T T C A
 G C C C A G T G C A G T T G G A A C A G C T G G A G T C A G C C T T F G G G A G G A A C A G T A C C C G A C A T C T
 G G G C C G A G A G T C T G C C G G G A C A C T G G C C T C A G T G A G C C C A A T C C A G
 g t g a t g c t c c a g g a t c c t c c t c t c a g g a a a g a a a t g c a g a t t t c t t t g t g c a t c a t
 g g a t g t g g g c a t t a t a a c c c t a a c c t a a a t g g t c a c c a g a c a c a g g c c t c a t c t c a c c
 a c c a g c a t c a g a g c a a c t g c a t t g a g a a t a

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCTCCCTTCTCTCCGTTCTCA	Plus	22	98	119	62.87	59.09	2.00
Reverse primer	ATGCCCAACATTCTATGATAGCACC	Minus	25	427	403	61.27	44.00	7.00
Product length	330							1.00

A amplificação do DNA foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) os conjuntos “a” e “b” de primers para o gene PROP-1, correspondentes aos exons 1 e 2 do gene.

PROP1a: Primer Foward: CCAGAGGGTGGCATAACACAG Tm:55.88

PROP1a: Primer Reverse: CTTTCAGCCTCACACCCGCT Tm: 55.88

Tamanho do Fragmento: 284 pb

PROP1b: Primer Foward: CCCTCCCTTCTCTCCGTTCTCA Tm: 58.56

PROP1b: Primer Reverse: ATGCCCAACATTCTATGATAGCACC Tm: 56.04

Tamanho do Fragmento: 330 pb

Os primers foram diluídos em água ultrapura, para obter volume final de 80 microlitros, e concentração de 50 nanogramas por microlitro.

Para a PCR foram utilizados microtubos de 0,2 mL, preenchidos por 37,5 µl de água ultrapura autoclavada, 5µl de tampão, 1µl de DNTP 10M, 1µl de cada primer, e 1µl de amostra com concentração de 100 nanogramas, com volume final de 50 µl.

Etapa	Temperatura	Tempo	
Hot Start	95°C	2 minutos	
Desnaturação	95°C	30 segundos	35 vezes
Anelamento	52°C	30 segundos	
Extensão	72° C	30 segundos	
Extensão final	72° C	10 minutos	

A PCR do primer “a” foi realizada, mas a amplificação não ficou clara. São necessários mais ajustes no protocolo para amplificação desejada, como ajustar a temperatura de anelamento.

A PCR do primer “b” também foi realizada e a amplificação se deu como esperado. As etapas para sequenciamento do exon 2 do gene foram prosseguidas.

3.4 Primeira Purificação do produto da PCR

Foi adicionado ao produto de PCR 30 µl de acetato de amônia 7,5M e 112,5µl de etanol absoluto, e ficou em repouso por 10 minutos. A solução foi centrifugada por 20 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado por inversão, foi adicionado 100µl de etanol 70% ao microtubo e centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a lavagem com etanol 70% foi repetida. Após desprezar o sobrenadante, o tubo foi colocado em estufa a 37°C até completa evaporação do álcool. Em seguida, o precipitado foi ressuscitado em 15µl de água ultrapura autoclavada. Depois da purificação, o produto da PCR foi quantificado.

3.5 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras de DNA se deu pelo método de Sanger, com o sequenciador automático de DNA modelo ABI-377, pela reação de “Big Dye Terminator Cycle Kit”.

A partir de cada amostra de produto de PCR, foram realizados dois sequenciamentos, um para o primer forward, e outro para o primer reverse. Em cada tubo da reação de sequenciamento foram colocados 100 nanogramas de DNA, 0,5µl de primer, 1 µl de Big Dye e ajustado com água ultrapura autoclavada para volume final de 10µl. A reação ocorreu conforme protocolo descrito na tabela 3.

96°C	60 segundos	
96°C	10 segundos	35 vezes
52°C	5 segundos	
60°C	4 minutos	
60°C	4 minutos	

3.6 Segunda Purificação do produto de PCR

Depois da reação de sequenciamento, a amostra foi novamente purificada. Foram adicionados à amostra 2µl de acetato de amônia 7,5M, 10µl de água ultrapura autoclavada, 65µl de etanol absoluto, e a reação ficou em repouso por 10 minutos. A amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado por inversão e o tubo foi lavado com 200µl de etanol 70% duas vezes, o sobrenadante foi desprezado por inversão e o tubo secou em estufa a 37°C até completa evaporação do álcool. Em seguida, o tubo foi encaminhado para sequenciamento.

3.7 Análise de Dados

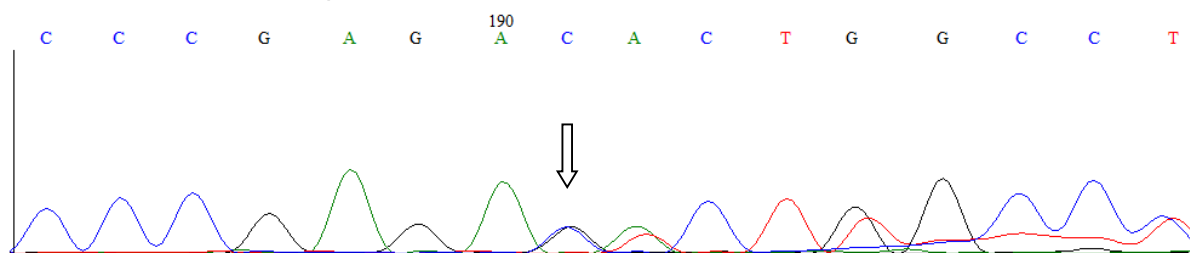
A análise dos resultados do sequenciamento foi efetuada pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Foi feito o alinhamento das sequências obtidas com a sequência referência do gene, disponível no banco de dados da NCBI,

através do ClustalW, presente no BioEdit. Também foi feita uma inspeção visual no eletroferogramas para a detecção das mutações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 33 amostras analisadas, apenas uma mostrou alterações na região analisada. Esta, apresentou deleção de duas bases em um cromossomo e uma deleção maior no outro cromossomo, um heterozigoto composto, conforme figuras 3 e 4, acarretando mudança no quadro de leitura dos aminoácidos a partir dessas deleções.

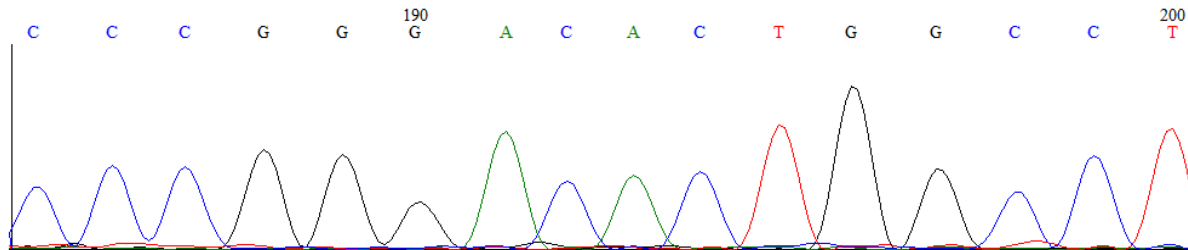
Figura 3 – Cromatograma de um fragmento do exon 2 do gene PROP1 com deleção de duas bases em uma das fitas a partir da flecha.



Alterações no DNA que resultam em adição ou remoção de um par de bases ou mais pode ter consequências drásticas para a proteína cuja estrutura é codificada no DNA. Visto que o código genético é lido em blocos de três bases a partir de um ponto de início fixado, adição ou remoção de bases de DNA leva a de perda do quadro de leitura de referência. Embora a sequência de bases na leitura seja correta antes do ponto de alteração, o processo de tradução seleciona códons inadequadamente, resultando em leitura contínua de aminoácidos indesejados, inadequados. Normalmente a leitura desses códons inapropriados leva ao encontro de um códon de terminação. Tanto a adição ou remoção de pares de bases de DNA pode ter essas consequências, desde que o número de bases adicionadas ou removidas não seja múltiplo de três. A remoção de duas bases (+1 frameshift) é interpretado na leitura como adição de uma única base, movendo o quadro de leitura uma base para trás. Se houver uma mutação de sinal inverso, que mova o quadro de leitura uma base à frente (-1 frameshift), essas mutações são corretivas. É comum a existência de duas mutações próximas, para a correção dessas mutações ser possível. Pares de mutações deste tipo são frequentemente encontrados, levando mutações de mudança de quadro de leitura ao seu estado anterior. Uma proteína funcional pode ser produzida se uma segunda mutação de mudança de quadro de leitura ocorrer próximo ao local da primeira mutação de quadro de leitura. Em modo de leitura adequado, essa proteína produz uma sequência de aminoácidos normal, exceto no trecho entre as duas mutações, onde essa proteína deve possuir aminoácidos inapropriados (ROTH, 1974).

As demais amostras não apresentaram mutações ou mudanças de quadro de leitura, conforme figura 4. Estas deleções ainda não foram descritas na literatura, sendo provável que este paciente seja portador de mais uma mutação ainda não encontrada.

Figura 4 – Cromatograma de um fragmento do exon 2 do gene PROP1 sem alterações.



5. CONCLUSÃO

O sequenciamento do éxon 2 do gene PROP1 dos pacientes diagnosticados com hipopituitarismo neste estudo apontou em um dos pacientes a deleção de duas bases em um cromossomo e uma deleção maior no outro, sendo estas deleções ainda não descritas na literatura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALATZOGLOU, Kyriaki S.; DATTANI, Mehul T. Genetic forms of hypopituitarism and their manifestation in the neonatal period. **Early human development**, 2009, 85.11: 705-712.

BUDOWLE, Bruce, et al. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. **American journal of human genetics**, 1991, 48.1: 137.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Os hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 791-801.

HALL, Tom A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. London: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

MEHTA, Ameeta; DATTANI, Mehul T. Developmental disorders of the hypothalamus and pituitary gland associated with congenital hypopituitarism. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2008, 22.1: 191-206.

ORITA, Masato, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, 1989, 5.4: 874-879.

RHOADES, Rodney A.; TANNER, George A. **Fisiologia Médica**. Tradução espanhola. 1996.

ROTH, John R. Frameshift mutations. **Annual review of genetics**, v. 8, n. 1, p. 319-346, 1974.

SCHNEIDER, Harald Jörn, et al. Hypopituitarism. **The Lancet**, 2007, 369.9571: 1461-1470.