

Efeito Fundador da Mutação E180splice no Gene do Receptor de Hormônio de Crescimento Identificada em Pacientes Brasileiros Com Insensibilidade ao GH

artigo original

Alexander A. de Lima Jorge
Hamilton C. de Menezes Filho
Theresa S. Soares Lins
Dulce Rondini Guedes
Durval Damiani
Nuvarte Setian
Ivo J. Prado Arnhold
Berenice B. de Mendonça

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (AALJ, IJPA, BBM), Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), SP; Unidade de Endocrinologia Pediátrica (HCMF, DRG, DD, NS), Instituto da Criança, FMUSP, SP; e Instituto Materno Infantil de Pernambuco (TSSL), Recife, PE.

Recebido em 19/08/04
Revisado em 27/10/04
Aceito em 20/11/04

RESUMO

Estudamos o gene do receptor de hormônio de crescimento (GHR) de 6 pacientes com síndrome de Laron (SL) provenientes de 4 famílias distintas. Os exons 2 a 10 foram amplificados por pares de *primers* intrônicos. Os produtos de PCR foram seqüenciados diretamente. Os 6 pacientes possuíam no exon 6, codon 180, a troca GGA>GAA em homozigose. Esta mutação não altera o aminoácido traduzido, porém cria um novo sítio de *splice* que causa a deleção de 8 aminoácidos do domínio extracelular do GHR. Para avaliar um efeito fundador da mutação E180*splice*, os membros das 4 famílias foram genotipados para 4 regiões intragênicas polimórficas: a presença ou ausência do exon 3, dois polimorfismos de um único nucleotídeo presentes nos exons 6 e 10 e o sítio polimórfico no intron 9. Todos os pacientes apresentavam o mesmo haplótipo destas 4 regiões. A mutação E180*splice* foi descrita anteriormente em uma comunidade andina no sul do Equador descendente de espanhóis e também numa família judia de Israel. Nossas famílias compartilham o mesmo haplótipo do intron 9 observado nestes pacientes. Concluímos que a mutação E180*splice* é uma importante causa de IGH no Brasil e a presença do mesmo haplótipo em nossos pacientes, nos pacientes equatorianos e israelenses com a mutação E180*splice* é forte indicio do efeito fundador desta mutação. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/3:384-389)

Descritores: Transtornos do crescimento; Genética; Receptores do hormônio do crescimento; Deficiência

ABSTRACT

Founder Effect of E180*splice* Mutation in Growth Hormone Receptor Gene (GHR) Identified in Brazilian Patients With GH Insensitivity.

We studied the growth hormone receptor (GHR) gene in 6 patients with Laron syndrome (LS) from 4 unrelated families. Exons 2 to 10 were amplified by PCR using specific intronic pairs of primers. The PCR products were directly sequenced. Our results showed that all 6 patients carried a homozygous GAG>GAA mutation in codon 180 of exon 6. This mutation did not change the translated amino acid, but created an abnormal splice site deleting 8 amino acids from the extracellular domain of GHR. Members of all 4 kindreds with the E180*splice* mutation were genotyped for 4 polymorphic intragenic sites: The retention or exclusion of exon 3, single nucleotide polymorphisms present in exons 6 and 10, and intron 9 polymorphic site. All 6 patients presented the same haplotype. The E180*splice* mutation was first described in a population of Spanish descendants from the Andes of Southern Ecuador. This mutation was also found in oriental Jewish patients from Israel. Our families share the same intron-9 haplotype observed in Ecuadorian and Israeli patients. We conclude that the E180*splice* mutation is an important cause of LS in Brazil and there is probably a founder effect since our patients, Ecuadorian and Israeli patients share the same haplotype in intron 9. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/3:384-389)

Keywords: Growth disorders; Genetics; Somatotropin receptors; Deficiency

AINSENSIBILIDADE AO HORMÔNIO de crescimento (IGH ou síndrome de Laron) é definida como a inabilidade dos tecidos-alvo de responderem normalmente à ação do GH. Os pacientes apresentam níveis elevados ou inapropriadamente normais de GH, acompanhados de níveis baixos de IGF-I, e não respondem ao tratamento com GH exógeno (1). A IGH é causada por mutações em homozigose ou em heterozigose composta no gene do receptor de GH (GHR).

Apenas 6 pacientes brasileiros com síndrome de Laron foram descritos até o presente momento (tabela 1). Os dois primeiros pacientes, irmãos nascidos de pais primos de primeiro grau de origem italiana, apresentavam história clínica de hipoglicemia neonatal e fenótipo clássico de IGH (2). Do ponto de vista molecular, estes pacientes apresentam uma troca do nucleotídeo G por T na posição -1 do *intron 6* (3). Esta mutação altera um nucleotídeo extremamente conservado na posição de consenso do sítio de reconhecimento de *splice*, porém o seu efeito sobre a estrutura do RNA mensageiro não foi comprovado. Três outros pacientes com quadro clássico de IGH foram descritos: um menino fruto de casamento não consanguíneo de origem italiana e portuguesa (4), uma menina com pais consanguíneos (4) e uma criança adotiva procedente de Pernambuco (5). Todos estes 3 pacientes não foram estudados do ponto de vista molecular. Recentemente, descrevemos o sexto paciente brasileiro com IGH (6). Trata-se de um adolescente masculino nascido de pais consanguíneos naturais de Souza, Paraíba, com quadro clínico clássico de síndrome de Laron. Laboratorialmente o paciente apresentava níveis elevados de GH com níveis baixos de IGF-I e GHBP, porém com níveis

normais de IGFBP-3. O estudo molecular demonstrou a presença de uma mutação em homozigose no *exon 7* que leva à troca do aminoácido serina por isoleucina no *codon 226* (S226I) (6).

O objetivo deste trabalho é descrever do ponto de vista clínico, laboratorial e molecular, 6 novos casos de IGH oriundos de 4 famílias procedentes do interior de Pernambuco. Também avaliamos nestas famílias a presença de efeito fundador da mutação identificada, E180splice.

PACIENTES E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pela comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (nº 050/98), os pacientes ou seus responsáveis legais foram devidamente informados sobre o estudo e deram seu consentimento para a realização do mesmo. A casuística é constituída de 6 pacientes com IGH e os dados clínicos e hormonais estão na tabela 1 (pacientes 7 a 12). Os pacientes 7 a 10 são acompanhados na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança da FMUSP, São Paulo, e os pacientes 11 e 12 são acompanhados no Instituto Materno Infantil de Pernambuco, Recife. Os dados clínicos foram fornecidos pelos médicos responsáveis pelos pacientes.

DOSAGENS HORMONAIS

O GH foi determinado por ensaio imunofluorométrico (AutoDELFLIA™, Wallac, Turku, Finlândia). As

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes brasileiros com síndrome de Laron previamente descritos (1-6) e os relatados neste trabalho (7-12).

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Família	I	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	VIII	IX	IX
Sexo	M	M	M	F	M	M	F	M	M	F	M	M
Idade (anos)	8,0	13,0	16,2	7,8	12,0	15,7	17,8	8,8	11,3	6,8	19,1	3,2
Altura (cm)	76,0	87,5	117,5	71,0	87,8	124,0	116,5	103,3	113,8	81,0	132,0	69,0
Z da Altura	-9,4	-8,5	-7,9	-9,2	-8,3	-6,1	-7,8	-5,0	-4,5	-7,6	-6,4	-7,4
Peso (Kg)	10,0	12,4	DI	DI	11,1	43,4	33,0	27,8	32,0	9,3	46	7,3
Z do IMC	+0,9	-0,9	DI	DI	-1,9	2,3	1,1	3,1	2,4	-0,9	1,5	-0,4
Fenótipo clássico	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
GH basal (µg/L)	22 ^a	11-19 ^a	1,1 ^b	62,5 ^b	26 ^b	4-15 ^b	30-17 ^b	7,2 ^b	3,3 ^b	DI	1,6 ^b	DI
GH pico (µg/L)	>40 ^a	35,5 ^a	68 ^b	278 ^b	52 ^b	33 ^b	94 ^b	118 ^b	36 ^b	DI	38 ^b	39 ^b
IGF-I (µg/L)	NR	<3 ^c	0,08 ^c	0,46 ^c	22,5	151	23	< 18	< 18	< 18	51	< 18
Δ IGF-I no TG	NR	0	0	+0,2	+1,5	-6	+9	0	0	0	NR	NR
IGFBP-3 (mg/L)	NR	NR	NR	NR	0,1	3,5	0,6	NR	0,6	0,4	NR	NR
Δ IGFBP-3 no TG	NR	NR	NR	NR	NR	-0,6	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Mutação no GHR	IVS6 -1 G > T		NR	NR	NR	S226I	E180splice					
Referência	(2,3)		(4)		(5)		Presente estudo					

a: Dosagens de GH realizadas por radioimunoensaio; b: Dosagens de GH realizadas por método IFMA; c: Valores expressos em U/ml; NR: Não realizado; DI: Dado indisponível; TG: Teste de glicação.

dosagens de IGF-I e IGFBP-3 foram realizadas por ensaio imunorradiométrico (kit Diagnostic Systems Laboratories Inc – DSL, Webster, Tx, USA). O teste de geração de IGF-I e IGFBP-3 foi realizado com 4 dias de aplicações subcutâneas noturnas de hormônio de crescimento recombinante humano (hGH) na dose de 0,1U/kg/dia (ou 33µg/kg/dia) com coletas de sangue periférico para dosagens de IGF-I e IGFBP-3 na manhã antes da primeira e 12 horas após a última aplicação de hGH. A ausência de resposta no teste de geração foi definida como um incremento de IGF-I <15µg/L e um incremento de IGFBP-3 <0,4mg/L em relação aos valores basais (7).

ESTUDO MOLECULAR

O DNA genômico dos pacientes e familiares foi extraído de leucócitos periféricos seguindo o protocolo descrito por Miller e cols. (8). A região codificadora do gene GHR foi amplificada por reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando pares de *primers* intrônicos que flanqueiam os *exons* 2 a 10 (a sequência dos *primers* e os protocolos de amplificação serão fornecidos, se requisitado). Os produtos de PCR destes *exons* foram diretamente seqüenciados utilizando o kit ABI Prism™ BigDye Terminator (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) e analisados em um seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyser 3100 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer Foster City, CA, USA).

A avaliação do efeito da variante alélica encontrada sobre o *splicing* foi feita utilizando o programa preditor de sítios de *splice* (Splice Site Prediction by

Neural Network – http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), que realiza uma comparação da seqüência informada com um banco de seqüências de sítios de *splice* bem caracterizados, calculando um escore de 0 a 1, que indica a probabilidade da região ser um verdadeiro sítio doador ou receptor de *splice* (9).

Para avaliar um possível efeito fundador da mutação E180splice, quatro regiões intragênicas polimórficas do GHR foram estudadas nos pacientes e seus familiares: 1) a presença (GHRp3) ou ausência (GHRd3) do *exon* 3 do GHR avaliada pela metodologia descrita por Pantel e cols. (10); 2) a variante GGA>GGG (11) do *codon* 168 no *exon* 6 foi avaliada através da eletroforese dos produtos de PCR em um gel com gradiente de desnaturação (DGGE); 3) a região do *intron* 9 que apresenta 6 polimorfismos de um nucleotídeo que formam 6 diferentes haplótipos foi genotipada por seqüenciamento direto (12); 4) a variante CTC>ATC do *codon* 526 (L526I) no *exon* 10 foi avaliada através da digestão enzimática dos produtos de PCR pela enzima de restrição HpyCH4V (13). A distribuição das diferentes variantes alélicas presentes destas 4 regiões foi, também, avaliada na população controle de altura normal (tabela 2).

RESULTADOS

Os seis pacientes portadores de IGH descritos neste trabalho são de famílias originárias do interior de Pernambuco, todas da cidade de Orobó. A família IX ainda reside em Orobó enquanto a Família VI reside em Cubatão, SP, e as famílias VII e VIII residem em São Paulo, SP. Os pais do paciente 8 (família VII) são

Tabela 2. Frequência dos polimorfismos do GHR na população controle.

n	Localização		Variante Alélica	Frequência Alélica	Ref.
	Exon/Intron	Codon			
138	Exon 3	--	GHRp3 > GHRd3	p3 - 62% d3 - 38%	(13)
70	Exon 6	168	GGA > GGG	G - 61% A - 39%	(13)
70	Intron 9		+ 199 T, +112 A, +124 G, +168 C* +199 C, + 212 del TT* + 112 G, + 212 del TT* + 212 del TT* +124 A, + 212 del T* +168 T*	Haplótipo I - 53% Haplótipo II - 20% Haplótipo III - 17% Haplótipo IV - 7% Haplótipo V - 1,5% Haplótipo VI - 1,5%	(12)
134	Exon 10	526	CTC > ATC	A - 66% C - 34%	(13)

n: número de alelos estudados; GHRp3: GHR com *exon* 3; GHRd3: GHR com deleção do *exon* 3.

*: os números são referentes à posição do nucleotídeo em relação ao início do *intron* 9.

elevados de GH, os pacientes com IGH apresentam níveis de IGF-I e IGFBP-3 extremamente baixos, assim como os da subunidade ácido-lábil (ALS) que não se elevam após a aplicação de GH exógeno. Do mesmo modo que os níveis de GH, as dosagens de IGF-I e IGFBP-3 também apresentam grande variabilidade. A proteína ligadora do GH (GHBP) encontra-se ausente ou em baixos níveis na maioria dos pacientes estudados (18).

Duas abordagens podem ser utilizadas para o diagnóstico da insensibilidade ao GH: a avaliação bioquímica e a análise molecular do gene GHR. A análise molecular, ainda não disponível comercialmente, deve ser realizada frente ao diagnóstico bioquímico para confirmar a presença de alteração no gene do GHR. Blum e cols. em 1994 avaliaram os dados clínicos e laboratoriais de 38 pacientes com insensibilidade ao GH e criaram um escore que é utilizado até os dias de hoje para o diagnóstico de IGH (tabela 3) (7). A obtenção de cinco ou mais pontos estabelece o diagnóstico da insensibilidade completa ao hormônio de crescimento. Estes critérios de avaliação não incluem outros dados que possam auxiliar o diagnóstico, tais como história familiar, apresentação clínica e os estudos moleculares que permitem confirmar o diagnóstico em casos duvidosos.

A maioria dos pacientes com IGH apresenta mutações no gene do receptor de GH (GHR). Até o presente momento, foram descritas 43 mutações no gene GHR relacionadas com a IGH (20) encontradas em 90% dos casos em homocigose ou heterocigose composta. A maioria das mutações determina níveis baixos de GHBP (88%), e encontra-se localizada na porção extracelular do GHR (84%) e causam insensibilidade ao GH por diminuir a expressão do receptor na superfície celular ou por destruir o sítio de ligação do GHR ao GH. Outras mutações podem interferir no processo de dimerização ou ainda nos mecanismos de transdução do sinal.

Os seis pacientes descritos neste artigo apresentam fenótipo clássico da IGH. Todas as 4 famílias são originárias da cidade de Orobó, que se localiza no agreste pernambucano. Orobó possui 22 mil habitantes, e dados dos últimos censos fornecidos pelo

IBGE demonstram uma população estável com baixo fluxo migratório nas últimas décadas (21). Em uma comunidade com estas características é difícil afastar consangüinidade e parentesco distante entre os membros destas 4 famílias originárias da mesma microrregião. Todas estas famílias compartilham a mesma mutação no GHR (E180splice) e a mesma seqüência em 4 regiões polimórficas intragênicas. Entre estas, a variante alélica encontrada no *exon* 10 (CTC526ATC) é a mais informativa. Os pacientes compartilham o alelo CTC nesta posição e a freqüência deste alelo na população normal é de 34% (ou 1/3). Assim sendo, a probabilidade de que a associação entre este polimorfismo e a mutação E180splice nas 4 famílias estudadas seja fruto do acaso é de aproximadamente 1/81 ou 1,2%, indicando a presença do efeito fundador para a mutação E180splice presente nestas 4 famílias.

A mutação E180splice foi também descrita em uma comunidade andina isolada no sul do Equador descendente de espanhóis (14) e em dois pacientes de Israel com ancestrais marroquinos (15). As nossas 4 famílias compartilham o mesmo haplótipo (tipo I) da região altamente polimórfica do *intron* 9 dos pacientes Equatorianos e Judeus (15). O haplótipo tipo 1 possui uma freqüência na população de 50% (ou 1/2); assim, a probabilidade da sua presença nas 6 famílias descritas com a mutação E180splice seja fruto do acaso é de aproximadamente 1/64, sendo sugestivo do efeito fundador desta mutação. Podemos inferir que a mutação E180splice surgiu na região mediterrânea ou no oriente médio e foi trazida para o Equador e para o nordeste brasileiro por judeus forçados a se converterem ao cristianismo (cristãos novos) durante o período da inquisição (1591-1595) (22).

Com a descrição destes 6 novos casos, totalizam-se até o momento 12 pacientes brasileiros descritos com IGH, todos com a forma clássica da síndrome. A falta de casos com fenótipo mais leve da IGH em nosso meio sugere que pacientes com IGH, que não apresentam características clínicas de deficiência grave da ação do GH, estejam sendo subdiagnosticados. A prática corrente na investigação da baixa

Tabela 3. Critérios de Blum e cols. para o diagnóstico da IGH forma clássica (7).

Parâmetro	Critério	Pontuação
Z da altura	< -3 DP	1
GH basal aleatório (valor mínimo)	> 4µg/l	1
Z do IGF-I basal	< -2 DP	1
Z do IGFBP-3 basal	< -2 DP	1
Incremento de IGF-I durante o teste de geração	< 15µg/l	1
Incremento de IGFBP-3 durante o teste de geração	< 400µg/l	1
GHBP	Níveis baixos ou indetectáveis	1

estatura é incluir quase sempre a avaliação da secreção de GH, porém em muitos serviços não se realizam rotineiramente dosagens de IGF-I e IGFBP-3. Sem as dosagens destes dois peptídeos não é possível suspeitar de IGH em pacientes sem quadro clínico evidente.

Em conclusão, a mutação E180splice é uma causa importante de IGH no Brasil e decorre de um efeito fundador provavelmente com origem em comunidades judaicas do mediterrâneo.

AGRADECIMENTOS

Trabalho realizado parcialmente com auxílio financeiro da Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Projeto temático 00/14092-4. AALJ é bolsista FAPESP (#02/09687-4). BBM e IJPA possuem auxílio do Conselho Nacional de Pesquisa (CnPq), processos #031246/1995-5 e #303444/2002-9 respectivamente.

REFERÊNCIAS

1. Laron Z. Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958-2003. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1031-44.
2. Saldanha PH, Toledo SP. Familiar dwarfism with high IR-GH: report of two affected sibs with genetic and epidemiologic considerations. *Hum Genet* 1981;59:367-72.
3. Berg MA, Argente J, Chernauek S, Gracia R, Guevara-Aguirre J, Hopp M, et al. Diverse growth hormone receptor gene mutations in Laron syndrome. *Am J Hum Genet* 1993;52:998-1005.
4. Setian N, Damiani D, Dichtchekenian V, Kuperman H, Marcondes E. Síndrome de Laron – uma causa de baixa estatura grave. *Pediatria (São Paulo)* 1990;11/12:30-4.
5. Bandeira F, Camargo K, Caldas G, Rosenbloom A, Stabler B, Underwood L. Primary Growth Hormone Insensitivity Syndrome – A case report. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1997;41:198-200.
6. Jorge AA, Souza SC, Arnhold IJ, Mendonça BB. The first homozygous mutation (S226I) in the highly-conserved WSXWS-like motif of the GH receptor causing Laron syndrome: suppression of GH secretion by GnRH analogue therapy not restored by dihydrotestosterone administration. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:36-40.
7. Blum WF, Cotterill AM, Postel-Vinay MC, Ranke MB, Savage MO, Wilton P. Improvement of diagnostic criteria in growth hormone insensitivity syndrome: solutions and pitfalls. Pharmacia Study Group on Insulin-like Growth Factor 1 Treatment in Growth Hormone Insensitivity Syndromes. *Acta Paediatr Suppl* 1994;399:117-24.
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
9. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997;4:311-23.

10. Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem* 2000;275:18664-9.
11. Sanchez JE, Perera E, Baumbach L, Cleveland WW. Growth hormone receptor mutations in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4079-83.
12. Amselem S, Duquesnoy P, Attree O, Novelli G, Bousnina S, Postel-Vinay MC, et al. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 1989;321:989-95.
13. Jorge AA. Estudo do receptor de GH em crianças com baixa estatura idiopática por provável insensibilidade primária ao hormônio de crescimento. [Tese de Doutorado] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.
14. Berg MA, Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL, Rosenfeld RG, Francke U. Mutation creating a new splice site in the growth hormone receptor genes of 37 Ecuadorean patients with Laron syndrome. *Hum Mutat* 1992;1:24-32.
15. Berg MA, Peoples R, Perez-Jurado L, Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL, Laron Z, et al. Receptor mutations and haplotypes in growth hormone receptor deficiency: a global survey and identification of the Ecuadorean E180splice mutation in an oriental Jewish patient. *Acta Paediatr Suppl* 1994;399:112-4.
16. Savage MO, Blair JC, Burren CP, Camacho-Hubner C, Woods KA, Metherell L, et al. Phenotypic variability in growth hormone insensitivity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15(suppl. 5):1449-50.
17. Laron Z. Natural history of the classical form of primary growth hormone (GH) resistance (Laron syndrome). *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12(suppl. 1):231-49.
18. Woods KA, Dastot F, Preece MA, Clark AJ, Postel-Vinay MC, Chatelain PG, et al. Phenotype: genotype relationships in growth hormone insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3529-35.
19. Savage MO, Blum WF, Ranke MB, Postel-Vinay MC, Cotterill AM, Hall K, et al. Clinical features and endocrine status in patients with growth hormone insensitivity (Laron syndrome). *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1465-71.
20. Krawczak M, Ball EV, Fenton I, Stenson PD, Abeyasinghe S, Thomas N, et al. Human gene mutation database – A biomedical information and research resource. *Hum Mutat* 2000;15:45-51.
21. Base de informações do censo demográfico 2000: resultados da amostra por município. <http://www.censo.ibge.gov.br/>. IBGE, Brasília, 2003.
22. Grimberg K. Nova Língua Interior: 500 anos de história dos judeus no Brasil. In: IBGE (ed) *Brasil: 500 anos de povoamento*. 1 ed. Brasília: IBGE; 2000.

Endereço para correspondência:

Alexander A.L. Jorge
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, 2º andar, bloco 6 (PAMB)
05403-900 São Paulo, SP
Fax: (11) 3069-7519
E-mail: alexj@usp.br