PATRICIA NASCIMBEM PUGLIESE PIRES

Pesquisa de mutações no gene do receptor do secretagogo de hormônio de crescimento (*GHSR*) em crianças com baixa estatura idiopática e deficiência isolada de hormônio de crescimento

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

Programa de: Endocrinologia

Orientador: Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pires, Patricia Nascimbem Pugliese
Pesquisa de mutações no gene do receptor do secretagogo de hormônio de crescimento (*GHSR*) em crianças com baixa estatura idiopática e deficiência isolada de hormônio de crescimento / Patricia Nascimbem Pugliese Pires. -- São Paulo, 2011.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Grelina/genética 2.Receptores de grelina/genética 3.Receptores de grelina/deficiência 4.Insuficiência de crescimento/genética 5.Hormônio do crescimento humano/genética 6. Hormônio do crescimento humano/deficiência 7.Puberdade tardia/genética 8.Puberdade tardia/etiologia

USP/FM/DBD-278/11

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42) e na Unidade de Endocrinologia-Genetica (LIM/25) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com o apoio da CNPq (143524/2008-9) e FAPESP (09/00313-3).

Dedicatória

À minha família

Agradecimentos

Inicialmente quero agradecer a todos os professores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela minha excelente formação como médica e pessoa. Especialmente agradeço à disciplina de Endocrinologia pela minha formação em endocrinologia, especialidade que amo, e pela possibilidade de realizar este Doutorado.

Ao meu orientador, Dr Alexander Augusto de Lima Jorge, modelo exemplar de médico e pesquisador, agradeço aos inúmeros ensinamentos, que vão muito além da tese de Doutorado. O Alex é um orientador extremamente presente, solícito e motivador. Aprendi muito com ele sobre endocrinologia, biologia molecular, computação, pesquisa e muitas outras coisas. Agradeço também por seu interesse e disposição em discutir casos clínicos diversos, me ajudando em minha prática profissional. Fora a pessoa especial que ele é: íntegro, atencioso e amigo.

Ao Dr Ivo Arnhold, pelas discussões, orientações e revisões que foram fundamentais para o meu aprendizado em Endocrinologia pediátrica e que contribuíram de forma imprescindível para a finalização deste projeto de Doutorado.

À Dra Berenice Mendonça e à Dra Ana Cláudia Latrônico, que nos ensinam muito e sempre nos dão excelentes sugestões para aperfeiçoar nosso trabalho. São exemplos de sabedoria e sensatez que nos inspiram a buscar a excelência. Agradeço também a todos os pós-graduados, assistentes e professores do LIM 42 pelos ensinos e discussões valiosas no ambulatório.

Agradeço a todos os funcionários do LIM 42 pela boa vontade e competência que levam ao bom funcionamento do laboratório, sem o qual seria impossível realizar o trabalho de bancada. Gostaria de agradecer em especial à Mirian Nishi e à Mariana Funari pela ajuda com as técnicas de biologia molecular, e à Luciana Bussmann pela ajuda na técnica de Elisa.

Agradeço à Dra Sandra Villares e à aluna Tais Arthur por compartilharem seus dados comigo, enriquecendo assim meu trabalho.

Agradeço ao Dr Alan Kopin e sua equipe do Tufts-New England Medical Center de Boston, Massachusetts, pela realização dos estudos funcionais que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas que fazem do laboratório um local de convívio muito agradável. Em especial quero agradecer às colegas do grupo de crescimento. À Débora Coutinho, Luciana Montenegro e Everlayny Costalonga, pelo exemplo e inspiração para seguir em frente. À Alexandra Ribeiro, que foi minha companheira desde o início e com quem dividi dificuldades e angústias, mas também a alegria de vermos nossos projetos finalizados. À Andrea Leal, minha fiel escudeira no ambulatório e uma pessoa especial que sempre me contagia com seu bom humor e alegria, e que espero que em breve se junte a turma de “doutoras”! À Marcela França, Adriana Ferraz, Fernanda Corrêa e Aline Otto, pela amizade e apoio em todos os momentos. Saibam que a convivência com vocês fez destes anos de doutorado uma fase inesquecível da minha vida e que deixou muitas saudades!

Às minhas queridas irmã Joyce e cunhada Ana Paula, por sempre me acolherem tão bem e serem pessoas tão maravilhosas.

Aos meus amados pais, Antônio Carlos e Maria Cecília, agradeço por tudo o que me ensinaram e me proporcionaram, me fazendo ser o que sou hoje. Agradeço por seus conselhos que sempre me ajudam a tomar decisões mais corretas e por seu apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amado marido Vitor, esposo maravilhoso, amigo e companheiro, agradeço por seu amor e incentivo que são fundamentais para todas as minhas conquistas e realizações.

Epígrafe

Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar seu último limite e dar o melhor de si.

Ayrton Senna

Resumo

Pires, PNP. Pesquisa de mutações no gene do receptor do secretagogo de hormônio de crescimento (*GHSR*) em crianças com baixa estatura idiopática e deficiência isolada de hormônio de crescimento [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011: 85p.

A ghrelina, hormônio secretado principalmente por células gástricas, liga-se ao seu receptor, o receptor de secretagogo de GH (GHSR - *Growth hormone secretagogue receptor*), localizado no hipotálamo e na hipófise, estimulando a síntese e secreção do GH. Recentemente foram identificadas mutações no gene *GHSR* em crianças com baixa estatura idiopática (BEI) e com deficiência isolada de GH (DGH). No presente estudo investigamos a presença de mutações no gene *GHSR* em crianças com DGH isolada de causa não identificada e crianças com BEI, incluindo um subgrupo de crianças com atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento (ACCD). Foram selecionados 14 pacientes com deficiência isolada de GH sem alterações anatômicas da região hipotálamo-hipofisária e 96 pacientes com BEI, destes 31 (32%) apresentavam ACCD. Também foram estudados 150 controles adultos e 197 crianças controle com crescimento e puberdade normais. A região codificadora do *GHSR* foi amplificada utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos, seguida de purificação enzimática e seqüenciamento automático. Encontramos 6 variantes alélicas em heterozigose no *GHSR*: nenhuma delas presente nos controles estudados, e quatro destas variantes estão localizadas em regiões conservadas do gene. Uma variante foi encontrada em uma paciente do grupo DGH (p.Val249Leu) e as outras cinco (c.-6 G>C, p.Ser84Ile, p.Val182Ala, p.Ala169Thr e p.Ala358Thr) foram encontradas em pacientes do subgrupo ACCD do grupo BEI. As variantes missense foram submetidas a estudo funcional que evidenciou que as mutações p.Ser84Ile e p.Val182Ala possuem diminuição na atividade basal associadas à diminuição da expressão do receptor na superfície celular. Adicionalmente, a mutação p.Ser84Ile também apresenta redução na atividade do GHSR induzida pelo ligante. A variante p.Val249Leu foi encontrada em uma paciente do sexo feminino com diagnóstico de DGH isolado. A falta de segregação familiar associada à ausência de déficit

funcional da variante nos estudos *in vitro* sugere que, neste caso, a variante p.Val249Leu não é a causa do fenótipo de DGH nesta família e trata-se de uma variante alélica rara. As 5 variantes alélicas no GHSR (c.-6 G>C, p.Ser84Ile, p.Val182Ala, p.Ala169Thr e p.Ala358Thr) encontradas nos pacientes com BEI foram identificadas apenas naqueles com puberdade atrasada, ou seja, pertencentes ao subgrupo ACCD (3 do sexo masculino e 2 do sexo feminino). A freqüência de variantes neste grupo de pacientes foi de 16%, significativamente maior que nos outros grupos, e a ausência de variantes gênicas novas no grupo de crianças obesas com altura normal e mesmo no grupo de crianças com BEI sem ACCD sugere que nosso achado não foi casual e que as alterações descritas podem estar associadas ao fenótipo de ACCD. Os estudos *in vitro* mostraram prejuízos funcionais em 2 destas variantes (p.Ser84Ile e p.Val182Ala) porém, devido à limitação dos estudos funcionais (celulas heterólogas) não podemos afastar que as demais não tenham algum impacto funcional in vivo. Em conclusão, nossos resultados sugerem um envolvimento dos defeitos no *GHSR* na etiologia do atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento em uma parcela de pacientes com esta condição.

Descritores: 1.GRELINA/genética, 2.RECEPTORES DE GRELINA/genética, 3.RECEPTORES DE GRELINA/deficiência. 4.INSUFICIÊNCIA DE CRESCIMENTO/genética, 5. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO/deficiência, 6.HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO/genética, 7.PUBERDADE TARDIA/genética, 8.PUBERDADE TARDIA/etiologia

Abstract

Pires, PNP. Growth Hormone Secretatogue Receptor Gene (*GHSR*) analysis in patients with idiopathic short stature (ISS) and patients with isolated growth hormone deficiency [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2011: 85p.

Ghrelin, hormone secreted by gastric cells, stimulates growth hormone secretion by acting on its receptor GHSR, located in the hypothalamus and pituitary. Recently, mutations in the *GHSR* gene were described in patients with growth hormone deficiency (GHD) and idiopathic short stature (ISS). In the present study we analyzed the *GHSR* gene in patients with isolated GHD and patients with ISS, including a subgroup of patients with constitutional delay of growth and puberty (CDGP). We studied 14 GHD patients with normal pituitary magnetic resonance imaging and 96 patients with ISS, 31 of them with CDGP. We also studied 150 adults and in 197 children with normal stature. The entire coding region as well as the exon-intron boundaries of *GHSR* were PCR amplified in all patients and control group and PCR products were bidirectionally sequenced. Six different heterozygous variants in GHSR were identified: none of them were found in the control group and four of these amino acid substitutions occurred at a conserved position within the GHSR. One variant (p.Val249Leu) was found in a GHD patient and the other five (c.-6 G>C, p.Ser84Ile, p.Val182Ala, p.Ala169Thr e p.Ala358Thr) were found in patients with CDGP. The missense variants were submitted to functional studies. Two of these variants (p.Ser84Ile and p.Val182Ala) result in a decrease in basal activity that was in part explained by a reduction in cell surface expression. The p.Ser84Ile mutation was also associated with a defect in ghrelin potency. The p.Val249Leu variant, found in a female patient with isolated GHD, did not segregate with the phenotype in the family and had no functional impairment in vitro. This suggests that p.Val249Leu is not the cause of the GHD in the family and may be a rare allelic variant. The other variants (c.-6 G>C, p.Ser84Ile, p.Val182Ala, p.Ala169Thr e p.Ala358Thr) were identified only in patients with CDGP (3 male and 2 female). The frequency of allelic variants observed in this group (16%) was

higher than expected by chance in contrast with ISS and GHD children, and the absence of other *GHSR* mutations in the large group of control children suggests that the association between *GHSR* mutations and CDGP phenotype is unlikely to be fortuitous. Functional studies revealed that two of the identified missense variants (p.Ser84Ile and p.Val182Ala) are functionally significant. These functional studies were performed in heterologous cell expression systems; therefore it is not possible to completely rule out that the other identified variants might cause some unrevealed impairment on GHSR function or expression *in vivo*. In conclusion, our data raise the possibility that abnormalities in ghrelin receptor function may be implicated in the ethiology of CDGP in some patients.

Descriptors: 1. GRHELIN, 2. RECEPTORS, GHRELIN, 3. FAILURE TO THRIVE, 4.HUMAN GROWTH HORMONE, 5. DELAYED PUBERTY

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1 - Introdução..... 1

1.1 - Histórico..... 3

1.2 - O GHSR e a ghrelina..... 3

1.3 - Modelos animais de defeitos na ghrelina e GHSR..... 7

1.4 - Defeitos no GHSR em Humanos..... 8

2 – Objetivos..... 11

3 – Casuística e métodos..... 13

3.1 - Casuística..... 14

3.1.1 Considerações éticas..... 14

3.1.2 Seleção de pacientes..... 14

3.1.3 Controles..... 16

3.2 – Avaliação hormonal..... 16

3.3 – Avaliação molecular..... 18

3.3.1 Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos..... 18

3.3.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)..... 18

3.3.3 Seqüenciamento Automático..... 21

3.4 – Estudo funcional..... 22

3.4.1 Materiais..... 22

3.4.2 Construção dos plasmídeos humanos GHSR..... 22

3.4.3 Cultura celular..... 23

3.4.4 Ensaio de luciferase (Luciferase Reporter Gene Assay)..... 23

3.4.5 Avaliação da expressão de receptor usando ELISA..... 24

3.5 – Análise estatística..... 25

4 – Resultados..... 26

4.1 – Características da casuística..... 27

4.2 – Resultados moleculares do grupo deficiência de GH..... 29

4.2.1 Análise de DNA..... 29

4.2.2 Caracterização da família com a variante p.Val249Leu..... 33

4.3 – Resultados moleculares dos grupos baixa estatura idiopática e atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento..... 35

4.3.1 Análise de DNA..... 35

4.3.1.1 Variante c.-6G>C..... 38

4.3.1.1.1 Caracterização da família com a variante c.-6G>C..... 39

4.3.1.2 Variante c.251G>T..... 40

4.3.1.2.1 Caracterização da família com a variante p.Ser84Ile..... 41

4.3.1.3 Variante c.505G>A..... 43

4.3.1.3.1 Caracterização da família com a variante p.Ala169Thr..... 44

4.3.1.4 Variante c.545 T>C..... 45

4.3.1.4.1 Caracterização da família com a variante p.Val182Ala..... 46

4.3.1.5 Variante c.1072G>A..... 48

4.3.1.5.1 Caracterização da família com a variante p.Ala358Thr..... 49

4.4 – Resultados - Estudos funcionais das variantes do *GHSR*..... 50

4.4.1 Atividade basal e expressão em superfície celular..... 50

4.4.2 Potência da ghrelina..... 52

5 – Discussão..... 54

5.1 – Variante no *GHSR* em paciente do grupo DGH..... 56

5.2 – Variantes no *GHSR* em pacientes do grupo BEI..... 57

6 – Conclusões..... 62

7 – Referências..... 64

APÊNDICE A – Artigo publicado no European Journal of Endocrinology..... 76

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCD	Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento
A	Alanina
BEI	Baixa estatura idiopática
cDNA	DNA complementar
CIA	Quimiolimunoensaio
DGH	Deficiência de hormônio de crescimento
DGHI	Deficiência de hormônio de crescimento isolada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FIA	Fluoroimunoensaio
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio de crescimento
GH1	Gene do hormônio de crescimento
GHR	Receptor do hormônio de crescimento
GHRH	Gene do hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHRHR	Gene do receptor do hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHRL	Ghrelina
GHRL	Gene da ghrelina
GHSR	Gene do receptor do secretagogo de hormônio de crescimento
GHSR	Receptor do secretagogo de hormônio de crescimento
H	Altura
I	Isoleucina
IC	Idade cronológica
ICMA	Imunoquimioluminescência
IFMA	Imunofluorométrico
IGF-1	Fator de crescimento insulina-símile Tipo 1
IGFBP-3	IGF binding protein do tipo 3
IMC	Índice de massa corpórea

IO	Idade óssea
ITT	Teste de tolerância à insulina *(insulin tolerance test)*
K	Leucina
LH	Hormônio lúteo-estimulante
NaCl	Cloreto de sódio
NH_4Cl	Cloreto de amônia
NH_4HCO_3	Carbonato de amônia
P	Peso
rhGH	Hormônio de crescimento recombinante humano
RIE	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RNM	Ressonância magnética
RPM	Rotações por minuto
Rx	Radiografia
S	Serina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SST	Somatostatina
T	Treonina
TC	Tomografia computadorizada
TE	Tampão tris e EDTA
TH	Altura alvo (*Target height*)
Tris-HCl	Trisaminometano hidrocloreto
UTR	*Unstranslated region*
V	Valina
Z	Escore de desvio padrão

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ação da ghrelina no controle neuroendócrino do apetite..... 6

Figura 2: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.V249L)..... 30

Figura 3: O modelo ilustra a posição das novas variantes encontradas no receptor GHSR..... 31

Figura 4: Alinhamento da sequência de aminoácidos do GHSR de diferentes espécies..... 32

Figura 5: Heredograma da família da paciente portadora de DGH e da variante p.V249L..... 34

Figura 6: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (c.-6G>C)..... 38

Figura 7: Alinhamento da sequência de nucleotídeos do *GHSR* de diferentes espécies..... 39

Figura 8: Heredograma da família do paciente portador de ACCD e da variante c.-6G>C..... 40

Figura 9: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.S84I)..... 41

Figura 10: Heredograma da família da paciente portadora de ACCD e da variante p.S84..... 42

Figura 11: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.A169T)..... 43

Figura 12: Heredograma da família do paciente portador de ACCD e da variante p.A169T..... 45

Figura 13: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.V182A)..... 46

Figura 14: Heredograma da família da paciente portadora de ACCD e da variante p.V182A..... 47

Figura 15: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.A358T)..... 48

Figura 16: Heredograma da família do paciente portador de ACCD e da variante p.A358T..... 50

Figura 17: Expressão em superfície celular das variantes do GHSR selecionadas..... 51

Figura 18: Atividade basal e após estímulo com ghrelina dos GHSR mutados em comparação com o *wild-type*..... 53

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com mutações no *GHSR* descritos na literatura..... 10

Tabela 2: Oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do gene *GHSR* e da região promotora do gene *GHSR*..... 20

Tabela 3: Oligonucleotídeos específicos utilizados para sequenciamento dos exons do gene *GHSR* e da região promotora do *GHSR*..... 20

Tabela 4: Dados clínicos e hormonais dos pacientes selecionados..... 28

Tabela 5: Dados clínicos dos pacientes com variantes no *GHSR*..... 36

Tabela 6: Dados laboratoriais dos pacientes com variantes no *GHSR*..... 37

Tabela 7: Propriedades farmacológicas do GHSR1a *wild type* versus mutado..... 52

Apêndice

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo publicado no European Journal of Endocrinology..... 76

1-Introdução

INTRODUÇÃO

O crescimento constitui um processo multifatorial que envolve diversos fatores genéticos e ambientais. O sistema hormônio de crescimento (GH – *Growth hormone*) / fator de crescimento insulino símile (IGF-1 – *Insuline-like growth factor 1*) é o principal determinante e regulador do crescimento linear pós-natal. O GH é um hormônio produzido pela hipófise sob regulação principal de dois hormônios hipotalâmicos: o hormônio liberador de GH (GHRH – *growth hormone releasing hormone*) e a somatostatina. O GHRH estimula a produção de GH enquanto a somatostatina inibe(1).

Uma terceira via de regulação do GH é realizada pela ghrelina. Este hormônio secretado principalmente por células gástricas age em seu receptor, o receptor de secretagogo de GH (GHSR - *Growth hormone secretagogue receptor*), localizado no hipotálamo e na hipófise, estimulando a síntese e secreção do GH (1). Recentemente foram identificadas mutações no gene *GHSR* em crianças com baixa estatura idiopática (BEI) e com deficiência isolada de GH (DGH) (2-5). Portanto, a regulação do GH via ghrelina e GHSR parece estar implicada no desenvolvimento de baixa estatura com diferentes condições de secreção de GH. Porém devido aos poucos relatos na literatura existe a necessidade de estudos adicionais para melhor definir a freqüência, o papel etiológico e o fenótipo causado pelas mutações no gene *GHSR*.

Por estas razões, propomos investigar a presença de mutações no gene *GHSR* em crianças com DGH isolada de causa não identificada e crianças com baixa estatura idiopática (BEI). Os achados moleculares serão correlacionados com os dados clínicos.

1.1 Histórico

Em 1976 foi descoberta uma substância exógena derivada de um peptídeo opióide que possuía fraca atividade de liberação de GH (6). Inicialmente estes compostos foram denominados peptídeos liberadores do GH (GHRP – *Growth hormone relase peptide*). A partir de então, alterações químicas levaram à síntese de compostos sintéticos com maior potência de liberação de GH, como por exemplo, GHRP-6, GHRP-2, hexarelina e MK-0677 [revistos em ref. (7)]. Atualmente essa classe de substâncias é conhecida como secretagogos de GH (GHS). Sugeria-se que estes GHS exógenos modulavam a secreção de GH por um mecanismo diferente do GHRH.

Em 1996 foi clonado o receptor do secretagogo de GH (*GHSR*), um típico receptor acoplado à proteína G (8). Este receptor por muito tempo foi um exemplo de receptor órfão, ou seja, um receptor sem nenhum ligante natural conhecido. Finalmente em 1999 foi identificada a ghrelina como sendo o ligante natural do GHSR (9).

1.2. O GHSR e a ghrelina

O GHSR é um membro da superfamília de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana. O *GHSR* é altamente conservado entre diversas espécies, sugerindo que exerça importantes funções fisiológicas [revistos em ref. (10-12)].

O *GHSR* é localizado no cromossomo 3q26.2 e consiste de dois exons: o exon 1 codifica a porção extracelular e da primeira até a quinta alça transmembrana do GHSR, enquanto o exon 2 codifica a sexta e a sétima alças transmembranas, além da porção intracitoplasmática do receptor. Já foram identificados dois transcritos do *GHSR*: o GHSR tipo 1a que codifica a isoforma

completa do GHSR, com os sete domínios transmembrana e propriedades funcionais consistentes com seu papel de receptor de ghrelina; e o GHSR tipo 1b, originado do processamento alternativo do RNAm e contendo apenas o primeiro exon, o que resulta em uma proteína truncada com apenas cinco dos sete domínios transmembrana, de papel fisiológico ainda desconhecido (8, 13).

A expressão do GHSR ocorre principalmente no núcleo arqueado e ventromedial do hipotálamo, no hipocampo e na hipófise, embora também seja expresso em diversos outros locais do sistema nervoso central (giro denteado, substância negra, núcleos da rafe) e em outros órgãos (coração, pâncreas, rim, estômago, intestino, tecido adiposo e células imunes) (14). O GHSR, ao ser estimulado por seu ligante, ativa a fosfolipase C, gerando inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol, resultando em aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular, o que indica que o GHSR é acoplado a uma proteína Gq. É estabelecido que o GHSR possui atividade constitutiva elevada, ou seja, na ausência de ligante a atividade deste receptor é > 50% do máximo induzido pelo estímulo com ghrelina (15).

A ghrelina, ligante natural do GHSR, é um peptídeo com 28 aminoácidos produzido principalmente pelas células X/A da mucosa oxíntica gástrica, embora também seja expresso em outros tecidos como duodeno, jejuno, íleo, cólon, pâncreas, rim, hipotálamo, hipófise, placenta, ovários, testículos e outros (9, 14).

O gene humano da ghrelina está localizado no cromossomo 3p25-26, possui 5 éxons e dá origem a 2 transcritos por splicing alternativo (transcrito A contém todos os éxons e transcrito B contem éxons 2 a 4). O RNAm é traduzido em um precursor da ghrelina (pré-pró-ghrelina) que contem 117 aminoácidos. Ocorre então uma modificação pós-traducional com a clivagem da proteína pela enzima prohormônio convertase 1/3 resultando no peptído ghelina, que tem 28 aminoácidos (10).

A ghrelina existe na circulação em 2 formas principais: não acilada, que é a forma mais abundante na circulação, e acilada, que é a forma ativa. A acilação de ácido n-octanóico em um dos resíduos de serina (Ser^3), pela enzima O-acyltransferase (GOAT) é um processo essencial para promover mudanças pós-traducionais na ghrelina que permitam a sua ligação no GHSR tipo 1a (16, 17).

A maioria das ações da ghelina ocorre através da ativação do GHSR [revistos em ref. (9, 11, 12)]. A ghrelina estimula a secreção de GH tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e de maneira dose-dependente. Estudos realizados indicam que este efeito ocorra através de: 1) ativação de neurônios produtores de GHRH no núcleo arqueado com aumento de sua liberação; 2) amplificação do efeito do GHRH no somatotrofo e 3) antagonismo funcional da somatostatina.

A regulação do apetite pela ghrelina também foi caracterizada (Figura 1). Sua ação orexigênica é mediada pelo estímulo de neurônios no hipotálamo promovendo produção e secreção de estimuladores do apetite, como neuropeptídeo Y e proteína relacionada à agouti (*Agouti-related peptide* - AgRP), e também via orexinas. A ghrelina leva a um aumento no apetite, na ingesta alimentar e ganho de peso, tanto em animais quanto em humanos (18).

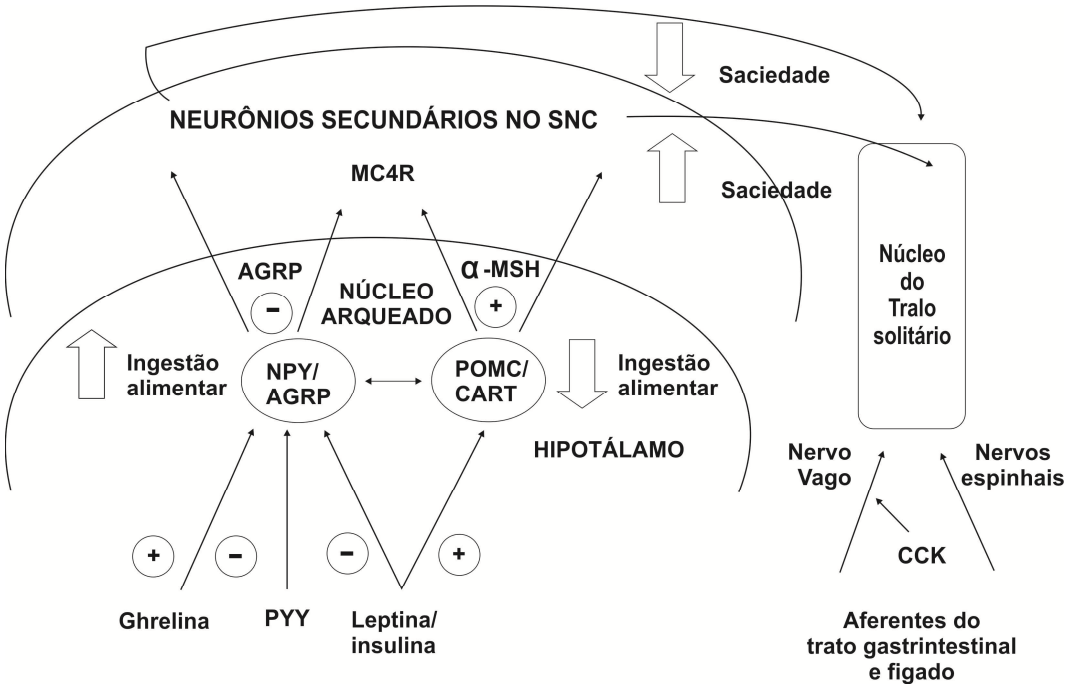

Figura 1: Ação da ghrelina no controle neuroendócrino do apetite. Adaptado da referência (19).

O principal fator regulador da secreção de ghrelina é a alimentação: as concentrações séricas de ghrelina são elevadas durante o jejum e baixas pós-prandialmente (20, 21). As concentrações de ghrelina são elevadas em pacientes magros e com anorexia nervosa ou bulimia, e diminuídas em obesos (10, 11). O fato de os valores de ghrelina serem reduzidos em estados agudos e crônicos de balanço energético positivo e aumentados na situação oposta sugere que a ghrelina seja um sinal de insuficiência energética e funcione como antagonista funcional da leptina.

A leptina, produzida pelas células adiposas, tem suas concentrações reduzidas no jejum e aumentadas em situações de balanço energético positivo, sendo um hormônio anorexigênico (22). Além desta ação no controle alimentar, a leptina também tem um papel no eixo gonadotrópico, sendo um fator permissivo para o desenvolvimento puberal. Recentemente vem se sugerindo

que o papel da ghrelina como antagonista da leptina ocorra não só em termos do controle alimentar, mas também na regulação da puberdade (23). Vários estudos mostram que a ghrelina inibe a secreção de gonadodropinas, e pode funcionar como um modulador pleiotrópico da função gonadal e reprodutiva (23-25).

1.3. Modelos animais de defeitos na ghrelina e GHSR

Estudos com nocaute do gene da ghrelina em ratos não demonstraram comprometimento do crescimento linear e do padrão alimentar (26-29) sugerindo que a ghrelina não seria um regulador essencial da ingesta alimentar.

Camundongos sem *GHSR*, após a administração de ghrelina, não apresentam aumento na liberação de GH e da ingesta alimentar, confirmando que o GHSR é o receptor que modula estas ações da ghrelina (30). No entanto, estes animais nocautes para *GHSR* não tiveram prejuízo do crescimento, embora os valores de IGF-1 e o peso destes animais fossem ligeiramente menores que os dos controles (30). Já ratos transgênicos com ausência de *GHSR* em hipotálamo, especialmente no núcleo arqueado, eram menores e mais magros que os controles, apresentavam menor porcentagem de tecido adiposo corpóreo e tinham menor ingesta alimentar (31). Estes animais quando estimulados por um secretagogo de GH apresentavam menor secreção de GH e menor aumento na ingesta alimentar em comparação com animais controles. As fêmeas apresentaram alterações mais evidentes no eixo GH/IGF-1 com menor secreção espontânea de GH e menores concentrações de IGF-1 (31). Tais achados sugerem um papel fisiológico da ghrelina/GHSR na secreção de GH e crescimento. Mais recentemente, um estudo com camundongos *knock-out* para GHSR em diferentes idades não mostrou diferenças de composição corporal em camundongos mais novos (3-4 meses), mas evidenciou menor

peso corporal e massa gorda nos camungondos knock-out mais velhos (10-12 meses) em relação aos controles (29).

Em resumo, modelos animais com nocaute do gene da ghrelina não evidenciaram alterações importantes do crescimento e do peso. No entanto, ratos com nocaute do *GHSR* são menores e mais magros que os controles e apresentam alterações significantes no eixo GH/IGF-1. Estes resultados discordantes podem ser justificados pela alta atividade constitutiva do GHSR, o qual confere maior importância do GHSR em relação à ghrelina no controle do crescimento e peso. Em relação ao eixo gonadotrófico, não há dados sobre o desenvolvimento puberal e dois estudos em camundongos knock-out para *GRSR e* ghrelina relatam fertilidade normal nestes animais (26, 30).

1.4. Defeitos no *GHSR* em Humanos

Recentemente alterações no gene *GHSR* foram implicadas na etiologia da baixa estatura em crianças com diferentes estados de secreção de GH. Adicionalmente, 2 grandes estudos de GWAS (*Genome wide association study*) demonstraram uma forte associação entre o locus do *GHSR* (3q26.3) e a determinação da altura (32, 33).

Pantel *et al*. (3) descreveram a mutação p.Ala204Glu no *GHSR* associada a baixa estatura idiopática e deficiência de GH em 2 famílias não correlacionadas de origem Marroquina. Esta mesma mutação foi descrita em uma criança obesa por Wang *et al.(2)*, que na mesma publicação identificaram outra mutação (p.Phe279Leu) em uma criança com BEI e sua mãe obesa. Estas mutações foram herdadas de maneira autossômica dominante com penetrância incompleta, já que alguns familiares que apresentavam a mutação não apresentavam o fenótipo. Em 2009, Pantel *et al* (4) descreveram um paciente com DGH e puberdade atrasada que era heterozigoto composto para

2 mutações no *GHSR*, p.Trp2X e p.Arg237Trp. A transmissão do fenótipo de DGH na família foi consistente com herança autossômica recessiva. No entanto, o pai do paciente, que era heterozigoto para a mutação nonsense, também apresentou atraso puberal.

Os pacientes e familiares portadores destas mutações no *GHSR* tinham fenótipo bastante variável. Alguns apresentavam baixa estatura grave, associada ou não a DGH, enquanto outros apresentavam altura pouco comprometida ou até normal. A avaliação laboratorial mostrava valores de IGF-1 e GH estimulado normais, exceto nos pacientes com DGH que tinham valores baixos destes hormônios. A ghrelina foi dosada em alguns pacientes e estava dentro dos limites da normalidade. Em relação ao peso, os pacientes variavam desde baixo peso até obesidade. As características destes pacientes estão mostradas na Tabela 1.

Mais recentemente um grupo japonês (5) encontrou 4 novas mutações no *GHSR* em pacientes com DGHI ou BEI (p.Gln36del, p.Pro108Leu, p.Cys173Arg, and p.Asp246Ala), mas infelizmente nenhuma informação clínica ou avaliação laboratorial destes pacientes foi dada.

Todas estas mutações missenses foram submetidas a estudos funcionais que demostraram diminuição da atividade constitutiva do receptor, mas algumas delas preservavam a habilidade de responder à ghrelina (2-5, 34), sugerindo a importância da atividade basal do GHSR no crescimento.

Pelo fato de existirem poucos casos de mutações no *GHSR* descritos na literatura, e estas mutações estarem associadas a fenótipos clínicos variados, há a necessidade de ampliar a casuística de pacientes investigados para este gene. Portanto, propomos investigar a presença de mutações no gene *GHSR* em crianças com DGH isolada de causa não identificada e crianças com baixa estatura idiopática incluindo um subgrupo de crianças com atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento.

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com mutações no *GHSR* descritos na literatura

Mutação	Paciente	Genótipo	Sexo	Z da Altura	Fenótipo do peso*	Fenótipo da altura
p.Ala204Glu (3)	Caso índice	**M** / **M**	F	-3,7	Sobrepeso	BEI
	Pai	**M** / N	M	-3,7	Obeso	BEI
	Mãe	**M** / N	F	-2,7	Obeso	BEI
	Irmão 1	**M** / N	M	-1,1	Sobrepeso	Normal
	Irmão 3	**M** / N	M	-2,0	Eutrófico	DGH
	Irmão 4	**M** / N	F	-2,2	Eutrófico	BEI
p.Ala204Glu (3)	Caso índice	**M** / N	F	-3,2	Baixo peso	DGH
	Pai	**M** / N	M	-2,0	Eutrófico	BEI
	Irmão 2	**M** / N	M	-1,2	Eutrófico	Normal
	Irmão 3	**M** / N	F	+1,0	Eutrófico	Normal
p.Ala204Glu (2)	Caso índice	**M** / N	NA	NA	Obeso	Normal
p.Phe279Leu (2)	Caso índice	**M** / N	NA	NA	Eutrófico	BEI
	Mãe	**M** / N	F	-1,4	Obeso	BEI
p.Trp2X e p.Arg237Trp (4)	Caso índice	**M** / **M**	M	-2,7	Baixo peso	DGH e atraso puberal
	Pai	**M** / N (p.Trp2X)	M	-0,6	Eutrófico	Atraso puberal
	Mãe	**M** / N (p.Arg237Trp)	F	-1,3	Baixo peso	Normal
	Irmão 2	**M** / N (p.Arg237Trp)	M	-1,7	Baixo peso	Normal

F: feminino M: masculino Z: desvio padrão NA:não avaliado M: presença do alelo mutado N:presença do alelo selvagem BEI: baixa estatura idiopática DGH: deficiência de hormônio de crescimento *: O fenótipo do peso foi classificado através do IMC para adultos e percentil do peso em crianças (baixo peso: IMC<18,5 ou <p5%; eutrófico: IMC entre 18,5 e 25 e peso entre p5% e p85%; sobrepeso: IMC entre 25 e 30 e peso entre p85 e p95%; obeso: IMC>30 ou peso acima do p95%), segundo site do CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (http://www.cdc.gov/).

2-Objetivos

OBJETIVOS

1. Pesquisar a presença de mutações no gene *GHSR* em pacientes com deficiência isolada de hormônio de crescimento.

2. Pesquisar a presença de mutações no gene *GHSR* em pacientes com baixa estatura idiopática, incluindo subgrupo de pacientes com atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento.

3. Correlacionar os achados moleculares com o fenótipo dos pacientes afetados e segregá-los entre os outros membros da família.

4. Realizar o estudo funcional das novas mutações do *GHSR* identificadas.

3-Casuística e Métodos

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 – Casuística

3.1.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki e pelos termos descritos pela Portaria 196/96, do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa (CEP, #0391/08) e está registrado no CONEP sob o número CAE-0349.0.015.000-08. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes ou pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados.

3.1.2 Seleção de pacientes

Foram selecionados 14 pacientes com deficiência isolada de GH e 96 pacientes com BEI; dos quais 31 (32%) apresentavam atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento (ACCD). Estes pacientes foram selecionados no Ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Os critérios clínicos e laboratoriais considerados para inclusão dos pacientes com DGHI no presente estudo foram:

- Deficiência de GH demonstrada por ausência de resposta do GH em pelo menos 2 testes de estímulo (clonidina e ITT), evidenciada por pico de GH menor que 3,3 ng/ml dosado pelo método imunofluorimétrico.
- Ressonância magnética (RNM) de região hipotálamo-hipofisária sem anormalidades.

Os critérios de exclusão foram:

- Mutações ou deleções nos genes *GH1, GHRH* e *GHRHR* .
- Causas pós-traumáticas de DGH.
- Causas conhecidas de baixa estatura após o nascimento como presença de distúrbios genéticos e cromossômicos, desnutrição, doenças hepáticas, patologias sistêmicas, ósseas ou endocrinológicas.

Os critérios de inclusão para os pacientes com BEI foram:

- Baixa estatura de início pós-natal e com proporções corpóreas normais.

- Estatura de 2,5 desvios padrão abaixo da média de estatura da curva de crescimento de Tanner ou com velocidade de crescimento, observada em um período igual ou superior a 6 meses, inferior a -1 desvio padrão para idade e sexo.

Os critérios de exclusão foram:

- Deficiência de hormônio de crescimento (DGH).

- Causas conhecidas de baixa estatura após o nascimento como presença de distúrbios genéticos e cromossômicos, desnutrição, doenças hepáticas, patologias sistêmicas, ósseas ou endocrinológicas.

Dentre os pacientes com BEI, foram considerados como ACCD aqueles que possuíam as seguintes características:

- Início espontâneo da puberdade após a idade de 13 anos nas meninas e 14 anos nos meninos (35).
- Idade óssea atrasada em relação à idade cronológica, mas compatível com a idade estatural.
- Desenvolvimento normal da puberdade após o seu início.

3.1.3 Controles

Para rastreamento de variantes alélicas identificadas no gene *GHSR*, foram estudados 150 controles, ou seja, indivíduos adultos de ambos os sexos, que não apresentaram alterações de crescimento ou anormalidades no desenvolvimento puberal (45% do sexo masculino com média de desvio padrão de altura de 0.3 ± 1.1). Em colaboração com a Unidade de Obesidade do Serviço de Endocrinologia da FMUSP sob supervisão da Dra Sandra Mara Villares e execução pela aluna Thais Arthur foram estudadas 197 crianças obesas com crescimento e puberdade normais (64% do sexo masculino, com idade média de 10.7 ± 1.5 anos, média de desvio padrão da altura de 1.0 ± 1.0 e desvio padrão do IMC de 2.3 ± 0.3).

3.2 – Avaliação hormonal

A avaliação da secreção de GH foi feita através da realização de testes de estímulo de secreção de GH, principalmente o teste da clonidina e o teste de tolerância à insulina (ITT). O teste da clonidina consiste na administração de clonidina via oral na dose de 0,1 mg/m^2 de superfície corpórea e coleta de GH nos tempos -30, 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. O ITT consiste na administração

de insulina na dose de 0,1UI/kg e coleta de glicemia e GH nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Para que este teste seja considerado válido e interpretável, é necessária a documentação de hipoglicemia (glicemia inferior a 40 mg/dL). O GH foi dosado pelo método imunofluorimétrico.

Para o diagnóstico de deficiência de GH, o critério utilizado foi pico de GH menor do que 3,3 µg/L em pelo menos 2 testes de estímulo. Este ponto de corte foi baseado em estudo prévio realizado em nosso serviço que mostrou este ser o melhor valor de corte de GH para diferenciar crianças pré-púberes com DGH de crianças sem DGH (sensibilidade de 100% com 93% de especificidade) (36).

As dosagens hormonais de GH, FSH, LH, estradiol e testosterona foram realizadas pelo ensaio de fluorimetria por tempo resolvido (AutoDELFIA®, PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). As dosagens de IGF-1 e IGFBP-3 foram realizadas por quimioluminescência (Immulite®, Siemens, Deerfield, IL, EUA). A dosagem de ghrelina ativa foi realizada pela técnica de ELISA (Millipore, St Charles, MO, EUA).

Dosagens de ghrelina ativa foram realizadas em amostras coletadas pela manhã em jejum e após 60 minutos da ingestão de refeição rica em carboidratos. Amostras de sangue total foram coletadas em tubo seco de prolipropileno e foi imediatamente adicionado inibidor da dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) (Millipore, St Charles, MO, EUA) a uma concentração final de 100 µmol/L. O sangue coagulado foi centrifugado por 15 minutos a 4 ± 2℃ e separou-se o plasma, que então foi acidificado pela adição de ácido clorídrico (HCl) a uma concentração final de 0.05 mol/L e estocado a - 80° até ser realizado o ensaio. Estas dosagens foram realizadas em um único ensaio e em triplicata. Os valores de referência para as concentrações de ghrelina foram

baseados em estudo prévio de dosagem de ghrelina ativa por método de ELISA em pacientes púberes (37).

3.3 – Avaliação molecular

3.3.1 - Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos

O sangue foi incubado em solução para lise de glóbulos vermelhos (114 mM cloreto de amônia; 1 mM carbonato de amônia) durante 30 minutos a 4°C. Após este período, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante descartado e o botão de células foi ressuspenso em solução tampão constituída de 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0 1 mM EDTA pH 8,0 contendo 1% SDS (dodecil sulfato de sódio) e 0,2 mg/mL de proteinase K e mantido durante a noite à 37°C. No dia seguinte, a amostra foi submetida a duas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a uma extração com clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com acetato de sódio 0,3 M em pH 7,0 e com 2 volumes de etanol absoluto gelado. Posteriormente, o DNA foi lavado em etanol 70% por 5 minutos e ressuspenso em TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0.1 mM EDTA pH 8,0).

3.3.2- Reação de polimerização em cadeia (PCR)

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação do gene *GHSR* (sequência de referência: *NM_198407.2*). A região codificadora foi estudada em toda a casuística e no grupo controle. Nos pacientes e parentes portadores de mutação na região codificadora do *GHSR* também avaliamos a região promotora proximal do *GHSR*. A Tabela 2 mostra os oligonucleotídeos

inciadores específicos (“primers”) que foram utilizados para a amplificação das regiões de interesse.

As reações de amplificação do *GHSR* foram realizadas em um volume total de 25-50 µL, foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico, 200 µM de cada trifosfato de nucleosídeo, 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 2,5U de *GoTaq® DNA polimerase* diluída em seu tampão *5X Green GoTaq™ Reaction Buffer* , ambos fornecidos pelo fabricante (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

A reação de amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA) e consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95℃ por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94℃ por 45 segundos, anelamento com temperatura específica para cada par de primer (especificados na Tabela 2) por 30 segundos e extensão a 72° por 1 minuto e extensão final a 72℃ por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do gene *GHSR* e da região promotora do gene *GHSR*

Região do gene	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento
GHSR EXON 1	GHSR 1F: 5'-TTCTCCAAGCATCCTCCCTA-3', GHSR 1R: 5'-GAAGGCACAGGGAGAGGATA-3'	997	54℃
GHSR EXON 2	GHSR 2F: 5'-CTGTGACATTTCTTGAGCTGAC-3' GHSR 2R: 5'-TGTGCTATGTCTTCCGGTTT-3'	309	54℃
Região promotora do *GHSR* 1	Prom GHSR 1F: 5'-CAGCCTCACAGCCTCTTCTT-3' Prom GHSR 1R: 5'-CGTTCTCGATCCAGTTCCAT-3'	689	58℃
Região promotora do *GHSR* 2	Prom GHSR 2F: 5'-ATCAGGTCCCAGCTGCTAAA-3' Prom GHSR 2R: 5'-TCAGCTGAACAGGCTCTGG-3'	560	58℃

Tabela 3 – Oligonucleotídeos específicos utilizados para sequenciamento dos exons do gene *GHSR* e da região promotora do *GHSR*

Região do gene	Oligonucleotídeos
GHSR exon 1	GHSR 1F: 5'-TTCTCCAAGCATCCTCCCTA-3' GHSR 1B-F: 5’-CAATTCGTCAGTGAGAGCTG-3’ GHSR 1C-R: 5’- GCCATGCTGGACAGGTAGAG-3’
GHSR exon 2	GHSR 2F: 5'-CTGTGACATTTCTTGAGCTGAC-3' GHSR 2B-R: 5'-CTTGGACATGATGTTGTACA-3'
Região promotora GHSR 1	Prom GHSR 1F: 5'-CAGCCTCACAGCCTCTTCTT-3' Prom GHSR 1R: 5'-CGTTCTCGATCCAGTTCCAT-3'
Região promotora do GHSR 2	Prom GHSR 2F: 5'-ATCAGGTCCCAGCTGCTAAA-3' Prom GHSR 2R: 5'-TCAGCTGAACAGGCTCTGG-3'

3.3.3 - Seqüenciamento Automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada através da comparação da intensidade de sinal emitido pelos fragmentos de um marcador de peso molecular, de concentração conhecida, em gel de agarose. Cerca de 30 ng deste produto foram submetidos a uma reação de purificação enzimática com 10 U da enzima “ExoSAP-IT” (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 15 minutos a uma temperatura de 37° C, seguida por 15 minutos a 80°C.

Após a purificação, o material foi submetido a uma reação de seqüenciamento seguindo as instruções do “kit” “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Vinte ng de produto de PCR purificado, 2 µL de “BigDye Terminator”, 6 µL de tampão de seqüenciamento e 5 pmol de um dos “primers” específicos para cada éxon (Tabela 3) foram submetidos ao protocolo de seqüenciamento que consistiu em 25 ciclos de 96ºC por 10 segundos, 50ºC por 5 segundos e 60ºC por 4 minutos, realizado em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA).

O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado segundo o protocolo do isopropanol/etanol. Esse material foi submetido a uma eletroforese capilar no seqüenciador automático "ABI Prism 3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As sequencias obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI). A análise foi realizada pelo programa “Sequencher 4.9” (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA).

3.4 – Estudo funcional

Os estudos funcionais foram desenvolvidos em colaboração com a equipe do Dr Alan S Kopin do Molecular Pharmacology Research Center, Molecular Cardiology Research Institute, Tufts Center de Boston, Massachusetts, USA.

3.4.1 – Materiais

Ghrelina foi comprada de Bachem (Bubendorf, Switzerland). O meio de cultura celular, soro fetal bovino e reagente lipofectamina foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA). Anticorpo monoclonal anti-hemaglutinina conjugado com peroxidase (3F10) e o substrato da peroxidase foram comprados da Roche Applied Science (Indianapolis, IN). O plasmídeo que codifica o gene repórter da luciferase associado a elemento de resposta sérico (*serum response element (SRE)-luciferase reporter gene*) foi desenvolvido pelo grupo e descrito previamente (38).

3.4.2 – Construção dos plasmídeos humanos GHSR

O plasmídeo que contem o cDNA humano *GHSR wild-type* (isoforma 1a) foi descrito previamente (34). As mutações missense foram introduzidas no cDNA usando técnica de mutagênese sítio-dirigida (39, 40). Para cada mutante, a presença da alteração do nucleotídeo indicado foi confirmada por sequenciamento completo da região codificadora do *GHSR* de cada construto.

3.4.3 – Cultura celular

Células humanas embrionárias de rim (HEK 293- *Human embryonic kidney cells*) cresceram em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com soro bovino fetal a 10%, 100 U/ml penicilina G e 100 µg/ml estreptomicina. As células foram mantidas a 37℃ em um ambiente humidificado contendo 5% CO_2.

3.4.4 – Ensaio de luciferase (*Luciferase Reporter Gene Assay*)

A sinalização mediada pelo receptor foi avaliada usando ensaio de luciferase descrito previamente (38, 41). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Em resumo, células HEK293 foram colocadas em placa numa densidade de 1.000-2.000 celulas por poço em placas de 96 poços e cresceram por 2 dias até ~ 80% confluência. As células então foram transitoriamente transfectadas usando reagente Lipofectamine® (Invitrogen, Carlsbad, CA) com cDNA contendo (i) um vetor de expressão vazio ou *wild type* ou ainda cada um dos *GHSR1a* mutantes, 2 ng/poço, (ii) gene repórter da luciferase associado a elemento sérico de resposta (SRE_{5X}-luc), 30 ng/poço, e (iii) β-galactosidase, 5 ng/poço, para permitir correção para variabilidade inter poço. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram estimuladas por 4 horas com ghrelina diluída em meio livre de soro.

A transdução do sinal foi determinada através da estimulação das células que expressam o receptor com concentrações crescentes de ghrelina. O meio foi cuidadosamente aspirado, seguido de tratamento com ligante e a atividade de luciferase foi medida usando reagente Steadylite® (PerkinElmer, Boston, MA). Ensaio de β-galactosidase foi então realizado após adicionar o substrato da enzima 2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside. Após incubação a 37 ºC por

30-60 minutos, a clivagem do substrato foi quantificada por mensuração da densidade óptica a 420 nm usando leitor de microplaca SpectraMax^{R} (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Valores obtidos no ensaio da galactosidase foram utilizados para correção dos valores obtidos no ensaio de luciferase.

3.4.5 – Avaliação da expressão de receptor usando ELISA

A expressão dos níveis das variantes do *GHSR* foram determinadas usando um procedimento descrito por Fortin *et al.* (42). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Em resumo, células HEK 293 cultivadas em placas de 96 poços foram transitoriamente transfectadas com o plasmidio vazio (pcDNA1.1) ou com plasmídeo contendo cadas uma das variantes (*wild type* e mutantes) do *GHSR* conjugado com epítopo-HA, 2 ng/poço. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram lavadas uma vez com tampão neutro de lavagem (PBS pH 7.4 - *phosphate-buffered saline*) e fixadas com 4% paraformaldeído em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente. Após lavar com PBS/100 mM glicina, as células foram encubadas por 30 minutos em solução de bloqueio (PBS / 20% soro bovino). Um anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase (Roche; clone 3F10) direcionado contra o epitopo-HA foi então adicionado às células (1:500 diluição na solução de bloqueio). Após 1 hora, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e a solução BM-blue (3.3'-5, 5'-tetramethylbenzidine, Roche, Indianapolis, IN) (50 µl por poço) foi adicionada. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, a conversão deste substrato pela peroxidase foi terminada adicionando 2.0 M ácido sulfúrico (50 µl por poço). O substrato convertido (que correlaciona com a quantidade do receptor) foi analisada medindo absorbância de luz a 450 nm usando leitor de microplaca SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.5 – Análise estatística

Variáveis qualitativas foram listadas como freqüências e percentagens, enquanto que variáveis quantitativas foram expressas como média ± desvio-padrão (DP). Para as comparações entre os grupos foram utilizados One Way Analysis of Variance (ANOVA) ou Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, de acordo com a presença de distribuição paramétrica ou não, respectivamente. Os dados nominais foram avaliados pelo teste qui-quadrado, ou teste exato de Fisher, conforme apropriado.

A versão 5.0 do software GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA) foi usada para construção de uma curva não linear da sinalização do GHSR e para calcular a concentração de ghrelina necessária para obter 50% da sinalização máxima (EC50). Cada valor de EC50 (expresso como concentração molar) foi transformado em pEC50; pEC50 = -log(EC50). A média dos valores pEC50 ± erro padrão do meio será mostrada. O pEC50 e valores de expressão em superfície para cada mutante foi comparado com o valor controle correspondente do receptor *wild type*.

Foi considerado estatisticamente significante um $p < 0,05$. Análise estatística foi feita usando SIGMAstat statistical software package (Windows version 3.5; Systat software Inc., Chicago, IL – USA).

4-Resultados

RESULTADOS

4.1 – Características da casuística

As características clínicas dos pacientes selecionados estão demonstradas na Tabela 4. Nossa casuística é caracterizada por uma predominância de pacientes do sexo masculino. Na primeira avaliação, os pacientes com ACCD eram mais velhos, mais magros e apresentavam maior atraso de idade óssea do que os pacientes com DGH e com BEI e puberdade normal.

Tabela 4 - Dados clínicos e hormonais dos pacientes selecionados

	Deficiência de GH isolada (DGHI)	Baixa Estatura Idiopática (BEI)		
		com ACCD	sem ACCD	Total
Sexo (M:F)	11 : 3	24 : 7	40 : 25	64 : 32
Z da altura alvo	-1,1 ± 1,1	-1,2 ± 0,6	-1,3 ± 0,6	-1,3 ± 0,6
História familiar de baixa estatura * (%)	43	52	49	50
Dados na avaliação inicial				
Idade cronológica (anos)	8,5 ± 5,2	13,5 ± 2,6[a]	9,4 ± 3,6	10,7 ± 3,8
Idade óssea (anos)	5,8 ± 4,4	10,7 ± 2,6 [a]	7,2 ± 3,7	8,4 ± 3,7
Idade óssea – idade cronológica (anos)	2,6 ± 1,9	3,1 ± 1,1 [a]	2,3 ± 1,2	2,6 ± 1,3
Z da altura	-3,6 ± 1,2	-3,1 ± 0,9	-2,7 ± 0,8 [b]	-2,8 ± 0,9
Z do IMC	-0,1 ± 0,8	-1,7 ± 1,5 [a]	-0,6 ± 1,1	-1,0 ± 1,4
Idade do início da puberdade (anos)				
Sexo feminino	10,1 ± 0,6	13,5 ± 0,6 [a]	11,1 ± 1,2	11,7 ± 1,5
Sexo masculino	14,1 ± 2,3	15,3 ± 1,5	12,7 ± 1,0 [c]	13,8 ± 1,8
Máximo de GH em teste de estimulo (µg/L)	1,3 ± 1,2[d]	13,0 ± 9,0[a]	9,7 ± 4,8[c]	10,7 ± 6,5
Z do IGF-1	-1,6 ± 1,5[e]	-1,6 ± 1,5	-0,8 ± 0,9[c]	-1,0 ± 1,2
Z do IGFBP-3	-0,6 ± 1,0 [e]	-0,7 ± 1,0	-0,3 ± 1,0	-0,4 ± 1,0

* :história familiar de baixa estatura foi estabelecida por pai e/ou mãe com Z da altura < -2; [a]: p <0.05 em comparação com o grupo sem ACCD e DGH; [b]: p <0.05 em comparação com o grupo DGH; [c]: p <0.05 em comparação com o grupo com ACCD e DGH; [d]: p <0.05 em comparação com o grupo BE; [e]: dosagens de IGF-1 e IGFBP-3 disponíveis em apenas 10 e 6 pacientes, respectivamente.

4.2 – Resultados moleculares do grupo deficiência de GH

4.2.1 - Análise de DNA

Uma nova variante c.745G>T foi identificada no exon 1 (Figura 2) e se caracterizou pela substituição em heterozigoze da primeira base nucleotídica (guanina por timina) do códon 249 resultando na troca de uma valina por uma leucina (p.Val249Leu) na terceira alça intracelular do receptor (Figura 3). A variante p.Val249Leu não foi encontrada em nenhum dos 694 alelos provenientes dos controles normais e crianças obesas. Esta variante ocorre em uma região relativamente conservada do GHSR entre diversas espécies (Figura 4). Tanto a paciente quanto seu pai, portadores da mutação no *GHSR,* não apresentaram alterações na região promotora do *GHSR.*

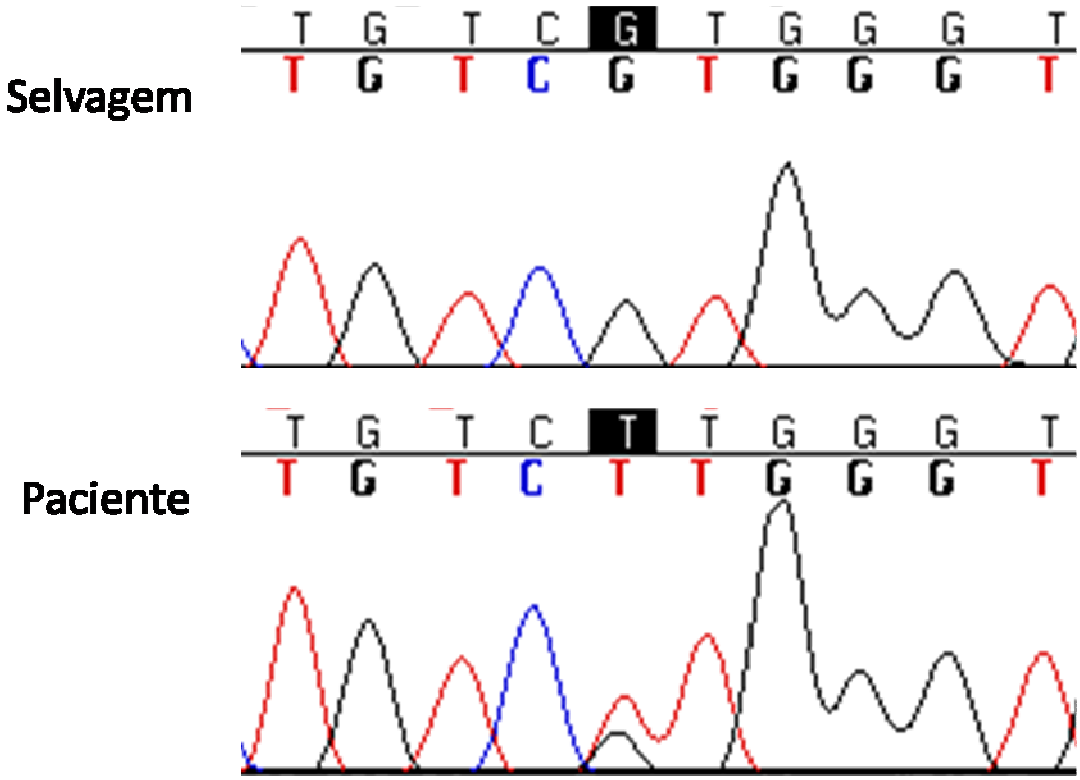

Figura 2: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.V249L). A região afetada mostra a sequência de nucleotídeos GTG que codifica o aminoácido valina na posição 249 em um indivíduo normal (imagem superior) e a troca em heterozigoze para TTG que codifica o aminoácido leucina na paciente (imagem inferior).

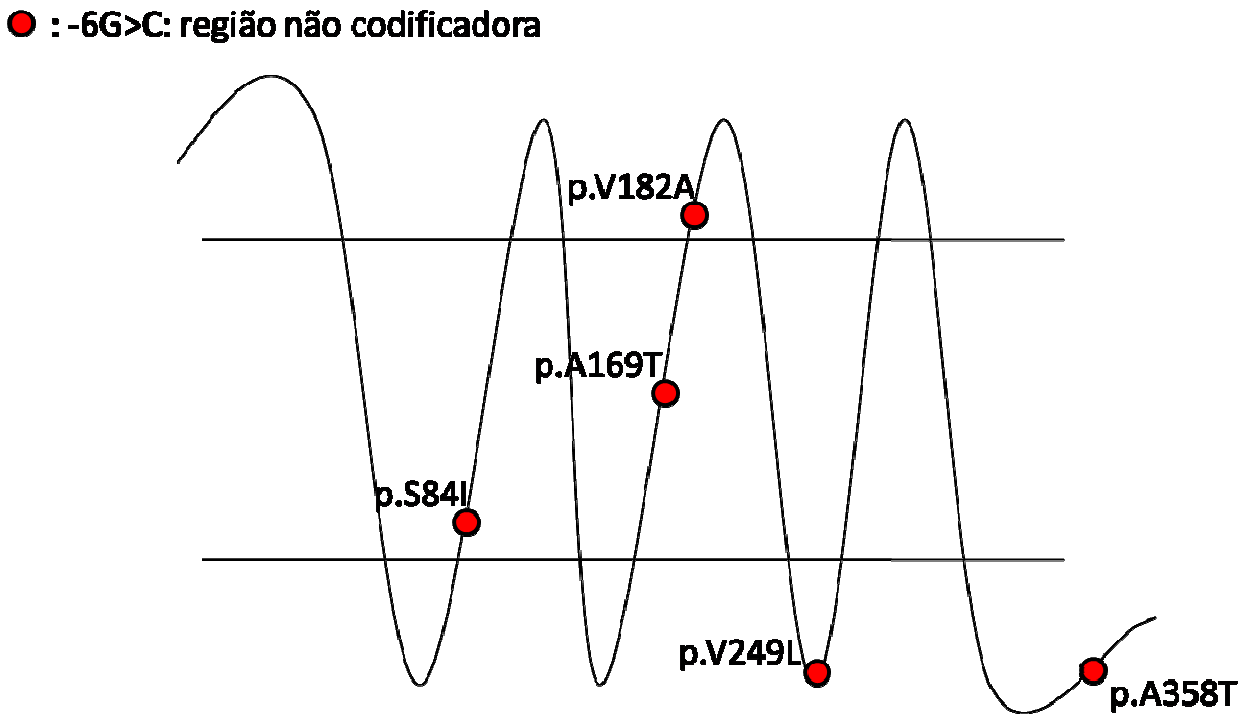

Figura 3: O modelo ilustra a posição das novas variantes encontradas no receptor GHSR.

```
                                  p.Ser84Ile
Homem          NLLTMLVVSRFRELRTTTNLYLSSMAFSDLLIFLCMPLDLVRLWQYRPWNFGDLLCKLFQ 120
Rato           NLLTMLVVSRFRELRTTTNLYLSSMAFSDLLIFLCMPLDLVRLWQYRPWNFGDLLCKLFQ 119
Camundongo     NLLTMLVVSRFRELRTTTNLYLSSMAFSDLLIFLCMPLDLVRLWQYRPWNFGDLLCKLFQ 119
Porco          NLLTMLVVSRFREMRTTTNLYLSSMAFSDLLIFLCMPLDLFRLWQYRPWNLGNLLCKLFQ 120
Galinha        NLMTMLVVSRFRDMRTTTNFYLSSMAFSDLLIFLCMPLDLFRLWQYRPWNFGDLLCKLFQ 101
                                                          p.Ala169Thr
Homem          FVSESCTYATVLTITALSVERYFAICFPLRAKVVVTKGRVKLVIFVIWAVAFCSAGPIFV 180
Rato           FVSESCTYATVLTITALSVERYFAICFPLRAKVVVTKGRVKLVILVIWAVAFCSAGPIFV 179
Camundongo     FVSESCTYATVLTITALSVERYFAICFPLRAKVVVTKGRVKLVILVIWAVAFCSAGPIFV 179
Porco          FVSESCTYATVLTITALSVERYFAICFPLRAKVVVTKGRVKLVILVIWAVAFCSAGPIFV 180
Galinha        FISESCTYSTILNITALSVERYVAICFPLRAKVIITKRKVKLVILILWAVSFISAGPIFV 161
            p.Val182Ala
Homem          LVGVEHENGTDPWDTNECRPTEFAVRSGLLTVMVWVSSIFFFLPVFCLTVLYSLIGRKLW 240
Rato           LVGVEHENGTDPRDTNECRATEFAVRSGLLTVMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLIGRKLW 239
Camundongo     LVGVEHENGTDPRDTNECRATEFAVRSGLLTVMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLIGRKLW 239
Porco          LVGVEHDNGTDPRDTNECRATEFAVRSGLLTVMVWVSSVFFFLPVFCLTVLYSLIGRKLW 240
Galinha        LVGVEHENGTNPLSTNECRATEYAIRSGLLTIMVWISSIFFFLPVFCLTVLYSLIGRKLW 221
                    p.Val249Leu
Homem          RRRRGDAVVGASLRDQNHKQTVKMLAVVVFAFILCWLPFHVGRYLFSKSFEPGSLEIAQI 300
Rato           RR-RGDAAVGASLRDQNHKQTVKMLAVVVFAFILCWLPFHVGRYLFSKSFEPGSLEIAQI 298
Camundongo     RR-RGDAAVGSSLRDQNHKQTVKMLAVVVFAFILCWLPFHVGRYLFSKSFEPGSLEIAQI 298
Porco          RRKRGEAAVGSSLRDQNHKQTVKMLGGSQCALELSLPGPLHSSCLFSSP----------- 289
Galinha        RRKRKNIGPSTIIRDKNNKQTVKMLVVVVFAFILCWLPFHVGRYLFSKSFEAGSLEIAVI 281
                                                                p.Ala358Thr
Homem          SQYCNLVSFVLFYLSAAINPILYNIMSKKYRVAVFRLLGFEPFSQRKLSTLKDESSRAWT 360
Rato           SQYCNLVSFVLFYLSAAINPILYNIMSKKYRVAVFKLLGFESFSQRKLSTLKDESSRAWT 358
Camundongo     SQYCNLVSFVLFYLSAAINPILYNIMSKKYRVAVFKLLGFESFSQRKLSTLKDESSRAWT 358
Porco          ------------------------------------------------------------
Galinha        SQYCNLVSFVLFYLSAAINPILYNIMSKKYRVAACRLFGLKALPKKRLSSTKQDSSRVWT 341
```

Figura 4: Alinhamento da sequência de aminoácidos do GHSR de diferentes espécies. As fontes das sequências são: Homo sapiens (GeneBank, NM_198407.1) , Rattus norvegicus (GeneBank ,NM_032075.3), Mus musculus (GeneBank, NM_177330), Sus Scrofa (GeneBank,NM+214180) e Gallus gallus (GeneBank, NM_204394). Os aminoácidos correspondentes às variantes p.Ser84Ile, p.Ala169Thr, p.Val182Ala, p.V249L e p.Ala358Thr estão destacados em vermelho. Os números à direita indicam a seguência de aminoácidos.

4.2.2 - Caracterização da família com a variante p.Val249Leu

Essa alteração foi encontrada em apenas uma paciente do sexo feminino com diagnóstico de DGH isolada. Esta paciente nasceu adequada para a idade gestacional (AIG) e aprentou quadro de baixa estatura proporcional notado a partir dos primeiros anos de vida. À primeira avaliação apresentava 2,5 anos, estatura de 74.4 cm (Z = -4,1) e peso normal [Z do índice de massa corpórea (IMC) = -0,9]. Sua avaliação laboratorial mostrava valores normais de IGF-1 (Z=-0,2), mas ausência de elevação do GH em dois testes de estímulo (pico de GH de 1,0 µg/l no teste da clonidina e 0,8µg/l no ITT) caracterizando o diagnóstico de DGH. Não apresentava outras deficiências hormonais e tinha avaliação por RNM hipotálamo-hipofisária normal. A paciente foi tratada com GH recombinante (rhGH - *Recombinant Human Growth Hormone*) por 10 anos atingindo altura final de 155,1 cm (Z = -0,9), superior à sua altura alvo de 145,2 cm (Z = -2,8). Apresentou desenvolvimento puberal normal com menarca aos 10 anos.

A segregação familiar mostrou que o pai da paciente índice apresentava a mesma variante, também em heterozigose. Este, apesar de ter baixa estatura [H = 150,5 cm (Z = -3,6)], não apresentava deficiência de GH. A variante não foi identificada no irmão da paciente que também apresenta o diagnóstico de deficiência de GH. O heredograma está mostrado na Figura 5.

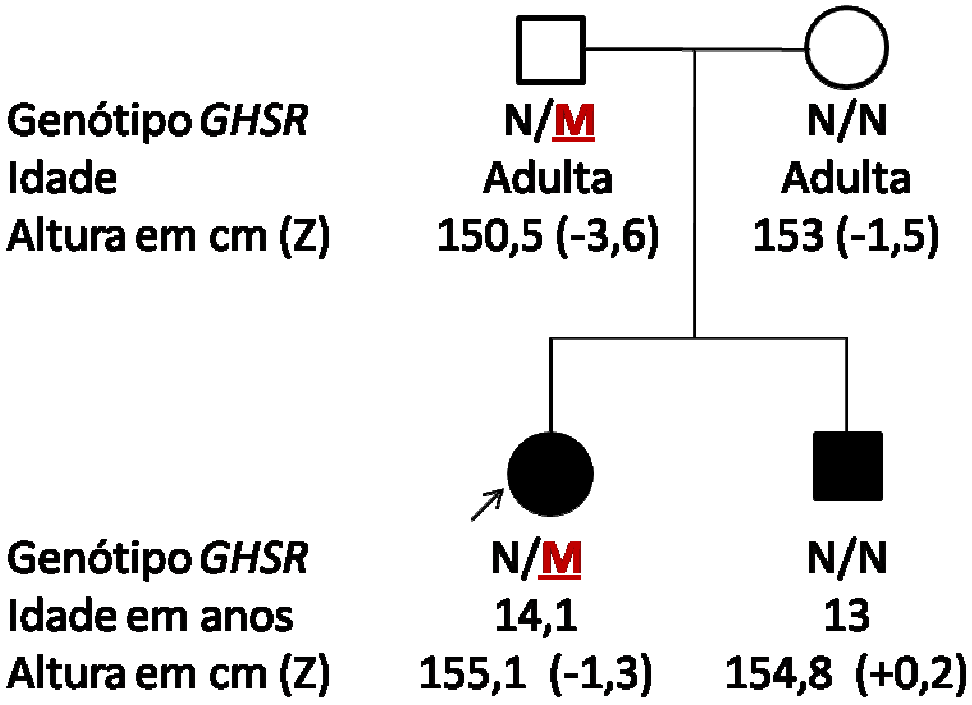

Figura 5: Heredograma da família da paciente portadora de DGH e da variante p.V249L do GHSR. Os quadrados representam os homens e os círculos as mulheres. A letra N indica presença de alelo normal do *GHSR* e a letra M indica presença do alelo mutado. A cor preta indica a presença do fenótipo de DGH. A seta indica o caso índice.

4.3 – Resultados moleculares dos grupos baixa estatura idiopática e atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento

4.3.1 - Análise de DNA

Encontramos cinco novas variantes em heterozigose no *GHSR* em cinco pacientes (3 do sexo masculino e 2 do sexo feminino) do subgrupo ACCD. Não foram encontradas variantes alélicas no gene *GHSR* em pacientes com BEI com puberdade normal. Uma variante está localizada na região 5'UTR, a 6 pares de base do códon de iniciação (c.-6 G>C), enquanto as outras 4 variantes (p.Ser84Ile, p.Ala169Thr, p.Val182Ala e p.Ala358Thr) são missense, e levam a trocas de aminoácidos em resíduos conservados, exceto pela variante p.Ala358Thr (Figura 4). A localização das variantes está mostrada na Figura 3. Nenhuma destas alterações foi encontrada em 694 alelos controles (adultos e crianças obesas de altura normal). Adicionalmente, nenhuma outra mutação foi identificada em toda a região codificadora do *GHSR* das crianças de altura normal (197 indivíduos sequenciados). Notavelmente, a frequencia de variantes alélicas no *GHSR* observada no grupo ACCD (16%) foi maior do que a esperada pelo acaso em comparação com crianças com BEI sem ACCD (p=0,003) e crianças controle (p<0,001). Todos os pacientes e parentes portadores de mutações no *GHSR* foram submetidos à análise da região promotora do *GHSR* e não foram encontradas mutações nesta região. As características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores das variantes no *GHSR* estão mostradas nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Dados clínicos dos pacientes com variantes no *GHSR*

Pacientes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Sexo	F	M	F	M	F	M
Variante	p.Val249Leu	c. -6G>C	p.Ser84Ile	p.Ala169Thr	p.Val182Ala	p.Ala358Thr
Altura paterna [cm (Z)]	150,5 (-3,6)*	164 (-1,6)[?]	165 (-1,4)[?]	175 (+0,0)[?]	181,6 (+1,0)*	164,4 (-1,5)*
Altura materna [cm (Z)]	153 (-1,5)	158 (-0,7)[?]	164,2 (0,3)	145 (-2,9)	154,7 (-1,2)	146,5 (-2,6)
Altura alvo [cm (Z)]	145,2 (-2,8)	167,5 (-1,1)	158,1 (-0,7)	166,5 (-1,2)	161,6 (-0,1)	162 (-1,9)
1ª. Avaliação						
IC em anos	2,5	16,8	12,8	16,7	13,1	16,7
IO em anos	2	13,5	11	14	11	11
Altura [cm (Z)]	74,4 (-4,1)	146,6 (-4,1)	137,5 (-2,4)	154,7 (-2,8)	140,2 (-2,3)	140,7 (-4,9)
Peso (kg)	8,27	41,6	26,3	43,7	43,3	24,6
Z do IMC	-0,9	-0,7	-2,6	-1,2	+0,9	-6,9
Idade de início de puberdade em anos	8	>15	13	16	13	>15
Última avaliação						
IC em anos	14,1	18,8	22,8	20,3	17,7	22
Altura [cm (Z)]	155,1 (-0,8)	158,4 (-2,4)	157,6 (-0,7)	166,5 (-1,2)	154 (-1,4)	159,5 (-2,3)
Peso (kg)	48	47	45,7	50,5	53	32,5
IMC (kg/m^2)	19,8	18,7	18,4	18,2	22,3	12,7
Z do IMC	-0,5	-1,4	-1,2	-1,7	0,3	-7,1

F: feminino M: masculino *: indica a presença da mutação em heterozigose nos pais dos pacientes que foram estudados [?]:indica que não foi avaliado molecularmente

Tabela 6 - Dados laboratoriais dos pacientes com variantes no *GHSR*

Pacientes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Variantes	p.Val249Leu	c. -6G>C	p.Ser84Ile	p.Ala169Thr	p.Val182Ala	p.Ala358Thr
Sexo	F	M	F	M	F	M
IC (anos)	2,8	16,8	13	16,7	13,1	16,8
IGF-1 [ng/ml (Z)]	51 (-0,2)	284 (-3,8)	130 (-2,3)	253 (-4,3)	233 (-1,3)	211 (-1,8)
IGFBP-3 [mg/l (Z)]	NR	3,2 (-2,0)	2,1 (-1,6)	4,8 (0,0)	7,3 (+1,1)	3,2 (-1,8)
Pico de GH em teste de estímulo (µg/L)	0,9	NR	10,3	NR	7,9	NR
Glicemia (mg/dL)	53	87	68	87	80	78
Insulina (µU/mL)	NR	<4,9	<4,9	NR	10	NR
IC (anos)	13,5		22,8	20,5	15	22
IGF-1 [ng/ml (Z)]	428 (0,2)*	NR	175 (-0,5)	NR	600 (+0,7)	195 (-0,1)
IGFBP-3 [mg/l (Z)]	5,9 (+0,3)*	NR	3,1 (-2,2)	NR	5,8 (0,0)	3,1 (-2,2)
Ghrelina basal (pg/ml) [#]	NR	NR	66,5	NR	NR	187,7
Ghrelina pós-prandial (pg/ml)	NR	NR	53,1	NR	NR	198,1
Variação/supressão de ghrelina			- 20%			+ 6%
Glicemia (mg/dL)	83	NR	90	86	82	65
Insulina	12	NR	7,7	NR	10	5,0
Colesterol total (mg/dL)	NR	NR	NR	147	NR	123
HDL	NR	NR	NR	34	NR	34
LDL	NR	NR	NR	92	NR	77
Triglicérides	NR	NR	NR	103	NR	62

*: na vigência do uso de rhGH; NR: não realizado; [#]: valores de referência para ghrelina: 37 ± 20 pg/ml para o sexo masculino e 67 ± 33 pg/ml para o sexo feminino

4.3.1.1 – Variante c.-6G>C

Esta variante está localizada na região 5' UTR anterior ao códon de iniciação, ocorrendo a troca de uma guanina por uma citosina em heterozigose na região não codificadora do *GHSR* (Figura 6) em uma área conservada entre diversas espécies (Figura 7).

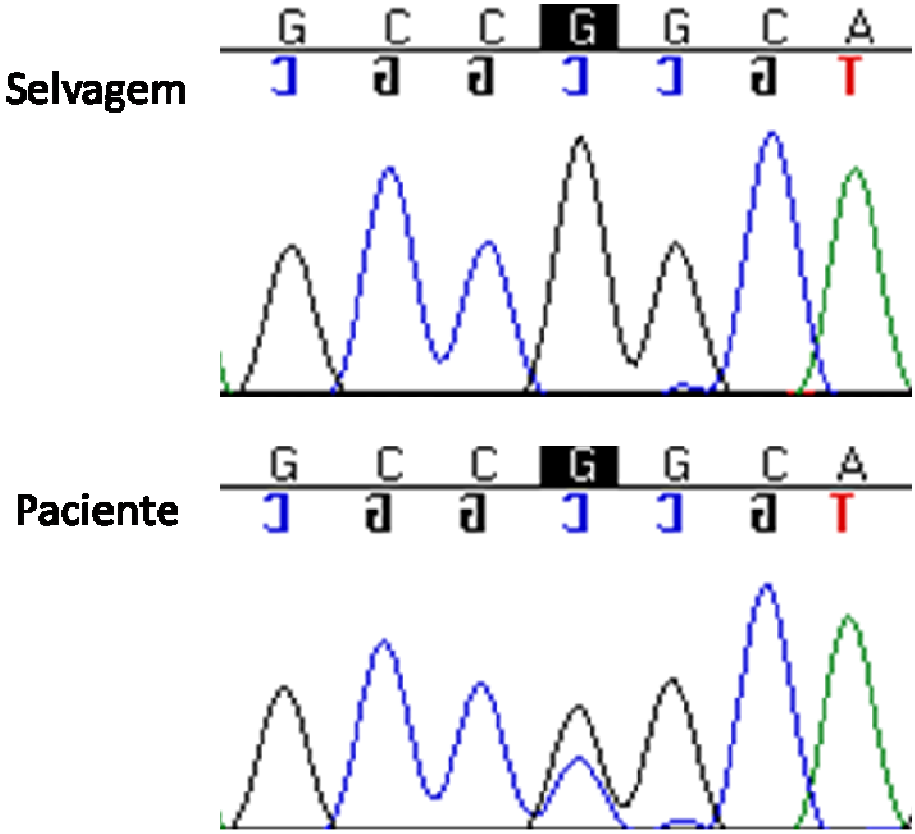

Figura 6: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (c.-6G>C). A região afetada mostra a sequência de nucleotídeos em um indivíduo normal (imagem superior) e a troca em heterozigoze para C no paciente (imagem inferior).

```
                                                                  -6.G>C
Homem          TCCAGCCTCCCAGCGCAGTCACGTCCCAGAGCCTGTTCAGCTGAGCCGGCAGCATGTGGA
Gorila         CCAGCCTCCCAGCGCAGTCACGTCCCAGAGCCTGTTCGGCTGAGCCGGCAGCATGTGGAA
Macaco         CCAGCCTCCCAGCGCAGTCACGTCCTAGAGCCTGTTCGGCTGAGCCGGCAACATGTGGAA
Mouse lemur    CTGGCCTCCCAGCGCAGCCGCGTCGCAGAGCCAGTTCAGCTGAGCCGGCAGCATGTGGAA
Gato           CCAGCCTCTCAGGGCAGTCGCATCCCAGAACCTGTTAAGTGGAGCCCGCAGCATGTGGAA
```

Figura 7: Alinhamento da sequência de nucleotídeos do *GHSR* de diferentes espécies. As fontes das sequências são: *Homo sapiens* (GeneBank, *NM_198407.1*); as sequências de *Gorilla gorilla* ,*Macaca mulatta*, *Microcebus murinus e Felix catus* foram retiradas do banco de dados do ensembl. O nucleotídeo correspondente à variante -6.G>C está destacado em azul. As letras em vermelho indicam os nucleotídeos transcritos, e em destaque (sublinhado e em negrito) o codón de início da tradução.

4.3.1.1.1 - Caracterização da família com a variante c.-6G>C

Esta variante foi identificada em um paciente masculino que aos 16,9 anos apresentava baixa estatura [H = 146,6cm (Z = -4,1)], idade óssea atrasada de 13,5 anos e início de puberdade (estágio 3 de maturação de Tanner). Sua altura final foi 158,4cm (Z = -2,4), abaixo de sua altura alvo de 167,5cm (Z = -1,1). Na avaliação inicial, suas concentrações de IGF-1 e IGFBP-3 eram baixas para idade cronológica, mas adequadas para a idade óssea. Os pais do paciente apresentavam altura normal, porém não foi possível obter informações sobre o início e desenvolvimento da puberdade nem realizar o estudo molecular (heredograma mostrado na Figura 8).

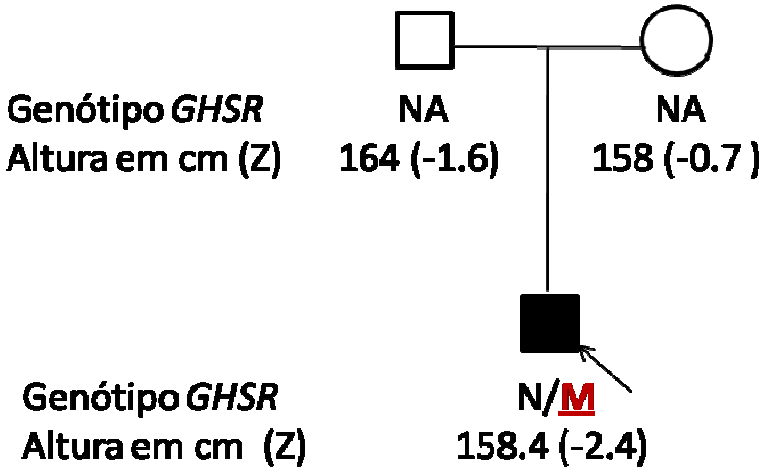

Figura 8: Heredograma da família do paciente portador de ACCD e da variante -6G>C no *GHSR*. Os quadrados representam os homens e os círculos as mulheres. A letra N indica presença de alelo normal do *GHSR* e a letra M indica presença do alelo mutado. NA indica não avaliado. A cor preta indica a presença do fenótipo de baixa estatura e atraso puberal. A seta indica o caso índice. As alturas indicadas são alturas finais.

4.3.1.2 – Variante c.251G>T

Esta variante consiste de uma substituição nucleotídea (c.251G>T) levando à troca de serina por isoleucina no códon 84 (p.Ser84Ile) (Figura 9), na segunda alça transmembrana.

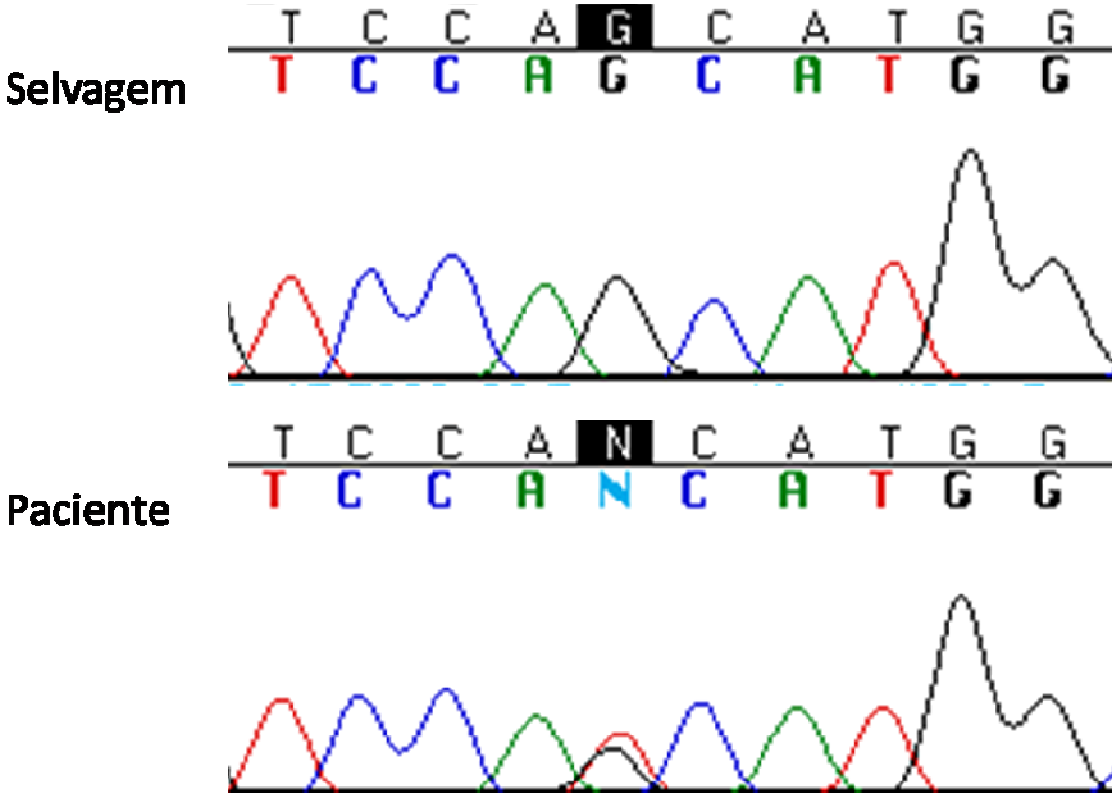

Figura 9: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.S84I). A região afetada mostra a sequência de nucleotídeos AGC que codifica o aminoácido serina na posição 84 em um indivíduo normal (imagem superior) e a troca em heterozigoze para ATC que codifica o aminoácido isoleucina na paciente (imagem inferior).

4.3.1.2.1 - Caracterização da família com a variante p.Ser84Ile

Essa variante foi identificada em uma paciente feminina com diagnóstico de ACCD. Em sua primeira avaliação, apresentava 12,8 anos, altura de 137,5 cm (Z = -2,4), baixo peso (Z IMC = -2,6) e idade óssea atrasada compatível com 11 anos. Sua avaliação laboratorial mostrava valores baixos de IGF-1 e normal baixo de IGFBP-3, porém com resposta normal de secreção de GH ao teste de estímulo (pico de GH = 10,3 µg/L). Logo após esta consulta a paciente

entrou em puberdade, aos 13 anos, e apresentou menarca aos 16 anos. A paciente alcançou altura final de 157,6 cm (Z = -0,8)] compatível com altura alvo [158,1 cm (Z = -0,7)], mas manteve IMC baixo de 18,4 kg/m^2. Na idade adulta, normalizou as concentrações de IGF-1, porém manteve valores baixos de IGFBP-3 e apresentou concentrações normais de ghrelina com supressão adequada após ingestão de refeição rica em carboidratos, e não apresentou alterações metabólicas.

Aos 21 anos, a paciente deu à luz a uma criança saudável. O heredograma familiar está mostrado na Figura 10. A mutação não foi encontrada na mãe de altura normal da paciente, e seu pai não estava disponível para avaliação. Um irmão e uma irmã de altura normal e sem atraso puberal possuem a mesma mutação.

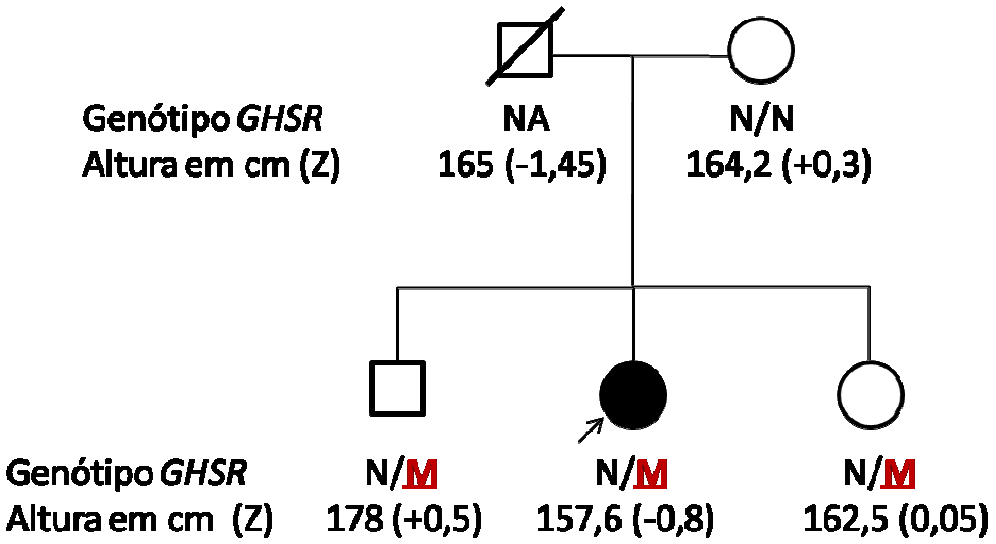

Figura 10: Heredograma da família da paciente portadora de ACCD e da variante p.S84I. Os quadrados representam os homens e os círculos as mulheres. A letra N indica presença de alelo normal do *GHSR* e a letra M indica presença do alelo mutado. NA indica não avaliado. A cor preta indica

a presença do fenótipo de baixa estatura e atraso puberal. A seta indica o caso índice. As alturas indicadas são alturas finais.

4.3.1.3 – Variante c.505G>A

Esta variante decorreu de uma troca de guanina por adenosina em heterozigose na posição 505 do c.DNA do gene *GHSR* (c.505G>A) (Figura 11), resultando na substituição de uma alanina por uma treonina na posição 169 do receptor (p.Ala169Thr), na sua quarta alça transmembrânica (Figura 3).

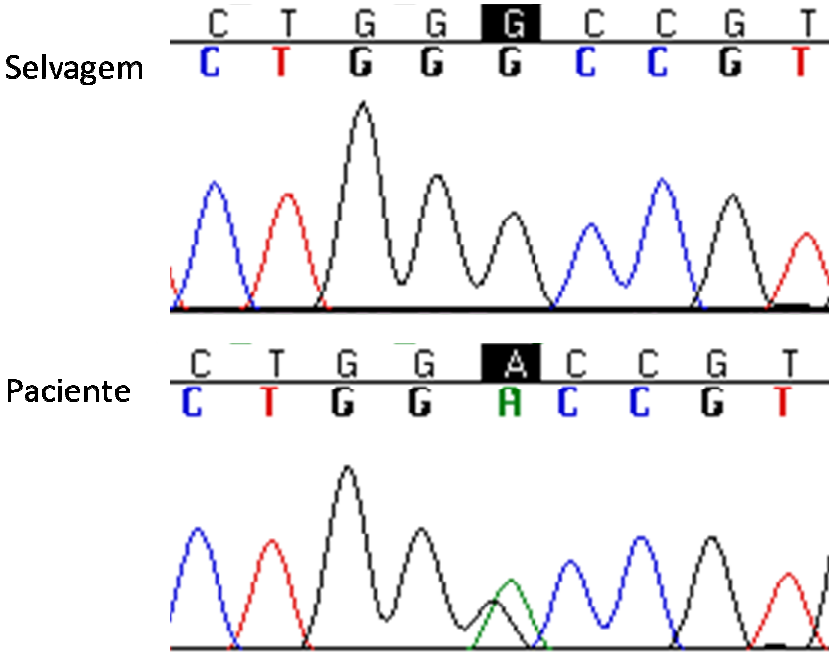

Figura 11: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.A169T). A região afetada mostra a sequência de nucleotídeos GCC que codifica o aminoácido alanina na posição 169 em um indivíduo normal (imagem superior) e a troca em heterozigoze para ACC que codifica o aminoácido treonina no paciente (imagem inferior).

4.3.1.3.1 - Caracterização da família com a variante p.Ala169Thr

Esta variante foi encontrada em um paciente do sexo masculino com diagnóstico de ACCD que vinha com déficit de crescimento notado a partir dos 8 anos de idade. Aos 16,7 anos, em sua primeira avaliação em nosso serviço, apresentava baixa estatura [H = 154,7 cm (Z = -2,8)], peso no limite inferior da normalidade (Z IMC = -1,2), idade óssea atrasada (IO = 14 anos) e história de início de puberdade somente aos 16 anos. Tinha valores muito baixos de IGF-1 (mas adequados para idade óssea) e valores normais de IGFBP-3. O paciente não foi submetido a nenhum tratamento específico e alcançou altura final de 166,5 cm (Z = -1,2), idêntica à sua altura alvo.

A mãe do paciente, que tinha baixa estatura e puberdade atrasada, e seu irmão mais novo, que tinha histórico de atraso puberal, não apresentavam a variante p.A169T. O pai do paciente de altura normal era falecido e não foi possível realizar sua avaliação molecular. O paciente apresentava ainda 8 irmãos mais velhos que não estavam disponíveis para avaliação clínica ou molecular. O heredograma está mostrado na Figura 12.

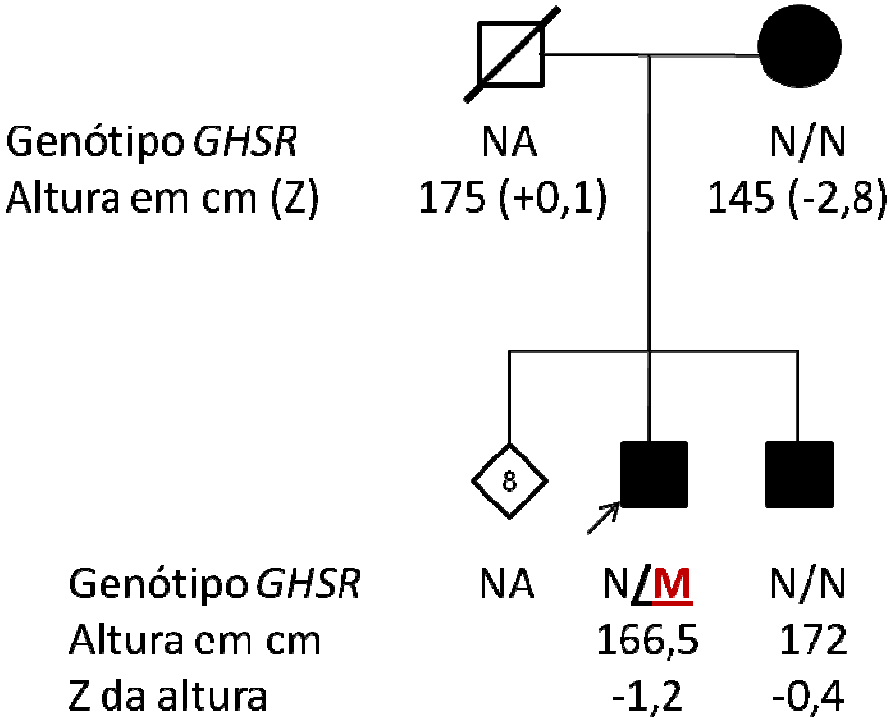

Figura 12: Heredograma da família do paciente portador de ACCD e da variante p.A169T. Os quadrados representam os homens e os círculos as mulheres. O triângulo representa oito irmãos dos quais não temos dados clínicos nem moleculares. A letra N indica presença de alelo normal do *GHSR* e a letra M indica presença do alelo mutado. NA representa não avaliado. A cor preta indica a presença do fenótipo de baixa estatura e atraso puberal. A seta indica o caso índice. As alturas indicadas são alturas finais.

4.3.1.4 – Variante c.545 T>C

A variante c.545T>C no exon 1 resultou na troca de uma valina por uma alanina na posição 182 no GHSR (p.Val182Ala) (Figura 13) na terceira alça extracelular (Figura 3).

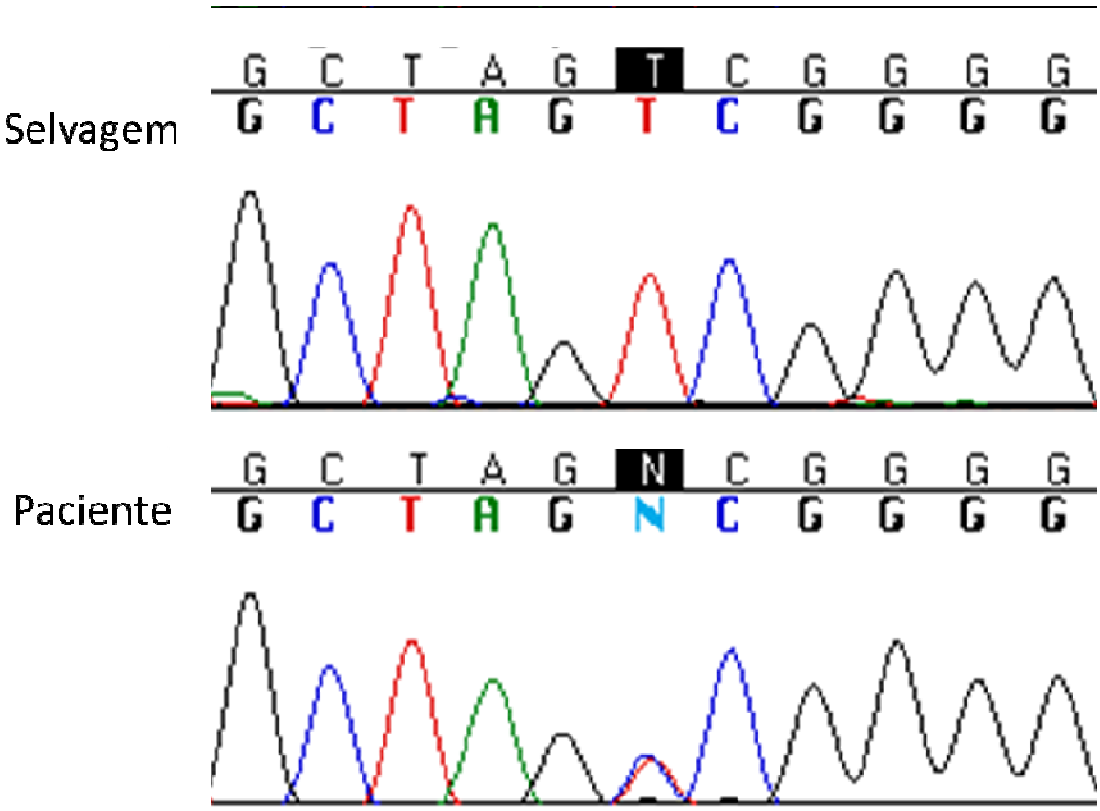

Figura 13: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.V182A). A região afetada mostra a sequência de nucleotídeos GTC que codifica o aminoácido valina na posição 182 em um indivíduo normal (imagem superior) e a troca em heterozigoze para GCC que codifica o aminoácido alanina na paciente (imagem inferior).

4.3.1.4.1 - Caracterização da família com a variante p.Val182Ala

Essa alteração foi encontrada em heterozigoze em uma paciente do sexo feminino com ACCD que foi inicialmente avaliada aos 12,8 anos, com altura de 138,5 cm (Z=-2,2), peso normal (Z IMC=+1,0), atraso de idade óssea (IO=11 anos) e pré-púbere. Suas concentrações de IGF-1 e IGFBP-3

encontravam-se dentro dos valores de referência, e apresentou pico de GH normal no teste de estímulo. A paciente iniciou puberdade aos 13,2 anos e teve menarca aos 14 anos. Alcançou altura final foi 154 cm (Z=-1,4), inferior a sua altura alvo de 161,6 cm (Z=-0,1), e manteve peso normal (IMC=22,3).

Em relação à segregação da mutação na família (ver heredograma na Figura 14), a mutação p.Val182Ala também foi identificada no pai e na irmã da paciente. O pai relatou histórico de atraso puberal e altura final normal. A irmã, além de também apresentar histórico de atraso puberal, foi tratada com rhGH na adolescência devido a baixa estatura e possível deficiência de GH [apresentava pico de GH em um único teste de estímulo (clonidina) de 1.8 µg/L], alcançando altura final de 155cm (Z = -1.2).

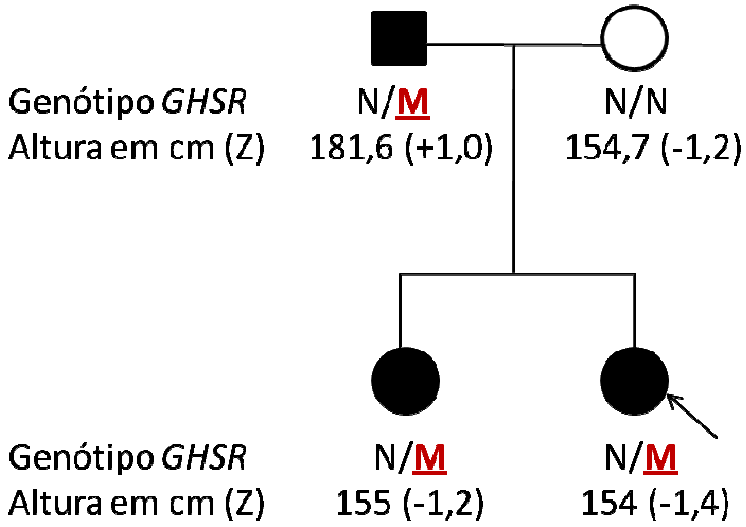

Figura 14: Heredograma da família da paciente portadora de ACCD e da variante p.V182A. Os quadrados representam os homens e os círculos as mulheres. A letra N indica presença de alelo normal do *GHSR* e a letra M indica presença do alelo mutado. NA indica não avaliado. A cor preta indica a presença do fenótipo de baixa estatura e atraso puberal. A seta indica o caso índice. As alturas indicadas são alturas finais.

4.3.1.5– Variante c.1072G>A

Esta variante consiste de uma substituição nucleotídea (c.1072G>A) no éxon 2 do *GHSR* levando à troca de alanina por treonina no códon 358 (p.Ala358Thr) (Figura 15). A mutação está localizada na porção carbóxi-terminal do receptor, ilustrada na Figura 3.

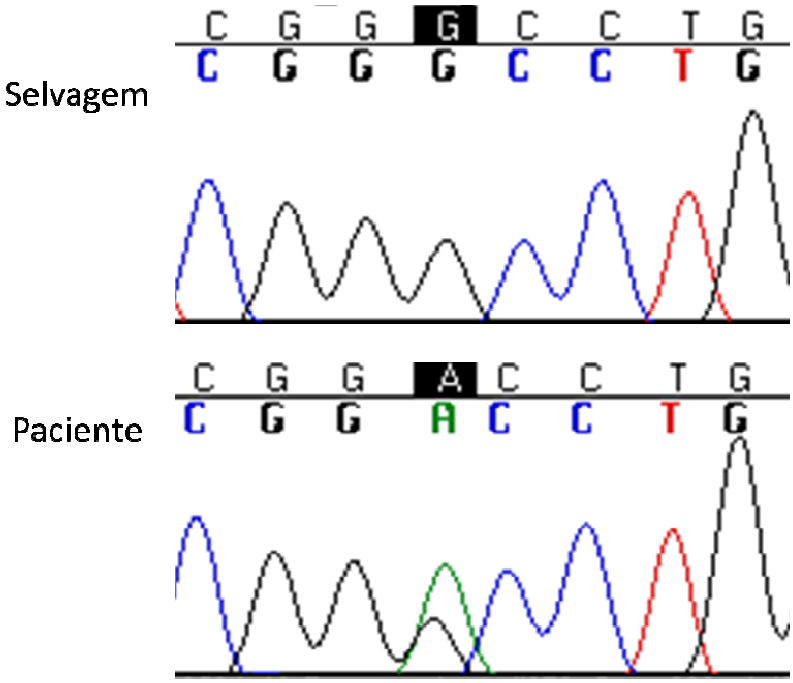

Figura 15: Sequência de nucleotídeos do gene *GHSR* selvagem e mutante (p.A358T). A região afetada mostra a sequência de nucleotídeos GCC que codifica o aminoácido alanina na posição 358 em um indivíduo normal (imagem superior) e a troca em heterozigoze para ACC que codifica o aminoácido treonina no paciente (imagem inferior).

4.3.1.5.1- Caracterização da família com a variante p.Ala358Thr

O paciente masculino portador desta variante foi avaliado inicialmente aos 16,7 anos. Apresentava défict estatural com H = 140,7 cm (Z=-4,9) e baixo peso [IMC=12,4 kg/m^2 (Z=-7,1)] importantes, atraso de idade óssea (IO=11a) e início de puberdade (estágio 3 de maturação de Tanner). Apresentava queixa de dor abdominal recorrente sem causa aparente e relatava pouco apetite. Durante a investigação, avaliação ultrassonográfica, endoscópica e laboratorial (incluindo provas de atividade inflamatória e investigação para doença celíaca) foram normais. Suas concentrações de IGF-1 e IGFBP-3 estavam no limite inferior da normalidade. O paciente foi seguido clinicamente, alcançou altura final de 159,5cm (Z=-2,3), abaixo da sua altura alvo (162 cm, Z=-1,9), e manteve o baixo peso (IMC=12,7 kg/m^2) na vida adulta. A ghrelina estava aumentada e não apresentou supressão após teste de refeição.

A avaliação familiar evidenciou a presença da mesma mutação no pai de altura normal e na irmã com baixa estatura (heredograma mostrado na Figura 16). Ambos apresentavam puberdade de início normal e peso adequado para a altura.

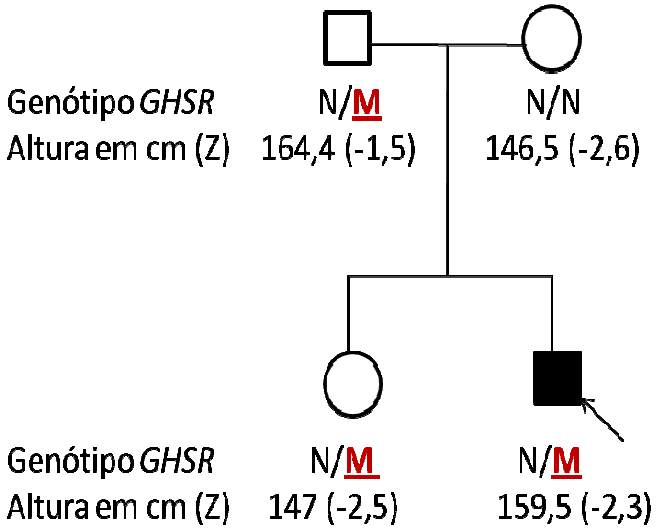

Figura 16: Heredograma da família do paciente portador de ACCD e da variante p.A358T do GHSR. Os quadrados representam os homens e os círculos as mulheres. A letra N indica presença de alelo normal do *GHSR* e a letra M indica presença do alelo mutado. NA indica não avaliado. A cor preta indica a presença do fenótipo de baixa estatura e atraso puberal. A seta indica o caso índice. As alturas indicadas são alturas finais.

4.4 – Resultados - Estudos funcionais das variantes do *GHSR*

4.4.1 – Atividade basal e expressão em superfície celular

Consistente com estudos prévios usando ensaio de luciferase (15, 34), o GHSR WT exibiu um alto nível de atividade constitutiva (ou seja, sinaliza na ausência de agonista). A variante V182A mostrou 50% de redução na atividade basal em relação ao *wild type*. Atividade basal residual quase nula foi observada para a variante S84I. Em contraste, V249L, A169T e A358T tiveram nível de atividade basal comparável ao GHSR WT.

Em paralelo, níveis de expressão em superfície celular dos receptores mutados foram determinados por ELISA (Figura 17; Tabela 7). Estes estudos revelaram que os variantes com diminuição de sinalização basal (V182A e S84I) também foram expressos numa densidade menor relativa ao GHSR WT (100%). Consistente com a maior perda de função de sinalização observada, a variante S84I mostrou pobre expressão em superfície celular. O mutante V182A mostrou níveis intermediários de atividade basal e expressão do receptor. Em contraste, cada um dos variantes com atividade basal normal (V249L, A169T e A358T) mostrou expressão em superfície celular comparável ao receptor *wild type*.

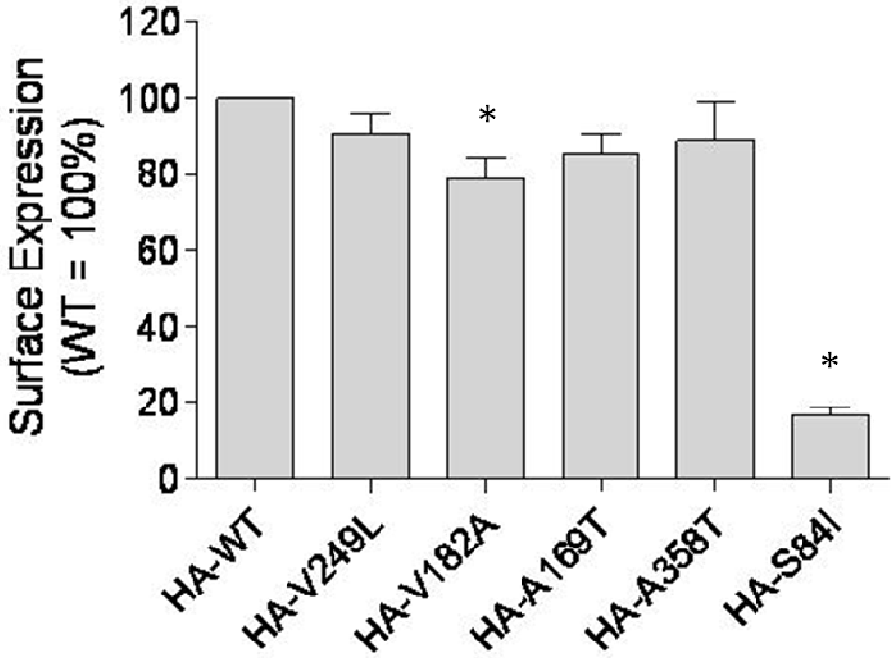

Figura 17: Variantes do GHSR selecionadas mostram diminuição da expressão em superfície celular. Células HEK 293 foram transfectadas com plasmídeo contendo GHSR ligado a HA mutado ou *wild type*. Após 48 horas, expressão em superfície celular foi medida por ELISA conforme descrito na seção métodos. Valores foram normalizados relativamente ao valor máximo

observado no GHSR *wild type* e representam a média ± erro padrão do meio de pelo menos 03 experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. ** p< 0,01 nível de expressão do GHSR mutante versus *wild type,* análise de variância seguida pelo pós teste de Dunnett's.

Tabela 7 - Propriedades farmacológicas do GHSR1a *wild type* versus mutado

Receptor	Ghrelina		Atividade Basal[b]	Expressão em superfície[c]
	EC50 (nM)	pEC50		
GHSR1a WT	1,4	8,95 ± 0,07	100	100
V249L	2,3	8,82 ± 0,16	109 ± 5	87 ± 6
V182A	2,6	8,71 ± 0,12	52 ± 3[a]	77 ± 6[a]
A169T	2,9	8,70 ± 0,16	103 ± 2	81 ± 6
A358T	4,1	8,58 ± 0,25	88 ± 4	85 ± 10
S84I	7,4	8,25 ± 0,19[a]	3 ± 1[a]	15 ± 3[a]

Todos os valores representam a média ± erro padrão do meio de pelo menos 5 experimentos independentes.
[a] Valor significantemente diferente ($p < 0.01$) versus *wild type* GHSR1a
[b] Porcentagem da sinalização basal em relação ao *wild type* GHSR1a
[c] Porcentagem da expressão em superfície em relação ao *wild type* GHSR1a

4.4.2 – Potência da ghrelina

A estimulação das variantes GHSR com ghrelina mostrou um aumento dependente de concentração na atividade de sinalização mediada pelo receptor. A potência agonista foi comparada ao *wilt-type* para os receptores V249L, V182A, A169T and A358T (Figura 18; Tabela 7). Em contraste, a variante S84I mostrou uma redução significante na transdução do sinal intracelular estimulada pela ghrelina.

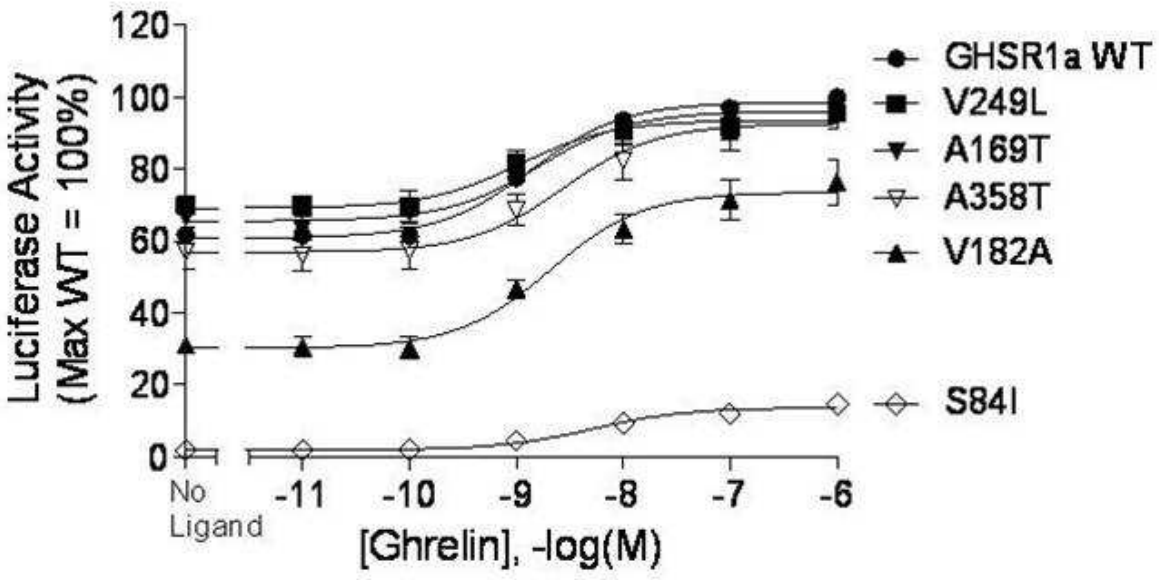

Figura 18: Atividade basal e após estímulo com ghrelina do *GHSR* mutados em comparação com o *wild-type*. Células HEK 293 foram transitoriamente infectadas com vetores contendo o cDNA do *GHSR* e gene reporter SRE-Luciferase. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram estimuladas em meio contendo ou nenhum peptídeo (basal) ou com concentrações crescentes de ghrelina. Após o estímulo, a atividade de luciferase foi quantificada conforme descrito em métodos. Todos os valores foram normalizados relativamente ao máximo de estímulo pela ghrelina no GHSR *wild type*. Os valores representam a média ± erro padrão do meio de pelo menos 03 experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

5-Discussão

DISCUSSÃO

Baixa estatura é definida por escore de desvio padrão da altura para idade e sexo (Z da altura) inferior a – 2 (1), e seu diagnóstico diferencial compreende diversas patologias endócrinas e não endócrinas. Dentre as causas endócrinas temos a deficiência de GH, patologia rara que acomete uma em 3.000 a 10.000 crianças e é caracterizada por baixa estatura proporcional, baixa velocidade de crescimento, atraso de idade óssea e características fenotípicas típicas (obesidade truncal, nariz em sela, fronte olímpica, etc.). Pode ser decorrente de mutações genéticas, trauma ou tumores de região hipotálamo-hipofisária, e na ausência destas condições é considerada de etiologia indefinida ou idiopática (43).

A baixa estatura idiopatica é definida pela presença de baixa estatura na ausência de anormalidades sistêmicas, endócrinas, nutricionais ou cromossômicas (44), e é a causa mais comum de baixa estatura. Embora tenham características e fisiopatologia diferentes, baixa estatura familiar (altura compatível com a altura familiar) e atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento (baixa estatura na infância associada a atraso puberal com altura final normal) compreendem subtipos de baixa estatura idiopática (44).

O GHSR, sob estímulo da ghrelina, estimula a secreção de GH e o apetite (9), sendo um possível candidato biológico a modular/influenciar a altura. Embora alguns estudos de GWAS (*Genome wide association study*) (45, 46) e estudos de haplótipos (47, 48) não tenham mostrado evidências da associação de variantes comuns do *GHSR* com altura, mutações no *GHSR* raras, mas funcionalmente significantes foram descritas em pacientes com deficiência de GH isolada idiopática e BEI (2-5), sinalizando a importância deste receptor na etiologia da baixa estatura. Mais recentemente, dois grandes estudos de GWAS demonstraram uma forte associação entre o locus do *GHSR* e a determinação da altura (32, 33). Sendo assim, estudamos a presença de mutações no *GHSR* na nossa

casuística de pacientes com DGH idiopático e BEI, incluindo pacientes com ACCD.

Encontramos 6 variantes em heterozigose no *GHSR:* nenhuma presente em um grande número de controles e todas, exceto as variantes p.Val249Leu e p.Ala358Thr, estão localizadas em regiões conservadas do gene. Uma variante foi encontrada em uma paciente do grupo DGH (p.Val249Leu) e as outras cinco (c.-6 G>C, p.Ser84Ile, p.Val182Ala, p.Ala169Thr e p.Ala358Thr) foram encontradas em pacientes do subgrupo ACCD do grupo BEI. Estudo funcional destas variantes da região codificadora do *GHSR* revelou que as mutações p.Ser84Ile e p.Val182Ala são funcionalmente deficientes e possuem diminuição na atividade basal associadas à diminuição da expressão em superfície celular. Adicionalmente, a mutação p.Ser84Ile também apresenta redução na atividade induzida pelo ligante. Não encontramos mutações na região promotora do *GHSR* em nenhum paciente ou familiar portador de mutação no *GHSR*.

5.1 – Variante no *GHSR* em paciente do grupo DGH

A variante p.Val249Leu foi encontrada em uma paciente do sexo feminino com diagnóstico de DGH isolado. No entanto seu irmão, que apresentava o mesmo quadro clínico e diagnóstico, não possui a mutação. A falta de segregação familiar associada à ausência de déficit funcional da variante nos estudos *in vitro* sugere que, neste caso, p.Val249Leu não é a causa do fenótipo de DGH nesta família e trata-se de uma variante alélica rara.

Na literatura 3 mutações no *GHSR* já foram encontradas em pacientes com DGH (3, 4). Nossa casuística de DGH isolada foi pequena (apenas 14 pacientes), o que pode ter influenciado nosso resultado. A rigidez de nosso critério diagnóstico para DGH [utilizamos o valor de corte de

3,3 µg/L na dosagem de GH no teste de estímulo (36) e incluímos apenas de pacientes com RNM hipófise normal] pode explicar o baixo número de casos incluídos na casuística. Vários trabalhos da literatura incluem pacientes com picos de GH < 10 ng/ml, possivelmente contaminando sua casuística de DGH com BEI. Mesmo assim, nosso resultado negativo corrobora o fato de que mutações no *GHSR* não são uma causa frequente de DGHI.

5.2 – Variantes no *GHSR* em pacientes do grupo BEI

As 5 variantes no *GHSR* (c.-6 G>C, p.Ser84Ile, p.Val182Ala, p.Ala169Thr e p.Ala358Thr) encontradas neste grupo foram identificadas apenas em pacientes que apresentavam puberdade atrasada, ou seja, pertencentes ao subgrupo ACCD (3 do sexo masculino e 2 do sexo feminino). Estudos recentes utilizando seqüenciamento genômico global evidenciaram que indivíduos saudáveis podem diferir da sequência de referencia por apresentar variante alélica potencialmente patogênica em 250 a 300 genes (49). Focando no *GHSR*, nenhuma mutação foi identificada por seqüenciamento genômico em 179 indivíduos, uma coorte inicial dos 1000 *genome project* (http://browser.1000genomes.org/index.html) (49). Além disso, a ausência de variantes gênicas novas no *GHSR* no grupo de crianças obesas com altura normal e mesmo no grupo de crianças com BEI sem ACCD sugere que nosso achado não foi casual e que as alterações descritas podem estar associadas ao fenótipo de ACCD.

Os estudos *in vitro* mostraram prejuízos funcionais em 2 destas variantes (p.Ser84Ile e p.Val182Ala), que serão a partir de agora designadas como mutações. A mutação p.Ser84Ile tem um déficit funcional mais grave: além de diminuição da atividade basal e expressão em superfície celular também apresenta redução na atividade induzida pelo ligante. Estes estudos funcionais foram realizados em células heterólogas, e é possível que o microambiente celular endógeno das outras mutações possa resultar em função prejudicada do GHSR que não fica evidente quando estudado em células HEK293. Portanto não podemos afastar que as demais variantes não tenham algum impacto funcional *in vivo*. No entanto, o mais provável é que

elas sejam apenas variantes alélicas raras. A realização dos estudos funcionais em células como GH3 e αT3, que são células hipofisárias que secretam hormônio de crescimento e gonadotrofinas, respectivamente, além do estudo de animais transgênicos expressando as variantes encontradas, poderiam ajudar a entender melhor o papel destas variantes na função do *GRSR.*

Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento ocorre quando indivíduos saudáveis iniciam espontaneamente a puberdade em idade 2 desvios padrão acima da idade média para o início puberal (após os 13 anos em mulheres e 14 anos em meninos) (50). ACCD é uma das desordens mais comuns do crescimento e é muito mais freqüente em homens do que em mulheres (51-53). Classicamente os pacientes apresentam atraso de idade óssea e baixa estatura transitória decorrente de estirão puberal tardio e atenuado (50).

Estudos mostram que 50-80% da variabilidade do início puberal é geneticamente determinada (51, 53). A análise de famílias com ACCD mostram um padrão de herança autossômico dominante com ou sem penetrância incompleta (51). É possível que ACCD resulte de uma herança poligênica complexa, porém a análise de famílias sugere que genes isolados (que podem ter modificadores ambientais ou genéticos) também possam ter um efeito determinante do fenótipo (51). Embora um estudo de associação genômica completa (GWAS - ge*nome-wide association study*) tenha mapeado um lócus cosegregando com ACCD no cromossomo 2 (54), estudos prévios falharam em identificar mutações em diversos genes candidatos (genes da leptina, receptor da leptina, subunidade ácido-lábil, *LIN28B, GPR54, GNRH* e *GNRHR*) em pacientes com ACCD (55-60). O *GHSR,* localizado no cromossomo 3*,* não havia sido previamente investigado em pacientes com ACCD (2-4). Embora nosso estudo não tenha sido desenhado especificamente para avaliar esta questão, nossos resultados são instigantes, e abrem a perspectiva de que o *GHSR* possa estar implicado no desenvolvimento puberal. Seria interessante investigar outros

grupos de pacientes com ACCD para determinar a freqüência de mutações no *GHSR* em outras populações

No presente estudo, as duas mutações funcionalmente deficientes (p.Ser84Ile e p.Val182Ala) foram encontradas em pacientes do sexo feminino que foram inicialmente avaliadas por quadro de baixa estatura na infância decorrente de ACCD. Ambas tiveram evolução normal da puberdade após o seu início e atingiram altura final normal. Em relação à segregação familiar, a mutação p.Ser84Ile foi encontrada em membros da família que não apresentavam o fenótipo (2 irmãos portadores da mutação com altura e início puberal normais) enquanto a mutação p.Val182Ala segregou com o fenótipo de ACCD na família (pai e irmã portadores da mutação e com histórico de ACCD). Isto sugere um modo de herança autossômico dominante com penetrância incompleta. Penetrância incompleta refere-se à situação em que, num grupo de indivíduos com o mesmo genótipo, alguns não expressam o fenótipo esperado. Penetrância incompleta já foi descrita em várias doenças em endocrinologia (61-64) e é o padrão de herança observado na maioria das famílias portadoras de mutações no GHSR descritas na literatura até então (3) e em famílias com ACCD (51). Algumas possibilidades para explicar a penetrância incompleta seria a combinação de múltiplos fatores ambientais e genéticos, como variantes em outros loci e herança digênica. Estudamos a região promotora do *GHSR* nos pacientes e parentes portadores de variantes no *GHSR* para avaliar se alterações nesta região poderiam explicar a variabilidade do fenótipo (penetrância incompleta), mas não encontramos nenhuma mutação. No entanto, outros genes podem estar implicados, e estudos de seqüenciamento genômico global poderão ajudar a encontrar variações no genoma responsáveis pela variabilidade do fenótipo.

A ghrelina é sabidamente um hormônio orexigênico, e seria esperado que mutações inativadoras de seu receptor levassem a diminuição de apetite e baixo peso. Nossa paciente portadora da mutação p.Ser84Ile sempre foi magra, enquanto a portadora da mutação p.Val182Ala apresenta peso

normal. Já na literatura temos pacientes descritos com peso normal ou obesos (mutações p.Ala204Glu e p.Phe279Leu) e pacientes magros (mutação p.Trp2X + p.Arg237Trp) (2-4, 34). De fato, parece que mutações mais graves no *GHSR* que levam a prejuízo funcional tanto da atividade basal do receptor quanto da função estimulada pelo ligante [é o caso da mutação p.Ser84Ile,descrita no presente estudo, e da mutação p.Trp2X(4)] levam a fenótipo de magreza, enquanto mutações que alteram somente a atividade basal mas preservam pelo menos parcialmente a ação estimulada do receptor (mutação p.Val182Ala, descrita no presente estudo, e as mutações p.Ala204Glu e p.Phe279Leu) levam a fenótipos variáveis de peso (2, 3, 34). Ou seja, mutações que provocam deficiência total de função do receptor levam ao fenótipo esperado em relação ao peso, já deficiências parciais do receptor podem ser compensadas por mecanismos ambientais e genéticos levando a variabilidade do fenótipo do peso.

Embora o mecanismo exato que deflagra a puberdade ainda seja desconhecido, sabemos que o início da puberdade é sensível às reservas energéticas do organismo, especialmente em mulheres [revisto em (65)]. A obesidade está associada à puberdade mais precoce em meninas, através da modulação pela leptina, que parece ter um efeito permissivo para o início da puberdade (66). Recentemente a ghrelina, que funciona como antagonista da leptina, vem sendo considerada um modulador pleiotrófico da função gonadal (23, 24). Um efeito inibitório da ghrelina nos níveis basais e estimulados de LH já foi demonstrado em vários estudos, em animais e em humanos (24, 25). Injeções de ghrelina acilada e não acilada (incapaz de se ligar ao GHSR1a) em camundongos significantemente diminuiu os níveis de LH, assim como parcialmente atrasou o início da puberdade (23, 67-69), sugerindo que a influência negativa da ghrelina no eixo gonadotrófico se faça através de mecanismos independentes do GHSR1a. Em humanos, demonstrou-se que as concentrações de ghrelina vão caindo progressivamente conforme a progressão da puberdade (70), e estudo recente mostrou que crianças com ACCD apresentam concentrações de ghrelina significantemente maiores do que controles (71), o mesmo não

acontecendo com crianças com BEI (72). Portanto a ghrelina, com suas ações inibitórias sobre o eixo reprodutivo, pode mediar, pelo menos em parte, o já conhecido efeito supressor do déficit energético no início da puberdade (24).

Nossa hipótese é que as mutações no *GHSR* levariam a uma diminuição de apetite e consenquente redução do peso, sinalizando como um sinal de insuficiencia energética e consequentemente contribuindo para o atraso puberal. Além disso, atraso puberal é observado em situações clínicas associadas a valores baixos de IGF-1 (73, 74), sugerindo que o IGF-1 exerça efeito estimulatório, sinergístico ou permissivo no início da puberdade (75). Portanto, concentrações baixas de IGF-1 causadas pela haploinsuficiência do *GHSR* poderiam também modular negativamente o início da puberdade.

Em conclusão, este é o primeiro relato de mutações no *GHSR* em pacientes com ACCD, uma condição com um componente hereditário importante ainda sem uma causa genética conhecida. Embora não seja possível descartar que o fenótipo não esteja relacionado às mutações no *GHSR*, nossos achados instigam a necessidade de novos estudos para explorar o papel do GHSR no controle puberal.

6-Conclusões

CONCLUSÕES

1. Mutações com efeito deletério sobre a função do GHSR não foram identificadas em pacientes com deficiência isolada de GH na presente casuística.

2. Identificamos duas mutações funcionalmente significantes (p.Ser84Ile e p.Val182Ala) em pacientes com baixa estatura idiopática, exclusivamente no subgrupo de pacientes com atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento.

3. A segregação familiar das mutações encontradas sugere modo de herança autossômico dominante, e no caso da mutação p.Ser84Ile com penetrância incompleta.

4. Estes resultados sugerem um envolvimento dos defeitos no *GHSR* na etiologia do atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento em uma parcela de pacientes com esta condição.

7-Referências

REFERÊNCIAS

1. Jorge A, Marui,S. , Mendonca, B. B., Arnhold I.J.P. . Crescimento normal e baixa estatura. In: Atheneu, editor. Endocrinologia: Mario J. A. Saad, Rui M. B. Maciel , Berenice B. Mendonca; 2007.

2. Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schauble N, Friedel S, Lichtner P, et al. Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. J Clin Endocrinol Metab2004 Jan;89(1):157-62.

3. Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, et al. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. J Clin Invest2006 Mar;116(3):760-8.

4. Pantel J, Legendre M, Nivot S, Morisset S, Vie-Luton MP, le Bouc Y, et al. Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor. J Clin Endocrinol Metab2009 Nov;94(11):4334-41.

5. Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, et al. Identification and Functional Analysis of Novel Human Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHSR) Gene Mutations in Japanese Subjects with Short Stature. J Clin Endocrinol Metab2011 Nov 17;96(2):373-8.

6. Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. Endocrinology1980 Mar;106(3):663-7.

7. Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. Endocr Rev1997 Oct;18(5):621-45.

8. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. Science1996 Aug 16;273(5277):974-7.

9. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature1999 Dec 9;402(6762):656-60.

10. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. Physiol Rev2005 Apr;85(2):495-522.

11. van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. Endocr Rev2004 Jun;25(3):426-57.

12. Lengyel AM. From growth hormone-releasing peptides to ghrelin: discovery of new modulators of GH secretion. Arq Bras Endocrinol Metabol2006 Feb;50(1):17-24.

13. Petersenn S, Rasch AC, Penshorn M, Beil FU, Schulte HM. Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. Endocrinology2001 Jun;142(6):2649-59.

14. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. J Clin Endocrinol Metab2002 Jun;87(6):2988.

15. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. Mol Endocrinol2003 Nov;17(11):2201-10.

16. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. Proc Natl Acad Sci U S A2008 Apr 29;105(17):6320-5.

17. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. Cell2008 Feb 8;132(3):387-96.

18. Dimaraki EV, Jaffe CA. Role of endogenous ghrelin in growth hormone secretion, appetite regulation and metabolism. Rev Endocr Metab Disord2006 Dec;7(4):237-49.

19. Rodrigues AM, Suplicy,H.L. , Rasominski,R.B. Controle Neuroendocrino do Peso Corporal: Implicações na Gênese da Obesidade. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia 2003;47(4):389-409.

20. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes2001 Aug;50(8):1714-9.

21. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. J Endocrinol Invest2001 Jun;24(6):RC19-21.

22. Casanueva FF, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. Front Neuroendocrinol1999 Oct;20(4):317-63.

23. Roa J, Garcia-Galiano D, Castellano JM, Gaytan F, Pinilla L, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty onset: New players, new mechanisms. Mol Cell Endocrinol2009 Dec 21.

24. Tena-Sempere M. Ghrelin as a pleotrophic modulator of gonadal function and reproduction. Nat Clin Pract Endocrinol Metab2008 Dec;4(12):666-74.

25. Lorenzi T, Meli R, Marzioni D, Morroni M, Baragli A, Castellucci M, et al. Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system. Cytokine Growth Factor Rev2009 Apr;20(2):137-52.

26. Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. Mol Cell Biol2003 Nov;23(22):7973-81.

27. Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, et al. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. Proc Natl Acad Sci U S A2004 May 25;101(21):8227-32.

28. Sato T, Kurokawa M, Nakashima Y, Ida T, Takahashi T, Fukue Y, et al. Ghrelin deficiency does not influence feeding performance. Regul Pept2008 Jan 10;145(1-3):7-11.

29. Ma X, Lin L, Qin G, Lu X, Fiorotto M, Dixit VD, et al. Ablations of ghrelin and ghrelin receptor exhibit differential metabolic phenotypes and thermogenic capacity during aging. PLoS One;6(1):e16391.

30. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. Proc Natl Acad Sci U S A2004 Mar 30;101(13):4679-84.

31. Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. J Clin Invest2002 Jun;109(11):1429-36.

32. Lanktree MB, Guo Y, Murtaza M, Glessner JT, Bailey SD, Onland-Moret NC, et al. Meta-analysis of Dense Genecentric Association Studies Reveals Common and Uncommon Variants Associated with Height. Am J Hum Genet2011 Jan 7;88(1):6-18.

33. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, et al. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. Nature2010 Oct 14;467(7317):832-8.

34. Liu G, Fortin JP, Beinborn M, Kopin AS. Four missense mutations in the ghrelin receptor result in distinct pharmacological abnormalities. J Pharmacol Exp Ther2007 Sep;322(3):1036-43.

35. Henry M. Kronenberb SM, Kenneth S. Polonsky, P. Reed Larsen. Williams Textbook of Endocrinology - 11th ed.2008.

36. Silva EG, Slhessarenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, et al. GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. Horm Res2003;59(5):229-33.

37. Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Kangawa K. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. J Clin Endocrinol Metab2005 Jan;90(1):6-9.

38. Hearn MG, Ren Y, McBride EW, Reveillaud I, Beinborn M, Kopin AS. A Drosophila dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. Proc Natl Acad Sci U S A2002 Oct 29;99(22):14554-9.

39. Beinborn M, Lee YM, McBride EW, Quinn SM, Kopin AS. A single amino acid of the cholecystokinin-B/gastrin receptor determines specificity for non-peptide antagonists. Nature1993 Mar 25;362(6418):348-50.

40. Blaker M, Ren Y, Gordon MC, Hsu JE, Beinborn M, Kopin AS. Mutations within the cholecystokinin-B/gastrin receptor ligand 'pocket' interconvert the functions of nonpeptide agonists and antagonists. Mol Pharmacol1998 Nov;54(5):857-63.

41. Al-Fulaij MA, Ren Y, Beinborn M, Kopin AS. Identification of amino acid determinants of dopamine 2 receptor synthetic agonist function. J Pharmacol Exp Ther2007 Apr;321(1):298-307.

42. Fortin JP, Schroeder JC, Zhu Y, Beinborn M, Kopin AS. Pharmacological characterization of human incretin receptor missense variants. J Pharmacol Exp Ther2010 Jan;332(1):274-80.

43. Sizonenko PC, Clayton PE, Cohen P, Hintz RL, Tanaka T, Laron Z. Diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence. Part 1: diagnosis of growth hormone deficiency. Growth Horm IGF Res2001 Jun;11(3):137-65.

44. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, et al. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. J Clin Endocrinol Metab2008 Nov;93(11):4210-7.

45. Weedon MN, Lango H, Lindgren CM, Wallace C, Evans DM, Mangino M, et al. Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. Nat Genet2008 May;40(5):575-83.

46. Sanna S, Jackson AU, Nagaraja R, Willer CJ, Chen WM, Bonnycastle LL, et al. Common variants in the GDF5-UQCC region are associated with variation in human height. Nat Genet2008 Feb;40(2):198-203.

47. Garcia EA, Heude B, Petry CJ, Gueorguiev M, Hassan-Smith ZK, Spanou A, et al. Ghrelin receptor gene polymorphisms and body size in children and adults. J Clin Endocrinol Metab2008 Oct;93(10):4158-61.

48. Gueorguiev M, Lecoeur C, Benzinou M, Mein CA, Meyre D, Vatin V, et al. A genetic study of the ghrelin and growth hormone secretagogue receptor (GHSR) genes and stature. Ann Hum Genet2009 Jan;73(1):1-9.

49. Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL, Auton A, Brooks LD, Gibbs RA, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature2010 Oct 28;467(7319):1061-73.

50. Brito VN, Freitas,K.C.M., Costa, E.M.F., Latronico,A.C., Mendonca, B.B. Puberdade precoce, normal e atrasada. In: Atheneu, editor. Endocrinologia: Mario J. A. Saad, Rui M. B. Maciel , Berenice B. Mendonca; 2007. p. 227-64.

51. Sedlmeyer IL, Hirschhorn JN, Palmert MR. Pedigree analysis of constitutional delay of growth and maturation: determination of familial aggregation and inheritance patterns. J Clin Endocrinol Metab2002 Dec;87(12):5581-6.

52. Sedlmeyer IL, Palmert MR. Delayed puberty: analysis of a large case series from an academic center. J Clin Endocrinol Metab2002 Apr;87(4):1613-20.

53. Wehkalampi K, Widen E, Laine T, Palotie A, Dunkel L. Patterns of inheritance of constitutional delay of growth and puberty in families of adolescent girls and boys referred to specialist pediatric care. J Clin Endocrinol Metab2008 Mar;93(3):723-8.

54. Wehkalampi K, Widen E, Laine T, Palotie A, Dunkel L. Association of the timing of puberty with a chromosome 2 locus. J Clin Endocrinol Metab2008 Dec;93(12):4833-9.

55. Banerjee I, Hanson D, Perveen R, Whatmore A, Black GC, Clayton PE. Constitutional delay of growth and puberty is not commonly associated with mutations in the acid labile subunit gene. Eur J Endocrinol2008 Apr;158(4):473-7.

56. Banerjee I, Trueman JA, Hall CM, Price DA, Patel L, Whatmore AJ, et al. Phenotypic variation in constitutional delay of growth and puberty: relationship to specific leptin and leptin receptor gene polymorphisms. Eur J Endocrinol2006 Jul;155(1):121-6.

57. Sedlmeyer IL, Pearce CL, Trueman JA, Butler JL, Bersaglieri T, Read AP, et al. Determination of sequence variation and haplotype structure for the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor genes: investigation of role in pubertal timing. J Clin Endocrinol Metab2005 Feb;90(2):1091-9.

58. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, et al. Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab2005 Mar;90(3):1849-55.

59. Teles MG, Trarbach EB, Noel SD, Guerra-Junior G, Jorge A, Beneduzzi D, et al. A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. Eur J Endocrinol2010 Jul;163(1):29-34.

60. Tommiska J, Wehkalampi K, Vaaralahti K, Laitinen EM, Raivio T, Dunkel L. LIN28B in Constitutional Delay of Growth and Puberty. J Clin Endocrinol Metab2010 Mar 29;95(6):3063-6.

61. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, et al. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. J Clin Endocrinol Metab2008 Sep;93(9):3551-9.

62. Dubern B, Clement K, Pelloux V, Froguel P, Girardet JP, Guy-Grand B, et al. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. J Pediatr2001 Aug;139(2):204-9.

63. Franca MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, et al. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. J Clin Endocrinol Metab2011 Nov;95(11):E384-91.

64. Hess O, Hujeirat Y, Wajnrajch MP, Allon-Shalev S, Zadik Z, Lavi I, et al. Variable phenotypes in familial isolated growth hormone deficiency caused by a G6664A mutation in the GH-1 gene. J Clin Endocrinol Metab2007 Nov;92(11):4387-93.

65. Kaplowitz PB. Link between body fat and the timing of puberty. Pediatrics2008 Feb;121 Suppl 3:S208-17.

66. Shalitin S, Phillip M. Role of obesity and leptin in the pubertal process and pubertal growth--a review. Int J Obes Relat Metab Disord2003 Aug;27(8):869-74.

67. Martini AC, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Navarro VM, Vigo E, Vazquez MJ, et al. Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. Endocrinology2006 May;147(5):2374-82.

68. Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, et al. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. Neuroendocrinology2005;82(5-6):245-55.

69. Fernandez-Fernandez R, Navarro VM, Barreiro ML, Vigo EM, Tovar S, Sirotkin AV, et al. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. Endocrinology2005 Jul;146(7):3018-25.

70. Soriano-Guillen L, Barrios V, Chowen JA, Sanchez I, Vila S, Quero J, et al. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. J Pediatr2004 Jan;144(1):30-5.

71. El-Eshmawy MM, Abdel Aal IA, El Hawary AK. Association of ghrelin and leptin with reproductive hormones in constitutional delay of growth and puberty. Reprod Biol Endocrinol2010 Dec 22;8(1):153.

72. Iniguez G, Roman R, Youlton R, Cassorla F, Mericq V. Ghrelin Plasma Levels in Patients with Idiopathic Short Stature. Horm Res Paediatr2011 Sep 23;75(2):94-100.

73. Pugliese-Pires PN, Tonelli CA, Dora JM, Silva PC, Czepielewski M, Simoni G, et al. A novel STAT5B mutation causing GH insensitivity syndrome associated with hyperprolactinemia and immune dysfunction in two male siblings. Eur J Endocrinol2010 Aug;163(2):349-55.

74. Fofanova-Gambetti OV, Hwa V, Wit JM, Domene HM, Argente J, Bang P, et al. Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (IGFALS) gene mutations on stature: results from the international acid-labile subunit consortium. J Clin Endocrinol Metab2010 Sep;95(9):4184-91.

75. Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. Biol Reprod2004 Jul;71(1):17-27.

Apêndice

AUTHOR COPY ONLY

European Journal of Endocrinology (2011) **165** 233–241 ISSN 0804-4643

CLINICAL STUDY

Novel inactivating mutations in the GH secretagogue receptor gene in patients with constitutional delay of growth and puberty

Patricia N Pugliese-Pires[1], Jean-Philippe Fortin[2], Thais Arthur[3], Ana Claudia Latronico[1], Berenice B Mendonca[1], Sandra Mara F Villares[3], Ivo J P Arnhold[1], Alan S Kopin[2] and Alexander A L Jorge[1,4]

[1]Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratorio de Hormonios e Genética Molecular (LIM/42), Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo 05403-000, Brazil, [2]Molecular Cardiology Research Institute, Molecular Pharmacology Research Center, Tufts Medical Center, Boston, Massachusetts 02111, USA, [3]Laboratorio de Nutricao Humana e Doencas Metabolicas (LIM/25) do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo 01246-903, Brazil and [4]Unidade de Endocrinologia-Genetica (LIM/25) do Hospital das Clinicas, Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo 01246-903, Brazil

(Correspondence should be addressed to A A L Jorge who is now at Laboratorio de Hormonios, Hospital das Clinicas, Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar 155 PAMB, 2 andar Bloco 6, 05403-900 São Paulo, Brazil; Email: alexj@usp.br)

Abstract

Background: A limited number of mutations in the GH secretagogue receptor gene (*GHSR*) have been described in patients with short stature.

Objective: To analyze *GHSR* in idiopathic short stature (ISS) children including a subgroup of constitutional delay of growth and puberty (CDGP) patients.

Subjects and methods: The *GHSR* coding region was directly sequenced in 96 independent patients with ISS, 31 of them with CDGP, in 150 adults, and in 197 children with normal stature. The pharmacological consequences of *GHSR* non-synonymous variations were established using *in vitro* cell-based assays.

Results: Five different heterozygous point variations in *GHSR* were identified (c.−6 G>C, c.251G>T (p.Ser84Ile), c.505G>A (p.Ala169Thr), c.545 T>C (p.Val182Ala), and c.1072G>A (p.Ala358Thr)), all in patients with CDGP. Neither these allelic variants nor any other mutations were found in 694 alleles from controls. Functional studies revealed that two of these variations (p.Ser84Ile and p.Val182Ala) result in a decrease in basal activity that was in part explained by a reduction in cell surface expression. The p.Ser84Ile mutation was also associated with a defect in ghrelin potency. These mutations were identified in two female patients with CDGP (at the age of 13 years, their height SDS were −2.4 and −2.3). Both patients had normal progression of puberty and reached normal adult height (height SDS of −0.7 and −1.4) without treatment.

Conclusion: This is the first report of *GHSR* mutations in patients with CDGP. Our data raise the intriguing possibility that abnormalities in ghrelin receptor function may influence the phenotype of individuals with CDGP.

European Journal of Endocrinology **165** 233–241

Introduction

The GH secretagogue receptor (GHSR, OMIM *601898) is a member of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily characterized by a seven transmembrane domain structure. There are two isoforms of GHSR: GHSR1a, which is active, and GHSR1b, which is truncated and has no known biological activity (1). Our manuscript is focused on GHSR1a that will subsequently be referred to as 'GHSR'. This receptor is mainly expressed in the hypothalamus and pituitary (1) and is characterized by a high level of constitutive activity (2). Ghrelin is the endogenous ligand of the GHSR and it is primarily secreted by gastric cells (3). Ghrelin has recently emerged as a pleiotropic neuroendocrine modulator involved in a wide spectrum of biological functions. Through interaction with GHSR1a, ghrelin stimulates GH secretion and has a potent orexigenic effect (4). Two major forms of ghrelin have been demonstrated in the circulation: unacylated-ghrelin, which is the main circulating form, and acyl-ghrelin, which is the active form generated by octanoyl incorporation at Ser3, a process mediated by ghrelin *O*-acyltransferase (5, 6). This acylation is essential for binding to the GHSR1a and for most recognized endocrine actions of ghrelin.

Recently, mutations in the *GHSR* have been implicated in the etiology of short stature in humans (7–9). Pantel *et al.* (7) described the missense mutation p.Ala204Glu in the second extracellular loop of the GHSR1a in two

© 2011 European Society of Endocrinology

DOI: 10.1530/EJE-11-0168
Online version via www.eje-online.org

AUTHOR COPY ONLY

unrelated families from Morocco. In the first family, the defect was associated with idiopathic short stature (ISS) and in the second family with isolated GH deficiency (GHD). Wang *et al.* (9) described this same mutation in an obese child. In addition, this group reported another *GHSR* mutation (p.Phe279Leu) in a boy with ISS as well as in his obese, short mother (9). These first reports suggest that *GHSR* inactivating mutations may cause short stature and impairment of GH secretion with variable severity and penetrance (7). In 2009, Pantel *et al.* (8) reported an isolated GHD patient with delayed puberty who was compound heterozygous for two *GHSR* mutations (p.Trp2X and p.Arg237Trp). Interestingly, the patient's father, who was heterozygous for the nonsense mutation, also had delayed puberty (8). More recently, a Japanese group described four novel heterozygous *GHSR* mutations (p. Gln36del, p.Pro108Leu, p.Cys173Arg, and p.Asp246Ala) in a group of patients with GHD or ISS (10). Unfortunately, no clinical and laboratory data from these patients were given. All described *GHSR* missense mutations markedly decreased the constitutive activity of the receptor, but some of these mutations preserved its ability to respond to ghrelin (7, 8, 11), suggesting the importance of GHSR basal activity for growth (12). In addition, two recent large genome–wide association studies demonstrated a strong association between GHSR loci (3q26.3) and height determination (13, 14).

The objective of this study was to investigate the presence of *GHSR* mutations in a group of ISS patients including a subgroup of patients with constitutional delay of growth and puberty (CDGP).

Patients and methods

Subjects

This study was approved by the local ethics committee, and the patients or guardians gave their written informed consent. Subjects in this study included 96 independent Brazilian patients with ISS (64 males), who fulfilled the following diagnostic criteria: proportional postnatal short stature, height more than 2.5 SDS below the normal mean height for age and sex (15), unremarkable medical history, and absence of abnormal findings on clinical examination or in laboratory tests that could account for short stature (16). Routine laboratory tests included blood cell count, erythrocyte sedimentation rate, electrolytes, albumin levels, kidney and liver function tests, karyotype (in all female patients), celiac disease screening, and free thyroxine and TSH levels. All children had adequate nutritional status, as assessed by interviews with parents or guardians, showed absence of signs of malnutrition, and satisfied normal laboratory parameters. All patients had normal GH secretion as assessed by GH peak after provocative testing with clonidine or insulin (17).

A total of 83 ISS patients (88%) had started puberty prior to the initiation of the genetic studies. According to the age of puberty onset, 31 patients (24 males) were subcategorized as presenting with CDGP. The diagnosis of CDGP was based on lack of breast development (Tanner stage 2) by the age of 13 years in girls and testicular volume <4.0 ml by the age of 14 years in boys, absence of other identifiable causes of delayed puberty, delayed bone age (BA), as well as spontaneous and complete achievement of pubertal development during follow-up (18). The complete pubertal development was established by regular menses in female and normal adult testosterone levels in male CDGP patients.

We also studied as a control group 150 adults (45% males) with normal stature (height SDS of 0.3 ± 1.1) and 197 children (64% males) without growth impairment (mean age of 10.7 ± 1.5, height SDS of 1.0 ± 1.0) with the same ethnic background.

Hormonal studies

GH was measured by immunofluorometric assay (AutoDELFIA, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) with MABs. The cutoff levels used to rule out GHD diagnosis after stimulation test were peak GH levels >3.3 μg/l (17). IGF1 was measured by chemiluminescence assays (IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA, USA) and expressed as SDS for age and sex according to reference values provided by the assay kit. Active ghrelin (acylated ghrelin) levels were measured using a commercial ELISA kit (Millipore, St Charles, MO, USA). Blood samples were collected from a forearm vein in the morning after overnight fasting and again 60 min after intake of a high carbohydrate meal. Whole blood samples were collected in polypropylene tubes and a dipeptidyl peptidase IV inhibitor (Millipore) at a final concentration of 100 μM was immediately added. The clotted blood was then centrifuged for 15 min at 4 ± 2 °C, plasma was separated and acidified by addition of HCl to a final concentration of 0.05 M, and stored at -80 °C until being assayed.

Molecular studies

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes, and the entire coding region as well as the exon–intron boundaries of *GHSR* (GenBank accession number NM_198407.2) was PCR amplified in all patients and control group. The *GHSR* proximal promoter region (1 kb) (19) was also amplified in patients if *GHSR* allelic variants in the coding region were identified. Primer sequences and amplification protocols will be sent on request. PCR products were bidirectionally sequenced with the dideoxy chain-termination method using a dye terminator kit and analyzed in an ABI Prism 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

AUTHOR COPY ONLY

In silico *prediction of mutation effects*

To identify the potential effects of sequence variants identified in *GHSR* on splice and protein function or structure, the wild-type (WT) and variant sequences were submitted to Splice Site Prediction by Neural Network (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (20), SpliceView (http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html) (21), and a new version of the PolyPhen method (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph) (22).

Functional studies

Materials Ghrelin was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Cell culture media, fetal bovine serum, and lipofectamine reagent were obtained from Invitrogen. Peroxidase-conjugated, anti-hemagglutinin (HA) MAB (3F10) and BM-blue, a peroxidase substrate, were purchased from Roche Applied Science. The plasmid encoding the serum response element (SRE) luciferase reporter gene has been described previously (23).

Construction of human GHSR plasmids The constructs encoding the untagged and HA-tagged WT human *GHSR* cDNA (isoform 1a) were reported previously (11). Missense mutations were introduced into both template cDNAs (i.e. untagged and HA-tagged receptors) using oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis as described previously (24, 25). For each mutant, the presence of the indicated amino acid change was confirmed by sequence analysis of the full protein coding region of each construct.

Cell culture Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were grown in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin G, and 100 μg/ml streptomycin. The cells were maintained at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO_2.

Luciferase reporter gene assay Receptor-mediated signaling was assessed using a luciferase assay as described previously (11, 23, 26). In brief, HEK293 cells were plated at a density of 1000–2000 cells/well onto clear-bottom, white 96-well plates and grown for 2 days to ~80% confluency. Cells were then transiently transfected using LipofectamineR reagent (Invitrogen) with cDNAs encoding i) a WT or mutant GHSR1a (or an empty expression vector), 2 ng/ well, ii) a serum-responsive element-luciferase reporter gene (SRE_{5X}-luc), 30 ng/well, and iii) β-galactosidase, 5 ng/well, to enable correction of interwell variability. After 24 h of transfection, cells were stimulated for 4 h with ghrelin diluted in serum-free medium. Ligand potencies were determined by stimulating receptor-expressing cells with increasing concentrations of ghrelin. The medium was gently aspirated following ligand treatment and luciferase activity was measured using SteadyliteR reagent (PerkinElmer, Boston, MA, USA). A β-galactosidase assay was then performed after adding the enzyme substrate, 2-nitrophenyl β-D-galactopyranoside. Following incubation at 37 °C for 30–60 min, substrate cleavage was quantified by measurement of optical density at 420 nm using a SpectraMaxR microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Corresponding values were used to normalize the luciferase data.

Assessment of receptor expression using ELISA The expression levels of the GHSR variants were determined using a procedure described by Fortin *et al.* (27). In brief, HEK293 cells grown in 96-well plates were transiently transfected with a plasmid encoding either an HA-tagged WT or mutant ghrelin receptor, 2 ng/well. After 48 h of transfection, the cells were washed once with PBS, pH 7.4, and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. After washing with PBS/100 mM glycine, the cells were incubated for 30 min in blocking solution (PBS/20% bovine serum). An HRP-conjugated MAB (Roche; clone 3F10) directed against the HA-epitope was then added to the cells (1:500 dilution in blocking solution). After 1 h, the cells were washed five times with PBS, and BM-blue (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine, Roche) solution (50 μl/well) was added. After incubation for 30 min at room temperature, conversion of this substrate by antibody-linked HRP was terminated by adding 2.0 M sulfuric acid (50 μl/well). Converted substrate (which correlates with the amount of receptor) was assessed by measuring light absorbance at 450 nm using a SpectraMaxmicroplate reader (Molecular Devices).

Data analysis GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used for non-linear curve fitting of receptor signaling and for calculation of half-maximal effective concentrations (EC_{50} values). Each EC_{50} value (expressed as a molar concentration) was transformed to a pEC_{50} value; $pEC_{50} = -\log(EC_{50})$. The mean pEC_{50} values ±S.E.M. are shown. The pEC_{50} and surface expression values for each of the mutants were compared with the corresponding control values at the WT receptor using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test (GraphPad INSTAT software).

Statistical analysis

Differences between groups were tested by *t*-test or Kruskal–Wallis and χ^2 or Fisher exact test, as appropriate. Statistical analyses were performed using the SIGMA stat statistical software package (Windows version 3.5; Systat Software, Inc., Erkrath, Germany).

AUTHOR COPY ONLY

Table 1 Clinical characteristics of patients with ISS with or without CDGP selected for the study.

	Idiopathic short stature (ISS)		
	CDGP	Non-CDGP	Total
Number of patients	31	65	96
Males (%)	77	61	67
Target height SDS	−1.2±0.6	−1.3±0.6	−1.3±0.6
Family history of SS (%)[a]	52	49	50
Data on first evaluation			
Chronological age (years)	13.5±2.6*	9.4±3.6	10.7±3.8
Bone age (years)	10.7±2.7*	7.2±3.7	8.3±3.7
Bone age delay (years)	3.1±1.1*	2.3±1.2	2.6±1.3
Height SDS	−3.1±0.9*	−2.7±0.8	−2.8±0.9
BMI SDS	−1.7±1.5*	−0.6±1.1	−1.0±1.4
IGF1 SDS	−1.6±1.5*	−0.8±0.9	−1.0±1.2
Age at start of puberty[b]			
Female	13.5±0.6*	11.1±1.2	11.7±1.5
Male	15.3±1.5*	12.7±1.0	13.8±1.8

SS, short stature; *$P<0.05$ in comparison with non-CDGP group.
[a]Height SDS <-2.0 in any one of the parents.
[b]Breast development (Tanner stage 2) in girls and testicular volume >4.0 ml in boys.

Results

Patients' characteristics

Clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. The cohort was characterized by a male predominance, especially in the CDGP group. At the first evaluation for short stature, patients from the CDGP group were older; had shorter height, lower body mass index (BMI) SDS, and lower IGF1 levels; and had more marked delayed BA when compared to patients with normal puberty.

Molecular results

In ISS patients, five different heterozygous variations in *GHSR* were identified, all of them in patients with CDGP (three males and two females). Of the five variations, one is located in the 5′-UTR, 6 bp prior to the initiation codon (c.−6 G>C). The other four variations (p.Ser84Ile (c.251G>T), p.Ala169Thr (c.505G>A), p.Val182Ala (c.545 T>C), and p.Ala358Thr (c.1072G>A)) are missense and all of them but p.Ala358Thr predict amino acid changes in highly conserved residues in GHSR. The protein location of the amino acid substitutions is indicated in Fig. 1. No additional variations were identified in the *GHSR* promoter region in these patients. *In silico* analysis did not predict changes in the physiological acceptor or donor *GHSR* splice sites by these allelic variants; in contrast, analysis by PolyPhen (22) suggested that p.Ala169Thr and p.Ala358Thr are benign, whereas p.S84I and p.Val182Ala are predicted to be probably and possibly damaging respectively. All the missense variations were selected for *in vitro* functional evaluation.

These allelic variants were not found in 694 alleles from controls (adults and normal height children). In addition, no other mutations were identified in the entire *GHSR* coding sequence in the normal height children (197 individuals sequenced). Notably, the frequency of mutation observed in the CDGP group was higher than that expected by chance in contrast with ISS children ($P=0.003$) and control children ($P<0.001$).

Functional studies

The Ser84Ile GHSR missense mutation alters ghrelin potency Ghrelin failed to increase signaling activity in HEK293 cells transfected with the empty plasmid pcDNA1 (Fig. 2), suggesting absence of an endogenous GHSR. In contrast, in cells expressing recombinant GHSR variants, stimulation with ghrelin triggered a concentration-dependent increase in receptor-mediated signaling. Agonist potency was comparable at the WT, Val182Ala, Ala169Thr, and Ala358Thr receptors (Fig. 2 and Table 2). In contrast, the Ser84Ile variant displayed a significant reduction in ghrelin potency/efficacy.

The Ser84Ile and Val182Ala mutations show decreased basal activity that correlates with reduced cell surface expression Consistent with previous studies using an SRE-luciferase reporter gene assay (2, 11), the WT-GHSR exhibited a high level of constitutive activity (i.e. signals in the absence of agonist). The Val182Ala variant showed ∼50% reduction in basal activity relative to WT. Trace, if any, residual basal activity was observed for the Ser84Ile mutant. In contrast, the Ala169Thr and Ala358Thr had a basal activity level comparable to the WT GHSR (Fig. 2 and Table 2). In parallel experiments, cell surface expression levels of variant receptors were determined by ELISA using HA-tagged versions of the WT and mutant GHSR isoforms (Fig. 3

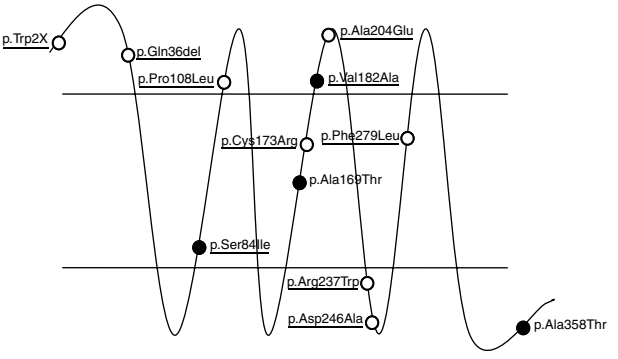

Figure 1 Schematic representation of GHSR and the location of missense variations within the receptor protein. The black circles indicate the variants described in this study. The white circles indicate the mutations already described in the literature. The underlined are mutations with proven functional impairment.

AUTHOR COPY ONLY

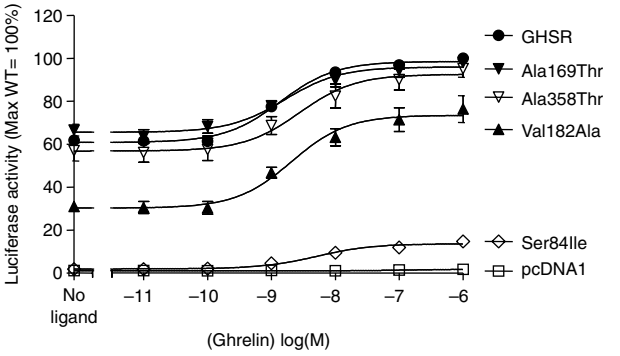

Figure 2 Selected GHSR variants show altered basal receptor activity and/or ghrelin potency. HEK293 cells were transiently transfected with a receptor-encoding cDNA, together with a SRE-Luc reporter gene construct. After 24 h of transfection, cells were stimulated for 4 h with media containing either no peptide (basal) or increasing concentrations of ghrelin. Following stimulation, luciferase activity was quantified as described in Patients and methods section. All activity values were normalized relative to the ghrelin-stimulated maximum at the wild-type GHSR. Data represent the mean ± S.E.M. from at least three independent experiments, each performed in triplicate.

and Table 2). Both tagged and untagged WT receptors showed comparable pharmacological properties (data not shown). These studies revealed that receptors with reduced basal signaling (Val182Ala and Ser84Ile) were also expressed at a significantly lower density relative to the WT GHSR (100%). Consistent with the major loss of signaling observed with the Ser84Ile variant, this receptor also displayed very poor cell surface expression. The Val182Ala mutant showed an intermediate level of basal activity and receptor expression. Pharmacological abnormalities (i.e. decreased basal activity and/or potency) of the Val182Ala and Ser84Ile were detected for both tagged and untagged receptors (data not shown). In contrast, each of the GHSR variants with normal basal activity (Ala169Thr and Ala358Thr) showed surface expression comparable to WT.

Phenotype/genotype relationships

Patient with p.Ser84Ile mutation The mutation p.Ser84Ile was identified in a female patient (patient 1) with CDGP. Clinical and laboratory data are shown in Table 3. At her first appointment at 12.8 years, she had short stature with delayed BA and low BMI (height SDS = −2.4, BA = 11 years, and BMI SDS = −2.6). Her hormonal evaluation showed reduced IGF1 and IGFBP3 levels but a normal GH response to the clonidine test. She started puberty just after this first visit at 13 years and had normal pubertal development with menarche at 16 years. She achieved a normal final height of 157.6 cm (−0.7 S.D.) without GH treatment (her target height was 158.1 (−0.7 S.D.)) but maintained a low BMI of 18.4 kg/m^2. At adult age, her IGF1 levels increased to normal, but her IGFBP3 levels remained low. Gonadotropins and estradiol levels were at prepubertal range at the first evaluation and reached adequate levels by the end of puberty (Table 3). She had normal levels of basal ghrelin and adequate suppression after the high-carbohydrate breakfast meal. No abnormalities in glucose homeostasis were observed. At the age of 21 years, she gave birth to a healthy female child. The patient's mother and her daughter had a normal *GHSR* genotype. In contrast, her two siblings who had normal stature and puberty were also heterozygous for the same mutation. Her father was not available for genetic studies.

Patient with p.Val182Ala mutation Clinical and laboratory data of the CDGP female patient with the p.Val182Ala mutation (patient 2) are shown in Table 3. At her first evaluation, she was 13 years old with a BA of 11 years and she had just started puberty. Her height was compromised (height SDS = −2.5) but her weight was normal (BMI SDS = 1.0). She had IGF1 and IGFBP3 levels within the reference range, a normal GH peak after clonidine stimulation and LH, FSH, and estradiol levels within the prepubertal range. She had normal pubertal development, her menarche occurred at 14 years, and she achieved, without GH treatment, a normal final height of 154 cm (−1.4 S.D.), but below her target height of 161.6 cm (−0.1 S.D.). The patient's father and sister are also heterozygous for the *GHSR* mutation. Both of these individuals reported short stature during the prepubertal period as well as delayed puberty and reached normal adult height, a growth pattern compatible with CDGP. In addition, the sister of patient 2 was treated with recombinant human GH for GHD (maximum GH peak at stimulation test of 1.8 μg/l at the age of eleven), reaching a normal adult height of 155 cm (−1.2 S.D.).

Discussion

We report five new *GHSR* variations in patients with CDGP, all of them absent in a large ethnically matched population. Each amino acid substitution except for p.Ala358Thr occurred at a highly conserved position within the GHSR. Recent studies using whole-genomic

Table 2 Pharmacological properties of wild-type versus mutant GHSR. All values represent the mean ± S.E.M. from at least five independent experiments.

Receptor	Ghrelin pEC$_{50}$	Basal activity[a]	Surface expression[b]
GHSR1a wt	8.95 ± 0.07	100	100
Val182Ala	8.71 ± 0.12	52 ± 3*	77 ± 6*
Ala169Thr	8.70 ± 0.16	103 ± 2	81 ± 6
Ala358Thr	8.58 ± 0.25	88 ± 4	85 ± 10
Ser84Ile	8.25 ± 0.19*	3 ± 1*	15 ± 3*

*Values differ significantly from the wild-type ($P<0.01$).
[a]Percentage of basal signaling activity of the wild-type GHSR.
[b]Percentage of wild-type GHSR surface expression.

AUTHOR COPY ONLY

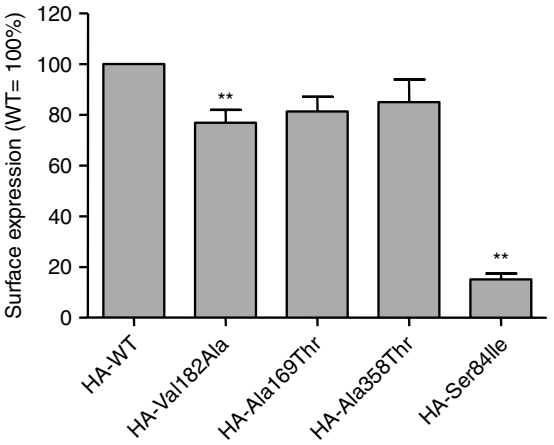

Figure 3 Selected GHSR variants show decreased cell surface expression. HEK293 cells were transfected with a plasmid encoding either the wild-type or a mutant HA-tagged GHSR. After 48 h, surface expression was measured by ELISA as described in Patients and methods section. Data were normalized relative to the maximal value observed at the wild-type GHSR and represent the mean±S.E.M. from at least three independent experiments, each performed in triplicate. $^{**}P<0.01$ expression level of GHSR mutant versus wild-type, ANOVA followed by Dunnett's post-test.

sequencing revealed that individuals tend to differ from a reference genome by putative loss of function mutations in 250–300 genes (28). However, focusing on *GHSR*, no loss-of-function variants were identified by low-coverage whole-genome sequencing of 179 individuals; an initial cohort from the 1000 genome project (http://browser.1000genomes.org/index.html) (28). Furthermore, the absence of other *GHSR* mutations in a large group of control children suggests that the association between *GHSR* variations and CDGP phenotype is unlikely to be fortuitous.

Functional studies confirmed the *in silico* prediction by PolyPhen and revealed that p.Ser84Ile and p.Val182Ala are functionally defective and will be designated as mutations. The mutations p.Ser84Ile and p.Val182Ala show a decrease in GHSR basal activity that is at least in part explained by a reduction in cell surface expression. The p.Ser84Ile variant was also associated with a decrease in ghrelin potency. As part of the molecular mechanism underlying the observed loss of function at these variants, it is possible that the mutations also directly or indirectly disrupt receptor coupling to intracellular signaling effectors, including the G-protein. These functional studies were performed in a heterologous cellular expression system. As previously documented for other GPCRs (29), it is possible that in the endogenous cellular microenvironment, the other identified variations might result in impaired GHSR function that is not evident when studied in HEK293 cells. However, it is most likely that the other variations (c.−6 G>C, p.Ala169Thr and p.Ala358Thr) are only rare benign polymorphisms.

The two mutations (p.Ser84Ile and p.Val182Ala) were found in the heterozygous state in two female patients with postnatal short stature during youth due to CDGP. GHD was excluded in both patients; however, IGF1 levels were at or below the lower normal limit of the reference values. Both patients had normal progression of puberty and spontaneously reached normal adult height. The p.Ser84Ile mutation was also found in members of the families that had neither the phenotype of short stature nor the delayed puberty, whereas the p.Val182Ala mutation segregated with CDGP phenotype in the family. These findings suggest a dominant mode of inheritance with incomplete penetrance, consistent with the pattern of inheritance observed in other families with *GHSR* mutations (7, 8) and in families with CDGP (30). Some possibilities to explain the incomplete penetrance and variable expression include interacting environmental factors and/or genetic variants at other loci.

CDGP is among the most commonly diagnosed growth disorders and it is considered a subcategory of ISS, as before the age of 13 years in girls or 14 years in

Table 3 Clinical and laboratorial characteristics of the two patients with functionally significant *GHSR* mutations.

	Patient 1	Patient 2
GHSR mutation	p.Ser84Ile	p.Val182Ala
Sex	Female	Female
Father's height SDS	−1.5	+1.0[a]
Mother's height SDS	+0.3	−1.2
Target height in cm (SDS)	158.1 (−0.7)	161.6 (−0.1)
Birth weight SDS	1.0	−0.9
Birth length SDS	−0.8	−1.3
First evaluation		
Age (years)	12.8	13
Bone age (years)	11	11
Height SDS	−2.4	−2.3
BMI SDS	−2.6	+1.1
Puberty		
Age at start of puberty (years)	13	13
Age at menarche (years)	16	14
Last observation		
Age (years)	22	17.7
Height SDS	−0.8	−1.4
BMI (kg/m^2)	18.4	22.3
Laboratory evaluation		
GH peak at stimulation test (ng/ml)	10.3	7.9
IGF1 SDS	−2.3[b]/−0.5[c]	−1.3[b]
IGFBP3 SDS	−1.6[b]/−2.2[c]	+1.1[b]
LH (UI/l)	<0.6[b]/5.4[c]	0.1[b]
FSH (UI/l)	1.7[b]/6.4[c]	2.6[b]
Estradiol (pg/ml)	<13[b]/51[c]	13[b]
Glucose (mg/dl)	90[c]	80[b]
Insulin (μU/ml)	7.7[c]	10[b]
Basal acylated ghrelin (pg/ml)[d]	66.5[c]	–
After meal		–
Acylated ghrelin (pg/ml)[d]	53.1[c]	–
Suppression	20%	–

[a]Presence of the mutation in heterozygous state.
[b]Sample collected at the first evaluation.
[c]Sample collected at the last evaluation.
[d]Normal range for basal acylated ghrelin levels: 67.7±33.3 pg/ml.

AUTHOR COPY ONLY

boys, this condition cannot be differentiated from ISS (31). This disorder occurs more frequently in males (18, 32), and indeed, in our cohort, the proportion of males was greater in the CDGP group than in the non-CDGP group (77 vs 61%, see Table 1). The fact that on the first evaluation our CDGP patients were older than the non-CDGP patients suggests that they might have reached a height SDS below −2.0 (short stature) later in life, therefore coming in later for medical evaluation. CDGP is characterized by a significant delay in both BA and adolescent growth spurt (31), which underlies the transient short stature stage, which is seen in affected individuals. Calculated measures of heritability suggest that 50–80% of the variance in pubertal onset is genetically controlled (30, 32). CDGP appears to be a multifactorial trait, yet at the same time the inheritance patterns suggests that single genes exert major effects (30). Although previous studies failed to identify mutations in candidate genes in patients with CDGP (33–38), the *GHSR* gene has not been previously investigated in patients with this condition (7–9). We regard our findings as hypothesis generating; it will be of great interest to screen other clinical cohorts with CDGP (as well as family members) to determine the frequency and inheritance pattern of *GHSR* mutations in various populations.

Ghrelin has orexigenic effects mediated by GHSR1a (4); therefore, it would be anticipated that mutations that impair ghrelin's receptor function would lead to a lean phenotype. In fact, animal studies showed that transgenic rats with attenuated GHSR protein expression in the arcuate nucleus have lower body weight, reduced adipose tissue, and consume less food than control rats (39). However, the patients with *GHSR* mutations described to date have a variable phenotype regarding weight (7–9). It was hypothesized that partial ghrelin system deficiency might be compensated by a host of developmental, genetic, and environmental factors that influence feeding behavior and body weight (8).

The exact mechanisms that trigger the start of puberty are yet unknown. Puberty onset is sensitive to the energy reserves of the organism, especially in females where there is an association between obesity and early puberty (reviewed in (40)). Therefore, we hypothesize that in the presence of *GHSR* mutations, there is a decrease in ghrelin-mediated appetite, resulting in relatively low BMI, which contributes to the delayed onset of puberty. Furthermore, delayed puberty is observed in clinical conditions associated with low IGF1 (41, 42), suggesting that IGF1 also exerts stimulatory, synergistic, or permissive effects on the onset of puberty (43). Thus, low IGF1 levels due to a decrease in GH secretion caused by *GHSR1a* haploinsufficiency may also negatively modulate the timing of puberty onset.

In conclusion, this is the first report of *GHSR* mutations in patients with CDGP, a condition with a significant hereditary component, so far without a recognized genetic cause. Our study raises the intriguing possibility that there is an association between the observed *GHSR* mutations and the CDGP phenotype. Analyses of larger cohorts (including family members) are needed to explore the nature of this putative link. Such future efforts will better define the role of *GHSR*-mediated signaling on pubertal control.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was supported by grants from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo – FAPESP (09/00313-3), Conselho-Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico – CNPq (143524/2008-9 to P N Pugliese-Pires, 300982/2009-7 to I J Arnhold and 301477/2009-4 to A A L Jorge), Fonds de la Recherche en Santé du Québec, the Canadian Institutes of Health Research (Fellowship Awards to J-P Fortin), and the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (R01DK072497 to A S Kopin).

References

1 Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG & Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996 **273** 974–977. (doi:10.1126/science.273.5277.974)

2 Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M & Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor – identification of a potent inverse agonist. *Molecular Endocrinology* 2003 **17** 2201–2210. (doi:10.1210/me.2003-0069)

3 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H & Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 **402** 656–660. (doi:10.1038/45230)

4 Sun Y, Wang P, Zheng H & Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *PNAS* 2004 **101** 4679–4684. (doi:10.1073/pnas.0305930101)

5 Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV & Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008 **132** 387–396. (doi:10.1016/j.cell.2008.01.017)

6 Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE & Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *PNAS* 2008 **105** 6320–6325. (doi:10.1073/pnas.0800708105)

7 Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton MP, Grouselle D, de Kerdanet M, Kadiri A, Epelbaum J, Le Bouc Y & Amselem S. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *Journal of Clinical Investigation* 2006 **116** 760–768. (doi:10.1172/JCI25303)

8 Pantel J, Legendre M, Nivot S, Morisset S, Vie-Luton MP, le Bouc Y, Epelbaum J & Amselem S. Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009 **94** 4334–4341. (doi:10.1210/jc.2009-1327)

9 Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schauble N, Friedel S, Lichtner P, Fontenla-Horro F, Wudy S, Hagemann S, Gortner L, Huse K, Remschmidt H, Bettecken T, Meitinger T, Schafer H, Hebebrand J &

AUTHOR COPY ONLY

Hinney A. Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 157–162. (doi:10.1210/jc.2003-031395)

10 Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T & Fujieda K. Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011 **96** 373–378. (doi:10.1210/jc.2010-1570)

11 Liu G, Fortin JP, Beinborn M & Kopin AS. Four missense mutations in the ghrelin receptor result in distinct pharmacological abnormalities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007 **322** 1036–1043. (doi:10.1124/jpet.107.123141)

12 Holst B & Schwartz TW. Ghrelin receptor mutations – too little height and too much hunger. *Journal of Clinical Investigation* 2006 **116** 637–641. (doi:10.1172/JCI27999)

13 Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, Willer CJ, Jackson AU, Vedantam S, Raychaudhuri S, Ferreira T, Wood AR, Weyant RJ, Segre AV, Speliotes EK, Wheeler E, Soranzo N, Park JH, Yang J, Gudbjartsson D, Heard-Costa NL, Randall JC, Qi L, Vernon Smith A, Magi R, Pastinen T, Liang L, Heid IM, Luan J, Thorleifsson G, Winkler TW, Goddard ME, Sin Lo K, Palmer C, Workalemahu T, Aulchenko YS, Johansson A, Zillikens MC, Feitosa MF, Esko T, Johnson T, Ketkar S, Kraft P, Mangino M, Prokopenko I, Absher D, Albrecht E, Ernst F, Glazer NL, Hayward C, Hottenga JJ, Jacobs KB, Knowles JW, Kutalik Z, Monda KL, Polasek O, Preuss M, Rayner NW, Robertson NR, Steinthorsdottir V, Tyrer JP, Voight BF, Wiklund F, Xu J, Hua Zhao J, Nyholt DR, Pellikka N, Perola M, Perry JR, Surakka I, Tammesoo ML, Altmaier EL, Amin N, Aspelund T, Bhangale T, Boucher G, Chasman DI, Chen C, Coin L, Cooper MN, Dixon AL, Gibson Q, Grundberg E, Hao K, Juhani Junttila M, Kaplan LM, Kettunen J, Konig IR, Kwan T, Lawrence RW, Levinson DF, Lorentzon M, McKnight B, Morris AP, Muller M, Suh Ngwa J, Purcell S, Rafelt S, Salem RM, Salvi E, Sanna S, Shi J, Sovio U, Thompson JR, Turchin MC, Vandenput L, Verlaan DJ, Vitart V, White CC, Ziegler A, Almgren P, Balmforth AJ, Campbell H, Citterio L, De Grandi A, Dominiczak A, Duan J, Elliott P, Elosua R, Eriksson JG, Freimer NB, Geus EJ, Glorioso N, Haiqing S, Hartikainen AL, Havulinna AS, Hicks AA, Hui J, Igl W, Illig T, Jula A, Kajantie E, Kilpelainen TO, Koiranen M, Kolcic I, Koskinen S, Kovacs P, Laitinen J, Liu J, Lokki ML, Marusic A, Maschio A, Meitinger T, Mulas A, Pare G, Parker AN, Peden JF, Petersmann A, Pichler I, Pietilainen KH, Pouta A, Ridderstrale M, Rotter JI, Sambrook JG, Sanders AR, Oliver Schmidt C, Sinisalo J, Smit JH, Stringham HM, Bragi Walters G, Widen E, Wild SH, Willemsen G, Zagato L, Zgaga L, Zitting P, Alavere H, Farrall M, McArdle WL, Nelis M, Peters MJ, Ripatti S, van Meurs JB, Aben KK, Ardlie KG, Beckmann JS, Beilby JP, Bergman RN, Bergmann S, Collins FS, Cusi D, den Heijer M, Eiriksdottir G, Gejman PV, Hall AS, Hamsten A, Huikuri HV, Iribarren C, Kahonen M, Kaprio J, Kathiresan S, Kiemeney L, Kocher T, Launer LJ, Lehtimaki T, Melander O, Mosley TH Jr, Musk AW, Nieminen MS, O'Donnell CJ, Ohlsson C, Oostra B, Palmer LJ, Raitakari O, Ridker PM, Rioux JD, Rissanen A, Rivolta C, Schunkert H, Shuldiner AR, Siscovick DS, Stumvoll M, Tonjes A, Tuomilehto J, van Ommen GJ, Viikari J, Heath AC, Martin NG, Montgomery GW, Province MA, Kayser M, Arnold AM, Atwood LD, Boerwinkle E, Chanock SJ, Deloukas P, Gieger C, Gronberg H, Hall P, Hattersley AT, Hengstenberg C, Hoffman W, Mark Lathrop G, Salomaa V, Schreiber S, Uda M, Waterworth D, Wright AF, Assimes TL, Barroso I, Hofman A, Mohlke KL, Boomsma DI, Caulfield MJ, Adrienne Cupples L, Erdmann J, Fox CS, Gudnason V, Gyllensten U, Harris TB, Hayes RB, Jarvelin MR, Mooser V, Munroe PB, Ouwehand WH, Penninx BW, Pramstaller PP, Quertermous T, Rudan I, Samani NJ, Spector TD, Volzke H, Watkins H, Wilson JF, Groop LC, Haritunians T, Hu FB, Kaplan RC, Metspalu A, North KE, Schlessinger D, Wareham NJ, Hunter DJ, O'Connell JR, Strachan DP, Wichmann HE, Borecki IB, van Duijn CM, Schadt EE, Thorsteinsdottir U, Peltonen L, Uitterlinden AG, Visscher PM, Chatterjee N, Loos RJ, Boehnke M, McCarthy MI, Ingelsson E, Lindgren CM, Abecasis GR, Stefansson K, Frayling TM & Hirschhorn JN. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* 2010 **467** 832–838. (doi:10.1038/nature09410)

14 Lanktree MB, Guo Y, Murtaza M, Glessner JT, Bailey SD, Onland-Moret NC, Lettre G, Ongen H, Rajagopalan R, Johnson T, Shen H, Nelson CP, Klopp N, Baumert J, Padmanabhan S, Pankratz N, Pankow JS, Shah S, Taylor K, Barnard J, Peters BJ, Maloney CM, Lobmeyer MT, Stanton A, Zafarmand MH, Romaine SP, Mehta A, van Iperen EP, Gong Y, Price TS, Smith EN, Kim CE, Li YR, Asselbergs FW, Atwood LD, Bailey KM, Bhatt D, Bauer F, Behr ER, Bhangale T, Boer JM, Boehm BO, Bradfield JP, Brown M, Braund PS, Burton PR, Carty C, Chandrupatla HR, Chen W, Connell J, Dalgeorgou C, Boer A, Drenos F, Elbers CC, Fang JC, Fox CS, Frackelton EC, Fuchs B, Furlong CE, Gibson Q, Gieger C, Goel A, Grobbee DE, Hastie C, Howard PJ, Huang GH, Johnson WC, Li Q, Kleber ME, Klein BE, Klein R, Kooperberg C, Ky B, Lacroix A, Lanken P, Lathrop M, Li M, Marshall V, Melander O, Mentch FD, Meyer NJ, Monda KL, Montpetit A, Murugesan G, Nakayama K, Nondahl D, Onipinla A, Rafelt S, Newhouse SJ, Otieno FG, Patel SR, Putt ME, Rodriguez S, Safa RN, Sawyer DB, Schreiner PJ, Simpson C, Sivapalaratnam S, Srinivasan SR, Suver C, Swergold G, Sweitzer NK, Thomas KA, Thorand B, Timpson NJ, Tischfield S, Tobin M, Tomaszweski M, Verschuren WM, Wallace C, Winkelmann B, Zhang H, Zheng D, Zhang L, Zmuda JM, Clarke R, Balmforth AJ, Danesh J, Day IN, Schork NJ, de Bakker PI, Delles C, Duggan D, Hingorani AD, Hirschhorn JN, Hofker MH, Humphries SE, Kivimaki M, Lawlor DA, Kottke-Marchant K, Mega JL, Mitchell BD, Morrow DA, Palmen J, Redline S, Shields DC, Shuldiner AR, Sleiman PM, Smith GD, Farrall M, Jamshidi Y, Christiani DC, Casas JP, Hall AS, Doevendans PA, Christie JD, Berenson GS, Murray SS, Illig T, Dorn GW II, Cappola TP, Boerwinkle E, Sever P, Rader DJ, Reilly MP, Caulfield M, Talmud PJ, Topol E, Engert JC, Wang K, Dominiczak A, Hamsten A, Curtis SP, Silverstein RL, Lange LA, Sabatine MS, Trip M, Saleheen D, Peden JF, Cruickshanks KJ, Marz W, O'Connell JR, Klungel OH, Wijmenga C, Maitland-van der Zee AH, Schadt EE, Johnson JA, Jarvik GP, Papanicolaou GJ, Grant SF, Munroe PB, North KE, Samani NJ, Koenig W, Gaunt TR, Anand SS, van der Schouw YT, Soranzo N, Fitzgerald GA, Reiner A, Hegele RA, Hakonarson H & Keating BJ. Meta-analysis of dense genecentric association studies reveals common and uncommon variants associated with height. *American Journal of Human Genetics* 2011 **88** 6–18. (doi:10.1016/j.ajhg.2010.11.007)

15 Tanner JM, Whitehouse RH & Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Archives of Disease in Childhood* 1966 **41** 454–471. (doi:10.1136/adc.41.219.454)

16 Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausek SD, Savage MO & Wit JM. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 4210–4217. (doi:10.1210/jc.2008-0509)

17 Silva EG, Slhessarenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, Marui S & Mendonca BB. GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. *Hormone Research* 2003 **59** 229–233. (doi:10.1159/000070222)

18 Sedlmeyer IL & Palmert MR. Delayed puberty: analysis of a large case series from an academic center. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 1613–1620. (doi:10.1210/jc.87.4.1613)

19 Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoeur C, Gueorguiev M, Khalaf S, Davies D, Grossman AB, Kojima M, Petersenn S, Froguel P & Korbonits M. The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *European Journal of Endocrinology* 2009 **161** 307–315. (doi:10.1530/EJE-09-0122)

AUTHOR COPY ONLY

20 Reese MG, Eeckman FH, Kulp D & Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *Journal of Computational Biology* 1997 **4** 311–323. (doi:10.1089/cmb.1997.4.311)

21 Shapiro MB & Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Research* 1987 **15** 7155–7174. (doi:10.1093/nar/15.17.7155)

22 Ramensky V, Bork P & Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research* 2002 **30** 3894–3900. (doi:10.1093/nar/gkf493)

23 Hearn MG, Ren Y, McBride EW, Reveillaud I, Beinborn M & Kopin AS. A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *PNAS* 2002 **99** 14554–14559. (doi:10.1073/pnas.202498299)

24 Beinborn M, Lee YM, McBride EW, Quinn SM & Kopin AS. A single amino acid of the cholecystokinin-B/gastrin receptor determines specificity for non-peptide antagonists. *Nature* 1993 **362** 348–350. (doi:10.1038/362348a0)

25 Blaker M, Ren Y, Gordon MC, Hsu JE, Beinborn M & Kopin AS. Mutations within the cholecystokinin-B/gastrin receptor ligand 'pocket' interconvert the functions of nonpeptide agonists and antagonists. *Molecular Pharmacology* 1998 **54** 857–863.

26 Al-Fulaij MA, Ren Y, Beinborn M & Kopin AS. Identification of amino acid determinants of dopamine 2 receptor synthetic agonist function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007 **321** 298–307. (doi:10.1124/jpet.106.116384)

27 Fortin JP, Schroeder JC, Zhu Y, Beinborn M & Kopin AS. Pharmacological characterization of human incretin receptor missense variants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2010 **332** 274–280. (doi:10.1124/jpet.109.160531)

28 Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL, Auton A, Brooks LD, Gibbs RA, Hurles ME & McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010 **467** 1061–1073. (doi:10.1038/nature09534)

29 Oertel BG, Kettner M, Scholich K, Renne C, Roskam B, Geisslinger G, Schmidt PH & Lotsch J. A common human micro-opioid receptor genetic variant diminishes the receptor signaling efficacy in brain regions processing the sensory information of pain. *Journal of Biological Chemistry* 2009 **284** 6530–6535. (doi:10.1074/jbc.M807030200)

30 Sedlmeyer IL, Hirschhorn JN & Palmert MR. Pedigree analysis of constitutional delay of growth and maturation: determination of familial aggregation and inheritance patterns. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 5581–5586. (doi:10.1210/jc.2002-020862)

31 Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH & Cohen P. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Hormone and IGF Research* 2008 **18** 89–110. (doi:10.1016/j.ghir.2007.11.004)

32 Wehkalampi K, Widen E, Laine T, Palotie A & Dunkel L. Patterns of inheritance of constitutional delay of growth and puberty in families of adolescent girls and boys referred to specialist pediatric care. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 723–728. (doi:10.1210/jc.2007-1786)

33 Banerjee I, Trueman JA, Hall CM, Price DA, Patel L, Whatmore AJ, Hirschhorn JN, Read AP, Palmert MR & Clayton PE. Phenotypic variation in constitutional delay of growth and puberty: relationship to specific leptin and leptin receptor gene polymorphisms. *European Journal of Endocrinology* 2006 **155** 121–126. (doi:10.1530/eje.1.02184)

34 Banerjee I, Hanson D, Perveen R, Whatmore A, Black GC & Clayton PE. Constitutional delay of growth and puberty is not commonly associated with mutations in the acid labile subunit gene. *European Journal of Endocrinology* 2008 **158** 473–477. (doi:10.1530/EJE-07-0769)

35 Tommiska J, Wehkalampi K, Vaaralahti K, Laitinen EM, Raivio T & Dunkel L. LIN28B in constitutional delay of growth and puberty. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 3063–3066. (doi:10.1210/jc.2009-2344)

36 Teles MG, Trarbach EB, Noel SD, Guerra-Junior G, Jorge A, Beneduzzi D, Bianco SD, Mukherjee A, Baptista MT, Costa EM, De Castro M, Mendonca BB, Kaiser UB & Latronico AC. A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *European Journal of Endocrinology* 2010 **163** 29–34. (doi:10.1530/EJE-10-0012)

37 Sedlmeyer IL, Pearce CL, Trueman JA, Butler JL, Bersaglieri T, Read AP, Clayton PE, Kolonel LN, Henderson BE, Hirschhorn JN & Palmert MR. Determination of sequence variation and haplotype structure for the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor genes: investigation of role in pubertal timing. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005 **90** 1091–1099. (doi:10.1210/jc.2004-0649)

38 Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'Rahilly S & Aparicio SA. Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005 **90** 1849–1855. (doi:10.1210/jc.2004-1418)

39 Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S & Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *Journal of Clinical Investigation* 2002 **109** 1429–1436. (doi:10.1172/JCI200213300)

40 Kaplowitz PB. Link between body fat and the timing of puberty. *Pediatrics* 2008 **121** (Supplement 3) S208–S217. (doi:10.1542/peds.2007-1813F)

41 Pugliese-Pires PN, Tonelli CA, Dora JM, Silva PC, Czepielewski M, Simoni G, Arnhold IJ & Jorge AA. A novel STAT5B mutation causing GH insensitivity syndrome associated with hyperprolactinemia and immune dysfunction in two male siblings. *European Journal of Endocrinology* 2010 **163** 349–355. (doi:10.1530/EJE-10-0272)

42 Fofanova-Gambetti OV, Hwa V, Wit JM, Domene HM, Argente J, Bang P, Hogler W, Kirsch S, Pihoker C, Chiu HK, Cohen L, Jacobsen C, Jasper HG, Haeusler G, Campos-Barros A, Gallego-Gomez E, Gracia-Bouthelier R, van Duyvenvoorde HA, Pozo J & Rosenfeld RG. Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (IGFALS) gene mutations on stature: results from the international acid-labile subunit consortium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 4184–4191. (doi:10.1210/jc.2010-0489)

43 Chandrashekar V, Zaczek D & Bartke A. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. *Biology of Reproduction* 2004 **71** 17–27. (doi:10.1095/biolreprod.103.027060)

Received 1 May 2011
Accepted 6 June 2011