Ândria Carla Vito Lido

Estudo do gene do hormônio de crescimento hipofisário (*GH1*) em indivíduos com baixa estatura idiopática

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lido, Ândria Carla Vito
Estudo do gene do hormônio de crescimento hipofisário (GH1) em indivíduos com baixa estatura idiopática / Ândria Carla Vito Lido. -- São Paulo, 2014.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Crescimento e desenvolvimento/genética 2.Estatura/genética 3.Transtornos do crescimento/diagnóstico 4.Transtornos do crescimento/classificação 5.Transtornos do crescimento/genética 6.Transtornos do crescimento/etiologia 7.Transtornos do crescimento/sangue 8.Hormônio do crescimento/deficiência 9.Hormônio do crescimento/genética 10.Hormônio do crescimento humano/deficiência 11.Hormônio do crescimento humano/genética 12.Mutação 13.Genes dominantes 14.Fator de crescimento *insulin-like* I 15.Criança 16.Pré-escolar 17.Linhagem

USP/FM/DBD-125/14

Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM/25 da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dedicatória

A Deus que me deu gratuitamente o dom da vida e a liberdade para vivê-la e assim, ser livre para escolher o caminho.

Aos meus pais que me ensinaram e ainda ensinam o mais estimável do que alcançaram, cuja dedicação e amor não têm limites. Seu apreço e doação ainda me surpreendem a cada dia.

Ao meu orientador, o qual, pela paciência, compreensão e dedicação, torna possível esse estimável aprendizado e acrescenta valiosa experiência em minha carreira acadêmica e profissional.

Aos meus colegas e amigos que tornam a caminhada mais leve e dignificam a vida em seu real valor, os quais, com carinho, acrescentam em meu caráter benignidade e deixam apreciáveis e inesquecíveis lembranças.

Aos pacientes pela contribuição valiosa a esse trabalho.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a inestimável e gratificante oportunidade da realização desta dissertação junto ao grupo da Disciplina de Endocrinologia e Genética na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Não poderia deixar de agradecer à Prof. Dra. Berenice B. Mendonça pelo expressivo trabalho junto ao departamento de Endocrinologia desta Universidade, cujo exemplo de dignidade, respeito e ética enobrecem e engrandecem indescritivelmente este serviço, sendo importante modelo de formação e caráter.

Agradeço ao Prof. Dr. Ivo Arnhold pelo seu considerável exemplo de disciplina, ética, humildade e generosidade, os quais não deixam de evidenciar sua grandiosidade e brilhantismo.

Agradeço em especial ao meu orientador Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge por seu inestimável conhecimento e incansável dedicação. Em muitos momentos desse caminhar, Alex foi também grande amigo, conseguindo em muito transmitir ao grupo sua incansável força e inabalável perseverança, sendo notável exemplo de resiliência, talento e mestria.

Agradeço a todos os professores e assistentes com imenso apreço, em especial Dra. Luciani Carvalho por se fazer sempre solícita, Prof. Dra Ana Cláudia Latrônico, Prof. Dra. Tânia Bachega e demais docentes, pela apreciável capacidade de motivação, extraordinário ensinamento e contínuo compartilhar de experiências.

Agradeço com estimável alegria por ter Renata Scalco, Gabriela Vasques, Ana Canton, Aline Otto, Marcela França, Alexsandra Malaquias, Fernanda Corrêa, Adriana Braz e Andréa de Castro como colegas de pós-graduação. Sem dúvida, mais do que colegas, foram grandes amigas e confidentes, transformaram esse período de convivência em grandes momentos, havendo troca e partilha, acréscimo e multiplicação. Souberam

acolher e compreender, sendo força nos períodos de dificuldade e esperança nos momentos de descrença. Sem esses valores não chegaria até o fim.

Agradeço a todos os funcionários, colegas e acadêmicos do LIM25 que contribuíram, de alguma forma, com a realização deste feito, sobretudo pela dedicação, incentivo e pelo tempo compartilhado, tornando ainda mais agradável e valioso o aprendizado. Agradeço, com apreço, à Elisangela Quedas por todo o tempo despendido, paciente dedicação e indescritível cordialidade dedicados a mim enquanto estive trabalhando na bancada do LIM25. Agradeço a Eliete Helena, Nilda Oliveira e Maria das Graças Cavalcante pela prestabilidade e cordialidade.

Agradeço com grande estima a todos do LIM 42, não podendo deixar de mencionar Mariana Funari, Maria Aparecida Medeiros, Mirian Nishi, Cristina Rossi e Rosana pela notável dedicação e profissionalismo.

Aos pacientes, que são a maior razão dos nossos esforços e verdadeira fonte de ensinamento, meus sinceros agradecimentos.

Mais uma vez, agradeço a Deus, cuja benevolência sempre nos dignifica e fortalece.

A minha família, a quem devo tudo o que sou, agradeço o amor verdadeiro e vivificante que nos une e fortalece.

É neste momento de congratulação em que posso referenciar que muito além das alegrias colhidas pelo êxito e pela superação pessoal, tenho a convicção de que as maiores conquistas são os amigos cativados e as experiências compartilhadas, os quais nos vivificam e nos transformam, e que se fazem eternos em nossas lembranças e ideais, sendo portanto, levados conosco e assim, se fazem perpetuar.

NORMALIZAÇÃO

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Commitee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Fredd, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aração, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviação dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

Lista de abreviaturas xiv
Lista de siglas xvii
Lista de figuras xviii
Lista de quadros xix
Lista de tabelas xx
Resumo xxi
Summary xxiii
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Hormônio de crescimento 5
1.1.1 Secreção do hormônio de crescimento 5
1.1.2 Gene do hormônio de crescimento 7
1.1.3 Isoformas do hormônio de crescimento 10
1.1.4 Ações do hormônio de crescimento 13
1.1.5 Deficiência do hormônio de crescimento 15
2 MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NO GENE *GH1* 19
2.1 Histórico 20
2.2 DIGH tipo IA 21
2.3 DIGH tipo IB 23
2.4 DIGH tipo II 24
2.5 Variantes alélicas na região promotora 27
2.6 Mutações causando GH biologicamente inativo 29
2.7 Resultados prévios do estudo do *GH1* em nosso grupo 30
3 OBJETIVOS 31
3.1 Objetivo principal 32
3.2 Objetivos específicos 32
4 MÉTODOS 33
4.1 Considerações éticas 34
4.2 Pacientes 34
4.2.1 Critérios de inclusão 34
4.2.2 Critérios de exclusão 35
4.3 Casuística 36
4.4 Estudo molecular 38
4.4.1 Extração de DNA genômico de linfócitos periféricos 38
4.4.2 Reação em cadeia da polimerase 39
4.4.3 Sequenciamento automático 40
4.4.4 Análise *in silico* das variantes sinônimas 41

5 RESULTADOS 42
5.1 Características da casuística.....43
5.2 Resultados moleculares do grupo estudado 46
5.2.1 Análise de DNA 46
5.2.2 Análise *in silico* das variantes alélicas encontradas 49
5.2.2.1 Análise de predição de alteração de *splice* 49
5.2.2.2 Análise de predição de efeito deletério sobre a proteína das variantes *missense*.....51
6 DISCUSSÃO 52
7 CONCLUSÕES 57
8 REFERÊNCIAS.....59

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS

5´IVS-3	Região 5’ do íntron 3
A	Adenina
aa	Aminoácido
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AGL	Ácidos graxos livres
ALS	Subunidade ácido-lábil
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BEI	Baixa estatura idiopática
bp	Par de bases
BPS	*Branching point site*
C	Citosina
CREB	Proteína de interação com elementos cAMP responsivos
CSH1	Gene da somatotrofina coriônica 1
CSH2	Gene da somatotrofina coriônica 2
CSHL1	Pseudogene da somatotrofina coriônica
CSS	*Cryptic splice site*
Cys	Citosina
Del	Deleção
DGH	Deficiência de hormônio de crescimento
DIGH	Deficiência isolada de hormônio de crescimento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase I	*Deoxyribonuclease I*
dNTP	Trifosfato de nucleotídeo
DP	Desvio padrão
Dr (a)	Doutor (a)
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
ESE1	Região de elementos de regulação de *splicing* no éxon 1
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

G	Guanina
GH	Hormônio de crescimento
GH1	Gene do hormônio de crescimento
GH2	Hormônio de crescimento 2
GHBP	Proteína de ligação do GH
GHR	Receptor do hormônio de crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHSH	Receptor secretagogo do hormônio de crescimento
GH-V	Variante do hormônio de crescimento
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
H	Altura
HC	Hospital das Clínicas
IC	Idade cronológica
ICMA	Imunoquimioluminescência
IFMA	Imunofluorométrico
IGF-1	Fator de crescimento insulina-símile tipo 1
IGFBP-3	Proteína de ligação para fator de crescimento insulina-símile tipo 3
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IP-3K	Mitógeno fosfatidilinositol 3 quinase
IRS-1	Substrato do receptor insulínico 1
IRS-2	Substrato do receptor insulínico 2
ISE	Região intrônica potenciadora de *splice*
IVS	Região intrônica
LCR	Região controladora distal *(locus control region)*
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAPK	Quinase protéica ativada por mitógenos (*Mitogen activated protein kinase*)
Met	Metionina
NaCl	Cloreto de sódio
NAS	*Nonsense mediated altered splicing*

NP1	Fator nuclear 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Phe	Fenilalanina
PIT-1	Fator de transcrição pituitário específico 1
POU1F1	Fator de transcrição pituitário específico 1
PRO	Prolina
Prof.	Professor (a)
rhGH	Hormônio de crescimento recombinante humano
RIE	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo na região promotora proximal
Sp1	*Specificity Protein 1*
SST	Somatostatina
STAT	*Signal Transducer and Activators of Transcription*
STAT5b	*Signal Transducer and Activators of Transcription 5b*
T	Tiamina
TE	Tampão tris e ácido etileno diaminotetracético
TH	Altura alvo *(Target height)*
Tyr	Tirosina
Val	Valina
VC	Velocidade de crescimento
Vel.	Velocidade
VDRL	Elemento responsivo à vitamina D
Z	Escore de desvio padrão em relação à idade e sexo

LISTA DE SÍMBOLOS

˚C	graus Celsius
cm	centímetros
kb	quilobase
kDa	quilodalton
Kg	quilograma
M	molar
mg/m²	miligramas por metro quadrado
mg/ml	miligramas por litro
mMP	millimolar
ng	nanograma
pH	potencial hidrogeniônico
pMol/μL	picomol por microlitro
rpm	rotações por minuto
U	unidade
U/μ	unidade por micra
μg	micrograma
μg/ml	micrograma por mililitro
>	maior que
≥	maior ou igual que
<	menor que
≤	menor ou igual que
=	igual a

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama do complexo ternário formado pelos receptores de GH (GHR). 6

Figura 2- Localização cromossômica e organização do *cluster* do GH.....7

Figura 3- Localização dos SNPs na região a 14,5 kb *upstream* ao LCR do *GH1*.....9

Figura 4- Representação estrutural das isoformas do GH 11

Figura 5- Representação estrutural dos elementos de regulação de *splicing* exônicos e intrônicos.....25

Figura 6- Região promotora do *GH1* e a localização de 16 SNPs.....28

Figura 7- Fluxograma da estratégia de estudo para os pacientes selecionados com BEI 37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Representação das isoformas de GH na hipófise 12

Quadro 2- Principais atividades biológicas do GH.....14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes selecionados para o estudo 44

Tabela 2 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes tratados com rhGH de acordo com o padrão de resposta ao GH.....45

Tabela 3 - Variantes alélicas encontradas após sequenciamento dos éxons 1 ao 5 e íntrons do *GH1* correspondentes a 98 pacientes analisados.....48

Tabela 4 - Análise de predição do uso dos sítios de *splice* do *GH1* das principais mutações descritas na literatura causando DIGH II baseado na ferramenta *NatGene2* 50

Tabela 5 - Análise de predição do impacto de mutações missense do *GH1* associadas com a geração de moléculas bioinativas descritas na literatura baseado pela ferramenta *PolyPhen2* 51

Resumo

Lido ACV. *Estudo do gene do hormônio de crescimento hipofisário (GH1) em indivíduos com baixa estatura idiopática* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O sistema hormônio de crescimento (GH) / fator de crescimento insulina- símile tipo 1 (IGF-1) é o principal determinante e regulador do crescimento linear pós-natal. O GH é codificado pelo gene *Growth Hormone 1 (GH1).* Mutações no *GH1* com efeito dominante negativo e herança autossômica dominante são as principais causas monogênicas de deficiência isolada de hormônio de crescimento (DIGH), enquanto deleções ou mutações de ponto no *GH1* causam formas raras autossômicas recessivas de DIGH. No grupo de pacientes com DIGH do ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram identificadas apenas deleções em homozigose no *GH1* mesmo após estudo criterioso deste gene. Esta diferença em relação aos dados descritos na literatura poderia ser justificada pelo critério diagnóstico para a DIGH adotado pelo nosso grupo, sendo utilizado pico de GH em teste de estímulo inferior a 3,3 µg/L, em contraste com os valores de corte descritos na literatura que variam de 7 a 10 µg/L. Devido a esse fator, pacientes com mutações no *GH1* com herança autossômica dominante poderiam estar sendo erroneamente diagnosticados como portadores de baixa estatura familiar ou idiopática (BEI) em nosso serviço. Adicionalmente, mutações que originam moléculas de GH biologicamente inativas também poderiam estar presentes nestes pacientes. Pelos fatores acima apresentados, expandimos o estudo do *GH1* para um grupo de crianças classificadas como BEI. Foram selecionadas 98 de 487 crianças avaliadas em nosso serviço com baixa estatura utilizando os seguintes critérios: peso e comprimento normais para idade gestacional ao nascimento, escore-Z da altura < -2, escore-Z do IGF-1 < -1 e pico de resposta de GH ≥ 3,3 µg/L no teste de estímulo. DNA foi extraído de leucócitos periféricos desses pacientes para rastreamento de mutações no gene *GH1*. Realizamos estudo molecular por reação em cadeia da polimerase e sequenciamento automático de toda a região codificadora do *GH1.* Segregação familiar foi realizada para as variantes alélicas identificadas. Em nossa casuística, foram identificadas 10 variantes alélicas nos éxons 4 e 5 e no íntron 4 do *GH1*, sendo três variantes ainda não descritas na literatura (c.407G>A/p.Val122Ile, c.507C>T/p.Tyr169Tyr e c.456+19G>T). A análise *in silico* de todas as variantes identificadas indicou ausência de predição de efeito deletério sobre a proteína do GH. Estudo complementar realizado pelo nosso grupo identificou em crianças diagnosticadas com DIGH grave apenas uma paciente com mutação no *GH1* responsável pela forma dominante desta doença. Em conclusão, mutações no *GH1* causadoras da forma autossômica dominante de DIGH ou Tipo II não foram encontradas em nossa casuística, o que sugere que estas mutações sejam infrequentes em nossa população.

Descritores: Crescimento e desenvolvimento/genética; Estatura/genética; Transtornos do crescimento/diagnóstico; Transtornos do crescimento/classificação; Transtornos do crescimento/genética; Transtornos do crescimento/etiologia; Transtornos do crescimento/sangue; Hormônio do crescimento/deficiência; Hormônio do crescimento/genética; Hormônio do crescimento humano/deficiência; Hormônio do crescimento humano/genética; Mutação; Genes dominantes; Fator de crescimento *insulin-like* I; Criança; Pré-escolar; Linhagem.

Summary

Lido ACV. Study of Growth Hormone 1 gene *(GH1) i*n children with idiophatic short stature [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

The growth hormone (GH) / insulin-like growth factor-1 (IGF-1) axis is the most important hormonal regulator of post-natal linear growth. GH is encoded by the Growth Hormone 1 gene (*GH1*). Mutations in *GH1* with dominant inheritance, which exerts a dominant negative effect on the bioactive GH isoforms, are the main causes of monogenic isolated deficiency of growth hormone (IGHD), while deletions or point mutations in *GH1* are responsible for a rare autosomal recessive form of IGHD. However, only homozygous deletions were identified in patients with IGHD from Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, even after detailed investigation of *GH1*. This difference regarding to literature can be caused by different criteria used to diagnose IGHD in our group, which adopted the cutoff value of peak GH <3.3µg/L in response to stimulation test, in contrast to literature that describes other groups that use the cutoff peak value of the 7 - 10µg/L. Consequently, patients with autosomal dominant inheritance mutations in *GH1* could be being erroneously diagnosed, as having idiopathic short stature (ISS) in our group. Additionally, mutations that cause biologically inactive GH can also be responsible for short stature in these patients. Due to the factors described above, we decided to screen mutations in *GH1* in a group of children classified as ISS. We selected 98 of 487 children followed in our department with short stature according to the following criteria: normal birth weight and length for gestational age, height SDS ≤ -2, IGF-1 SDS < -1 and peak GH in stimulation test ≥ 3.3 µg/L. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes of the patients to screen for mutations in *GH1*. We performed molecular analysis by polymerase chain reaction and automated sequencing of the entire coding region of the *GH1*. Segregation analysis was performed in the presence of allelic variations. In our casuistic, we identified 10 allelic variants in exon 4, exon 5 and intron 4 of *GH1*, three of which have not been described (c.407G>A/p.Val122Ile, c.507C>T/p.Tyr169Tyr and c.456+19G>T). *In silico* analysis predicted that none of the mutant alleles would result in deleterious effect on the GH protein. An additional study in children diagnosed with severe IGHD, identified just one patient with the pathogenic *GH1* mutation responsible for the dominant form of this disease. In summary, defects in *GH1* responsible for the autosomal dominant form of IGHD or Type II were not found in our cohort of Brazilian patients, suggesting that these mutations are infrequent in our population.

Descriptors: Growth and development/genetics; Body height/genetics; Growth disorders/diagnosis; Growth disorders/classification; Growth disorders/genetics; Growth disorders/etiology; Growth disorders/blood; Growth hormone/deficiency; Growth hormone/genetics; Human growth hormone/deficiency; Human growth hormone/genetics; Mutation; Genes, dominant; Insulin-like growth factor I/analysis; Child; Child, preschool; Pedigree.

1 Introdução

O crescimento constitui um processo multifatorial que envolve diversos fatores genéticos e ambientais [1]. O sistema hormônio de crescimento (GH) / fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) é o principal determinante e regulador do crescimento linear pós-natal [2]. O GH secretado pela hipófise estimula a síntese e secreção de IGF-1 tanto no fígado quanto nos tecidos periféricos [3]. A promoção do crescimento linear pelo GH se faz de forma direta pela sua ação na cartilagem de crescimento e de forma indireta pela ação do IGF-1 neste mesmo tecido, sendo que produção local de IGF-1 ocorre em praticamente todos os tecidos mediando a suas ações autócrina e parácrina [4]. O GH ainda estimula no fígado a síntese da proteína ligadora das IGFs (IGFBP-3) e da subunidade ácido-lábil (ALS), que na circulação combinam-se com o IGF-1, formando o complexo ternário que prolonga a meia-vida do IGF-1 circulante [4].

Alterações no gene do hormônio de crescimento (*GH1)* foram as primeiras causas genéticas identificadas em pacientes com deficiência isolada de hormônio de crescimento (DIGH) [5]. Inicialmente foram descritas formas autossômicas recessivas de DIGH causadas por deleções ou mutações de ponto no *GH1* [6], porém, a forma mais frequente de DIGH de causa genética reportada na literatura mundial, apresenta herança autossômica dominante e é originada principalmente por mutações de ponto localizadas no íntron 3 do *GH1* [7]. DIGH causada por esta alteração genética possui grande variação fenotípica, tanto em relação à gravidade do

déficit de crescimento, como no comprometimento da secreção de GH, mesmo entre pacientes com a mesma mutação [7].

Em nosso grupo temos sistematicamente estudado o *GH1* em pacientes com DIGH, porém apenas deleções em homozigose foram identificadas em nossa casuística [8]. Esta diferença em relação aos dados descritos na literatura mundial pode ser resultado de uma diferença étnica regional ou pode ser justificada pelo critério diagnóstico de DIGH adotado pelo nosso grupo. Em nosso serviço utilizamos como critério para o diagnóstico de DIGH um do pico de GH em teste de estímulo inferior a 3,3 µg/L [9], em contraste com a literatura que descreve a utilização do valor de GH menor que 7 a 10 µg/L no teste de liberação para definir um pico de GH insuficiente [10]. Portanto, pacientes com mutações no *GH1* com herança autossômica dominante poderiam estar sendo erroneamente diagnosticados como portadores de baixa estatura idiopática (BEI) ou familiar em nosso serviço, visto que estes poderiam apresentar secreção de GH entre 3,3 a 10 µg/L nos testes de estímulo [11]. O mesmo poderia estar ocorrendo em outros serviços de endocrinologia em nosso país, pois recentemente a secretaria da saúde modificou os valores de corte para diagnóstico de DIGH para 5,0 µg/L (Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde, Portaria nº 110 de março de 2010). Desta forma, é possível que alguns pacientes com DIGH não estejam sendo corretamente diagnosticados, sendo, portanto, privados de tratamento adequado.

Outros fatores que também podem causar déficit estatural com concentrações séricas de GH normais ou elevadas e IGF-1 sérico muito

baixo, são as mutações no *GH1* responsáveis por gerar molécula de GH detectável pelos imunoensaios, porém, com baixa atividade biológica, ou seja, GH biologicamente inativo [12]. Variantes alélicas no *GH1,* principalmente localizadas na região promotora do gene, modulam a taxa de síntese de GH, podendo influenciar na altura de indivíduos saudáveis, portanto, além da importância do *GH1* como causa de DIGH, estudos demonstraram que variantes alélicas neste gene podem estar envolvidas na determinação da altura [13].

Pelos motivos apresentados, expandimos o estudo do *GH1* para um grande grupo de crianças com BEI. A nossa hipótese foi de que entre pacientes classificados como BEI poderiam haver portadores de mutações na região codificadora deste gene, e que devido ao rigor do valor de corte do GH para o diagnóstico de deficiência hormonal, estes pacientes poderiam estar sendo erroneamente classificados como BEI. Assim, nosso estudo poderia contribuir com importantes informações para indicação terapêutica nesses pacientes.

1.1 Hormônio de crescimento

1.1.1 Secreção do hormônio de crescimento

Os somatotrofos são células que compõem o tecido mais abundante da glândula hipofisária e apresentam a função de secreção do GH, uma citocina pleiotrópica que promove o crescimento pós-natal do tecido esquelético e muscular [(14)]. Dois peptídeos hipotalâmicos, o hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH) e a somatostatina (SST) regulam a síntese e secreção do GH nos somatotrofos. O GHRH estimula a produção de GH, enquanto a SST exerce função inibitória sobre a sua liberação [(3)]. A secreção de GH depende da alternância rítmica da liberação hipotalâmica do GHRH e da SST no sistema portal hipofisário. Por sua vez, o próprio GH contribui com a manutenção deste ritmo estimulando a SST e inibindo a secreção de GHRH [(15)]. Uma terceira via de regulação do GH é realizada pela grelina. Este hormônio secretado principalmente por células gástricas age em seu receptor, o receptor de secretagogo do hormônio de crescimento (GHSR) localizado no hipotálamo e na hipófise, estimulando a síntese e secreção do GH [(16)].

O GH é armazenado em grânulos secretores nos somatotrofos onde o aumento das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e de cálcio estimulam a sua secreção [(15)]. O GH produzido, é então secretado como uma proteína caracterizada por um uma estrutura conformacional terciária composta por um feixe helicoidal formado por quatro

hélices alfa antiparalelas separadas por ligações em alças que contêm duas pontes dissulfeto, sendo uma ponte de alça longa, onde ocorre a ligação do Cys-53 ao Cys-165, e uma ponte de alça curta, formada pela ligação do Cys-182 ao Cys-189 [4] (Figura 1).

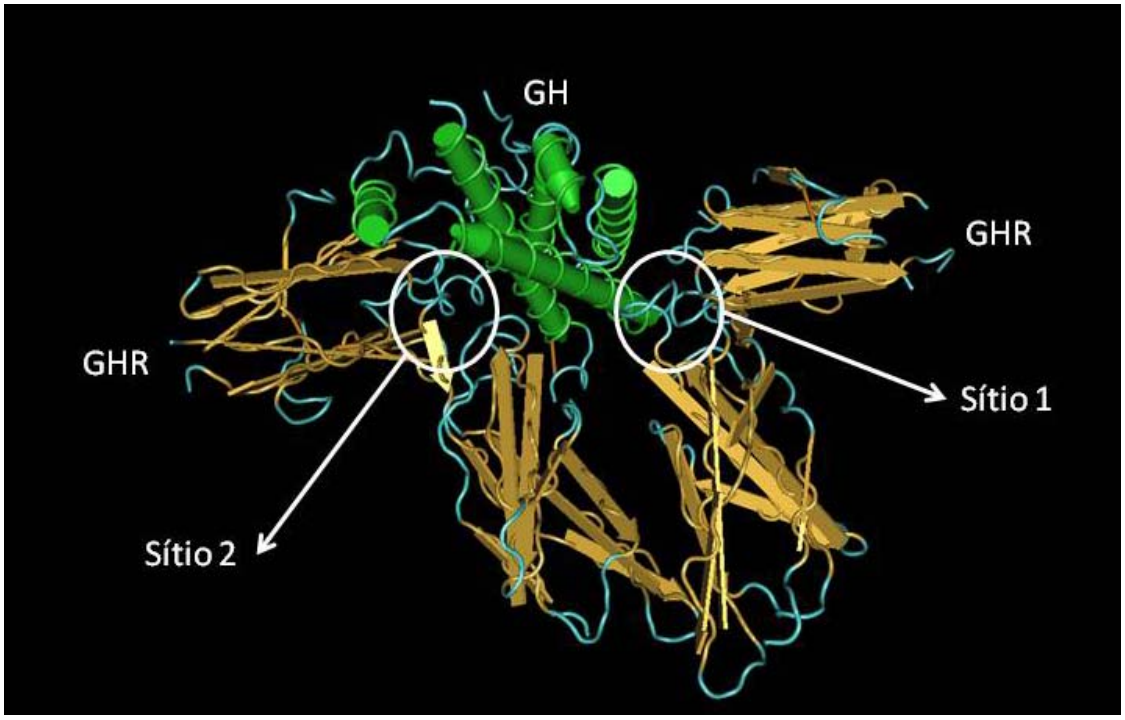

Figura 1- Diagrama do complexo ternário formado pelos receptores de GH (GHR). O GH é mostrado em verde (hormônio) e o receptor do GH (GHR) é mostrado em dourado

1.1.2 Gene do hormônio de crescimento

*O GH1 a*presenta 1.790 nucleotídeos, 65.000 bp (65 kb) e está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q22-24) em uma região conhecida como *cluster* do GH, que contém além do *GH1*, quatro outros genes placentários altamente homólogos, sendo dois genes da somatotrofina coriônica *(CSH1 e CSH2),* um gene variante do GH *(GH2 ou GH-V)* e o pseudogene da somatotrofina coriônica *(CSHL1).* Os cinco genes contêm cinco éxons intercalados por quatro íntrons e exibem alta homologia em suas sequências [2] (Figura 2).

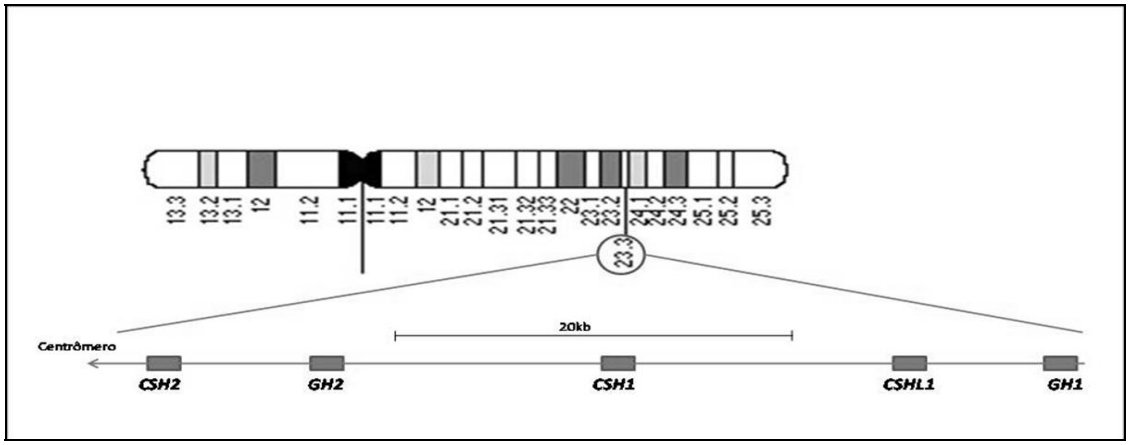

Figura 2- Localização cromossômica e organização do *cluster* do GH. Os genes placentários altamente homólogos (*CSG2*, *GH2*, *CSH1*, *CSHL1 e GH1*) são mostrados na figura

Apesar das semelhanças estruturais, os cinco genes homólogos apresentam substancial heterogeneidade em seus padrões de expressão. O *GH2 ou GH-V* codifica uma variante de peptídeo que foi expressa apenas *in vitro,* os genes *CSH1* e *CSH2* codificam a somatotrofina coriônica humana

que é expressa na placenta e o *CSHL1* é um pseudogene não expresso [17]. Apenas o *GH1* é expresso nos somatotrofos hipofisários e participa da regulação do crescimento pós natal [17].

A expressão do *GH1* é regulada por uma região promotora proximal que se estende até 535-bp a jusante ou *downstream* ao sítio iniciador da transcrição do *GH1* e por uma região reguladora distal (LCR), localizada a 14,5-32 kb a montante ou *upstream* ao *GH1* [13]. A região promotora proximal exibe uma frequência alta de variação de sequências com polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) que estão localizados em regiões importantes para a transcrição do *GH1* [13, 18]. A maioria destes SNPs ocorrem nas mesmas posições no *GH1* e nos genes homólogos *GH2 ou GH-V, CSH1, CSH2, e CSHL1,* sugerindo que eles possam ter surgido por conversão gênica [18, 19]. Dois sítios de ligação sensíveis à *Deoxyribonuclease I* (DNase I) na região promotora proximal contêm regiões de ligação para o Fator de transcrição pituitário específico 1 (POU1F1 ou Pit-1) (-132 a -107, -92 a -67), para o Fator nuclear 1 (NP1) (-286 a -274), para a *Specific protein 1* (Sp1) (-136 a -127), para o Elemento responsivo à vitamina D (VDRE) (-60 a -46, -37 a -31) e para a Proteína de interação com elementos adenosina monofosfato cíclico (AMPc) responsivos (CREB), uma proteína que interage com elementos AMPc responsivos (188 a -184, -100 a -96) [13, 20] (Figura 3).

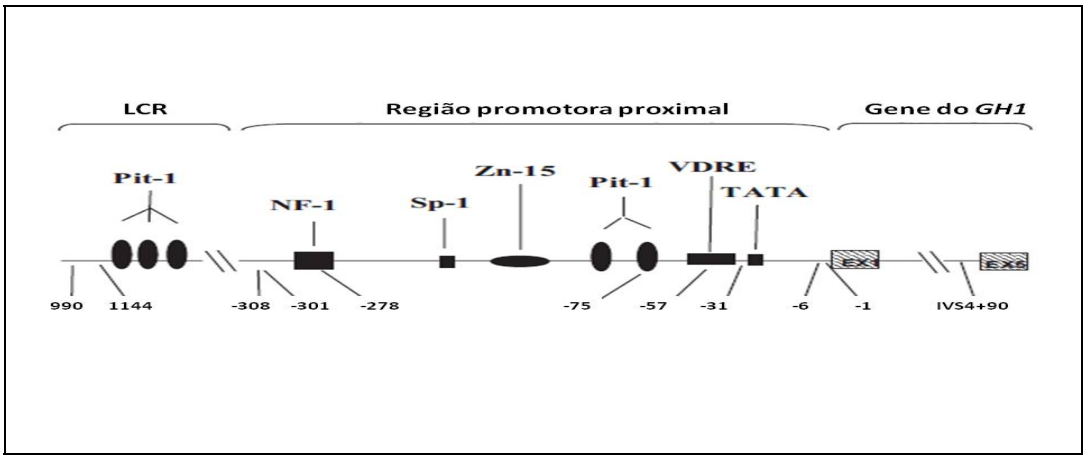

Figura 3- Localização dos SNPs na região a 14,5 kb *upstream* ao LCR do *GH1*. Os SNPs estão enumerados considerando o 1º nucleotídeo transcrito na região promotora a partir do nucleotídeo na região IVS4+90, de acordo com a sequência com o número de acesso M13438, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). A posição das regiões de ligação para os fatores de transcrição são mostradas na figura. Adaptado de Giordano et al., 2008 [20]

A expressão do *GH1* humano é também influenciada pelo LCR, que foi determinada como região de controle regulatória que contém elementos com capacidade de ativação funcional do *cluster* de genes do GH, provido de uma classe de elementos *cis* que funcionam de modo a alterar estrutura da cromatina e ativar ou silenciar a expressão gênica. O LCR contém múltiplos sítios de ligação sensíveis à DNAase I que é necessária para a ativação dos genes do *cluster* do GH tanto na hipófise quanto na placenta [21]. Alguns desses fatores podem exercer seus efeitos sinergicamente, enquanto outros parecem se ligar ao promotor de uma forma exclusiva [21], sendo responsáveis pelo elevado valor de expressão somatotrófica específica do *GH1.*

1.1.3 Isoformas do hormônio de crescimento

Aproximadamente 70% do GH circulante humano é expresso na hipófise anterior como uma isoforma maior, de 22kDa, composto por 191 aminoácidos de cadeia simples ligadas por duas pontes dissulfeto, ou disaminado, secretado como monômero, essa isoforma é conhecida como 22KDa.

Outra isoforma de menor peso molecular é de 20kDa que apresenta deleção de 15 aminoácidos (Del 32-46), resultante de *splicing* alternativo com perda de parte do éxon 3 [22] (Figura 4). Esta isoforma apresenta 176 aminoácidos e sua expressão corresponde a 6% do GH circulante. Sua atividade biológica, em concentrações fisiológicas, é semelhante a da isoforma de 22kDa.

Uma terceira isoforma existente, resultante de perda dos resíduos 32 a 71 que correspondente a todo o éxon 3, apresenta peso molecular de 17,5 kDa [23] (Figura 4). Embora esta isoforma exista em condições patológicas onde há mutação do *GH1* (DIGH do tipo II), esta não é expressa em quantidades significativas em condições fisiológicas.

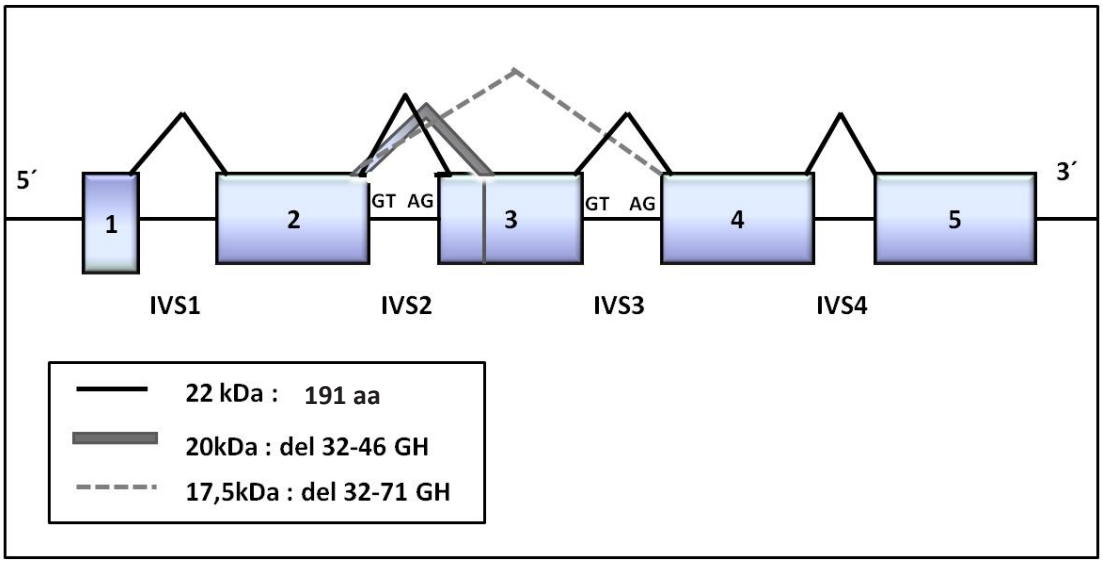

Figura 4- Representação estrutural das isoformas do GH. Adaptado de *Giordano et al., 2008* [20]

Outros monômeros também são secretados, porém sem expressão funcional, como os de 27, 17 e 5 kDa e oligômeros como o *"big"* e o *"big big*" GH (>45 kDa) [14], essas isoformas são resultado de várias modificações pós-translacionais como acetilação amino-terminal, desamidação e oligomerização que podem ocorrer no GH na hipófise [24]. As modificações monoméricas podem ocorrer tanto para as formas de 22kDa como de 20kDa, porém são mais frequentemente demonstradas para a forma de 22kDa e podem apresentar-se como oligômeros até pentâmeros, mas o agregado dimérico é o mais frequente [25]. Cerca de dois terços dos oligômeros apresentam ligações não covalentes, um terço apresenta ligações intermoleculares dissulfídicas, e uma pequena proporção (<1%) não pode ser dissociada por métodos padrões, apresentando forma de ligação não conhecida. Tanto homo-oligômeros (22kDa-22kDa ou 20kDa-20kDa) como hetero-oligômeros, entre 22kDa e 20kDa foram descritos (Quadro 1).

Quadro 1- Representação das isoformas de GH na hipófise

Isoformas de GH	%
GH Monomérico	
22kDa GH	55%
20kDa GH	6%
GH Desaminado	
22 kDa -GH-Asp	6%
22 kDa -GH-Glu	2%
GH acetilados (22 kDa)	4%
GH glicosilados (forma minor)	0,5%
GH Dimérico	
Homo e heterodímeros não covalentes	10%
Dímeros dissulfidicos	7%
Dímeros não dissociados	1%
GH Oligomérico	
Oligômeros não covalentes	5%
Oligômeros ligados a dissulfitos	2%
Outros oligômeros não dissociados	<1%

Abreviações: GH – Hormônio de crescimento, Asp- aspartato, Glu- glutamato, kDa- quilodalton

1.1.4 Ações do Hormônio de crescimento

No momento em que o GH é secretado para a circulação, a ligação com o carreador, a proteína de ligação do GH (GHBP) é rápida e se completa dentro de 37 segundos a poucos minutos. Aproximadamente 50% do GH circulante encontra-se ligado a uma GHBP de alta afinidade, que é uma proteína derivada do domínio extracelular do receptor de GH por clivagem proteolítica. O efeito fisiológico da GHBP é de prolongar a meia-vida do GH na circulação retardando a sua depuração [(26)]. Tanto o GH livre quanto a sua forma ligada ao transportador coexistem no plasma. A proporção de formas livres e ligadas apresentam variação após um evento secretório de GH.

As ações biológicas do GH (Quadro 2) são mediadas através de sua interação com um receptor de membrana de superfície celular específico (GHR), pertencente a super família dos receptores de citocinas [(14)]. O GHR possui um único domínio transmembrânico e não apresenta atividade enzimática intrínseca, necessitando estar associado na sua porção intracitoplasmática a uma proteína com atividade de tirosina quinase, conhecida como *Janus quinase 2* (JAK-2), para que ocorra a transdução do sinal intracelular [(27)]. Cada molécula de GH contém dois sítios de ligação ao receptor, e se liga a duas moléculas sequencialmente de GHR, induzindo mudança na conformação espacial da porção intracitoplasmática e consequente ativação intracelular da JAK-2. Uma vez fosforilada, a JAK-2 passa a fosforilar múltiplos resíduos de tirosina presentes no GHR gerando

sítios de acoplamento para outras moléculas sinalizadoras, ativando diversas vias de sinalização comuns a vários receptores com atividade quinase, cujas moléculas mensageiras se ligam a estes sítios de tirosina fosforilada. A principal via de sinalização ativada pelo GHR e JAK-2 é da *Signal Transducer and Activators of Transcription* (STAT). Várias STATs são ativadas após a dimerização do GHR, mas a *Signal Transducer and Activators of Transcription 5b (*STAT5b) é a que exerce papel principal na transdução do sinal do GH, sendo que, quando ativada é translocada para um núcleo onde promove a síntese do IGF-1, IGFBP-3 e ALS, além de desencadear estímulo direto à proliferação celular [28].

Quadro 2 - Principais atividades biológicas do GH

- Promoção do crescimento somático
- Alongamento da placa de crescimento
- Geração de IGF-I, IGFBP-3 e ALS
- Retenção de nitrogênio
- Transporte de aminoácido intramuscular
- Efeito lipolítico
- Antagonismo à insulina
- Hiperplasia de células Beta pancreáticas
- Retenção de sódio e fósforo renais
- Lactogênese
- Estímulo ao sistema imune

Abreviações: *ALS-subunidade ácido lábil, IGF-1- fator de crescimento insulina símile tipo 1, IGFBP3- proteína de ligação para o fator de crescimento insulina símile tipo 3, GH-hormônio de crescimento*

1.1.5 Deficiência de hormônio de crescimento

A incidência estimada da deficiência de GH (DGH) é de 1:3.000 a 1:10.000 crianças [29]. Não existe um único quadro clínico que defina especificamente a DGH. A deficiência de GH pode ser isolada ou combinada a deficiência de outros hormônios hipofisários. Tipicamente os pacientes apresentam baixa estatura proporcional, baixa velocidade de crescimento (VC) e atraso de idade óssea. A magnitude destes achados pode variar dependendo da duração e da gravidade da DGH. Os aspectos clínicos clássicos das formas graves de DGH isolada são facilmente caracterizados: o recém-nascido apresenta comprimento e peso normais, pode apresentar hipoglicemia prolongada sem causa aparente e micropênis. O retardo do crescimento não é expressivo logo após o nascimento, tornando-se evidente após o segundo ano de vida, quando pode atingir valores bastante baixos da estatura como -3 ou -4 desvios padrão (DP) em relação à média para idade e sexo. Outras características como obesidade truncal, aumento da espessura de pregas cutâneas, desenvolvimento muscular diminuído, aparência facial infantil com fronte proeminente e nariz em sela, atraso na dentição, cabelos finos e esparsos, voz aguda e infantil, idade óssea atrasada para idade cronológica podem ser observadas em crianças com DIGH. Formas clínicas menos evidentes ocorrem em crianças com DIGH parcial e/ou de início mais tardio. Portanto, o aspecto clínico da DGH não é único, uma vez que pode apresentar-se com graus variáveis de baixa estatura e de diminuição da velocidade de crescimento, com discreto até

grande atraso da idade óssea e com ou sem outras características fenotípicas.

A investigação laboratorial da DGH baseia-se na análise direta da secreção do GH ou indiretamente através das dosagens das proteínas IGF-1 e IGFBP-3, que apresentam as suas concentrações séricas dependentes da ação do GH. Há grande variedade de testes disponíveis para avaliar a secreção de GH. Os principais testes farmacológicos rotineiramente empregados (hipoglicemia, clonidina, arginina e glucagon) são comparáveis quanto à sensibilidade e especificidade [30]. Próximo de 10 a 35% das crianças sem DGH podem falhar em obter uma resposta adequada durante um único teste de liberação de GH [29, 31]. Por este motivo, dois testes de estímulos, sequenciais ou em dias separados, devem ser realizados para comprovar a deficiência de GH. Mesmo quando submetidos a dois testes distintos, 3 a 10% das crianças normais podem falhar em demonstrar uma resposta normal em ambos os testes [29, 31]. Por esta razão, o diagnóstico de DGH é feito em pacientes com quadro clínico compatível e que falhem em obter resposta normal em dois testes de estímulo. O uso crônico de corticóides, hipotireoidismo não tratado, deprivação psicossocial, obesidade e idade peripuberal são condições que podem aumentar a taxa de falso diagnóstico de DGH quando baseado apenas nos testes de estímulo.

O valor de pico do GH no teste de estímulo para o diagnóstico da deficiência de GH foi estabelecido de forma arbitrária mundialmente. Inicialmente, foram definidos valores de corte do GH abaixo de 5 µg/L como resposta ao teste de estímulo, no período em que o GH era determinado

utilizando ensaios com anticorpos policlonais e a disponibilidade do GH para uso terapêutico era limitada por ser obtido de cadáver [11]. Com a disponibilidade do GH recombinante humano (rhGH) para tratamento, o valor de corte foi alterado gradualmente para 7 µg/L a 10 µg/L [29, 30]. Estes valores de corte não consideram a idade ou estadio puberal do paciente, o ensaio empregado para a determinação do GH e a influência dos fatores intrínsecos ao ensaio, como a heterogeneidade da molécula GH devido as diferentes isoformas circulantes, a concentração do GHBP circulante e a calibração utilizada para o ensaio. Nos últimos anos, diversas mudanças na metodologia de dosagem do GH implicaram em alterações dos resultados obtidos nos diferentes ensaios de detecção do GH, porém, revisão dos valores de referência de GH durante os testes de estímulo não foi realizada. No ano de 2000, um consenso sobre o diagnóstico de DIGH recomendou a padronização de ensaio monoclonal para dosagem de GH sérico e identificou a necessidade de serem reavaliados os valores de corte do GH para o diagnóstico da DIGH [10]. Algumas sociedades de endocrinologia pediátrica debatem a necessidade de serem reestabelecidos novos valores de corte do teste de estímulo para o diagnóstico da DIGH, com a redução no valor de corte para o pico de GH no teste de estímulo atualmente utilizado. Em nosso serviço, foram determinados os valores de resposta normal do GH após estímulo com clonidina (0,1 mg/m²) em crianças pré-púberes normais e comparados com os valores de GH de pacientes com deficiência comprovada de GH [9]. O GH foi dosado pelo método imunofluorométrico (IFMA) (AutoDELFIATM, Wallac®, Turku, Finlândia), que utiliza dois

anticorpos monoclonais específicos para a forma 22 kDa do GH (limite de detecção 0,1 µg/L) e o ensaio calibrado pelo padrão internacional 80/505 da Organização Mundial de Saúde (OMS) [32]. O valor de GH de 3,2 µg/L foi o que melhor discriminou estas duas populações [9].

Recentemente estudos genéticos moleculares tem ganhado destaque como ferramenta complementar para o diagnóstico e acompanhamento de crianças com DIGH [33-35].

2 Mutações e polimorfismos no gene GH1

2.1 Histórico

Em 1970, Illig *et al.* descreveram três crianças de etnia suíça com retardo de crescimento grave, características faciais típicas de DGH, uma resposta exuberante de crescimento com GH exógeno, porém com o desenvolvimento de anticorpos que aboliam este efeito [36]. Após a clonagem do gene *GH1* em 1981, Phillips *et al.* analisaram o ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico proveniente destas crianças pela técnica de *southern blotting* e identificaram deleção em homozigose do *GH1* [37], sendo este o primeiro defeito molecular identificado neste gene.

Até o momento, DIGH pode ser classificada pelo padrão de herança e pelos defeitos no *GH1, sendo* observadas duas formas com herança autossômica recessiva (Tipo IA e IB) e uma forma com herança autossômica dominante (Tipo II) [35].

2.2 DIGH tipo IA

É a forma mais grave de apresentação do DIGH, na qual se observa completa deficiência pré e pós-natal da secreção de GH endógeno com o quadro clínico clássico de DGH. Nestes pacientes observa-se ausência completa da secreção de GH e resposta transitória ao tratamento com rhGH, seguida pelo desenvolvimento de altas concentrações de anticorpos anti-GH, que frequentemente interferem na ação do GH exógeno [(37)]. O frequente desenvolvimento de autoanticorpos após a reposição exógena com rhGH em pacientes com a DIGH tipo IA pode ocorrer devido a falta de tolerância imunológica perante a completa deficiência de GH [(38)]. É importante ressaltar que nem todos os pacientes com a deleção do *GH1* desenvolvem anticorpos. Além disso, em famílias com vários irmãos afetados, observa-se extrema variabilidade nos títulos de autoanticorpos e na resposta de crescimento com rhGH [(39)]. As razões para tal variabilidade são ainda não conhecidas.

O DIGH tipo IA apresenta forma de herança autossômica recessiva, podendo ocorrer deleção completa no *GH1* assim como mutações de ponto tipo *nonsense, frameshif* ou que alterem o processo normal de *splice* [(37)]. As deleções descritas são heterogêneas, ocorrem dentro do *cluster* do gene que compreende o *GH1*, sendo a mais frequente encontrada de 6,7 kb (60-70%). Outras deleções descritas são de 6,5 kb, 7,6 kb, 7,0 kb e 45 kb; deleções mais infrequentes também tem sido encontradas, essas normalmente ocorrem por processo de recombinação anômala no *cluster*

gênico durante o processo de meiose [40]. Além de deleções no *GH1*, mutações em heterozigose composta, em *frameshift* ou mutações em homozigose tipo *nonsense* podem resultar em molécula de GH severamente truncada ou até mesmo ausente.

A frequência de deleções do *GH1* como causa de DIGH varia entre diferentes populações e de acordo com os critérios definidos para diagnóstico da baixa estatura. Dados publicados na literatura estimam que cerca de 10 a 15% dos indivíduos com DIGH grave (escore Z da altura ≤ -4,5) apresentam deleções em homozigose no *GH1* [41]. No entanto, esta é uma estimativa média de frequência, que pode variar de acordo com diferenças étnicas ou geográficas das populações estudadas, bem como devido as diferenças de critérios de seleção de doentes entre os estudos. Por exemplo, enquanto Mullis *et al.* identificaram deleções no *GH1* em 10 de 78 (13%) dos pacientes britânicos com DIGH grave [42], Parks *et al.* descrevem incidência de 5 em 13 (38%) nos judeus com DIGH [43] e Kamijo *et al.* descrevem incidência de deleções em apenas 1 de 23 (4%) dos pacientes chineses com DIGH com menor gravidade (escore Z da altura ≤ -2,5) [44]. Wagner *et al.* relataram diferenças étnicas e geográficas na frequência das deleções do *GH1* em estudo com pacientes com DGH grave; sendo que, as frequências observadas em norte europeus, mediterrâneos e asiáticos foram de 8,7%, 11,8% e 18,7%, respectivamente [45]. Ruiz-Pacheco *et al.* realizaram metanálise e descrevem a presença de deleções do *GH1* em 42/101 (42%) dos casos familiares e 52/280 (19%) do total dos casos [46].

2.3 DIGH tipo IB

DIGH Tipo IB é causada por diversos tipos de mutações no *GH1 (splice, frameshif, missense e nonsense),* apresentando padrão de herança autossômica recessiva, sem desenvolvimento de autoanticorpos [47, 48]. Mutações no gene do receptor de GHRH (*GHRHR*) também podem ser responsáveis por esta forma de DIGH [49]. Pode ser caracterizada por valores baixos de GH sérico, estatura com 2 desvios padrão abaixo da média para a faixa etária e sexo, VC abaixo do percentil 25 e atraso na idade óssea. O fenótipo é mais variável que no DIGH tipo IA, em algumas famílias as crianças podem apresentar crescimento semelhante ao DIGH tipo IA, enquanto que em outras famílias, o crescimento durante a infância pode ser relativamente normal. Da mesma forma, a dosagem do GH sérico pode variar entre pequena redução até mínima resposta ao teste de estímulo. Apresenta resposta ao tratamento com rhGH sem desenvolver tolerância imunológica.

2.4 DIGH tipo II

A forma genética mais frequente de DIGH é o tipo II, causada principalmente por mutações específicas em sítios de s*plice* no *GH1,* sendo a mais frequente nos primeiros seis pares de base da região 5' do íntron 3 (5'IVS-3), o que resulta na formação do GH 17,5kDa, o qual exerce efeito dominante negativo sobre a secreção da isoforma de 22kDa. A isoforma de 17,5kDa é inicialmente retida no retículo endoplasmático e após romper o aparelho de Golgi, interfere na secreção do GH, reduzindo parcialmente a estabilidade da isoforma de 22kDa, como também altera a secreção de outros hormônios hipofisários [(50)]. Camudongos transgênicos que superexpressam a isoforma de 17,5kDa exibem defeito na maturação de vesículas secretoras de GH e apresentam glândula hipofisária anterior hipoplásica devido a perda de grande parte dos somatotrófos.

O éxon 3 apresenta regiões flanqueadoras de *splice* fracas, sendo considerado um fraco aceptor e fraco doador de sítios *de splice.* Elementos reguladores de *splicing* são essenciais para correção de *splice*, inclusão do éxon 3 e produção da isoforma de 22kDa. Os elementos reguladores de splicing do éxon 3 são *exonic splice enhancers 1 e 2* (ESE1 e ESE2) *e cryptic splice site* (CSS); no íntron 3 são os primeiros 6 nucleotídeos desse íntron e elementos intrônicos como *intronic splice enhancer* (ISE) ou região intrônica potenciadora de *splice* e *branching point site* (BPS) (Figura 5).

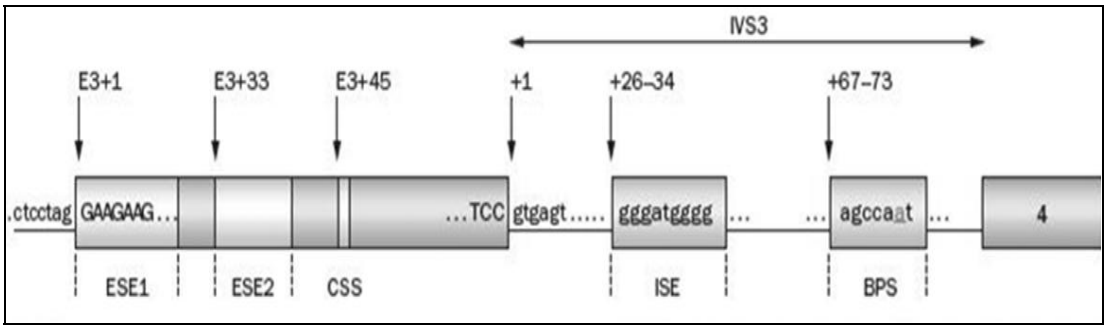

Figura 5 - Representação estrutural dos elementos reguladores de *splicing* exônicos e intrônicos. Os elementos de regulação *de splicing* no éxon 3 são ESE1, ESE2 e CSS. No íntron *3* são os primeiros 6 nucleotídeos deste íntron, ISE e BPS. Abreviações: BPS *(branching point site),* CSS *(cryptic splice site),* ESE1 (*exonic splice enhancer 1),* ESE2 (*exonic splice enhancer 2),* ISE *(intronic splice enhancer),* IVS3 (região do íntron 3). Adaptado de Alatzoglou et al. [7]

Outras mutações localizadas fora do sítio doador *de splice* do íntron 3 (5'IVS-3) também foram descritas causando DIGH tipo II, incluindo-se mutações do éxon 3 nas regiões de enhancer ESE1 e ESE2, na região a *downstream* da região críptica *de splice* no éxon 3, no CSS, bem como dentro da região intrônica potenciadora de splice [51-53] (Figura 5). Em tais mutações encontram-se sequências ricas em purina que podem causar aumento dos níveis de transcritos com perda no éxon 3, levando a alteração dos elementos de *splice* normais [53].

Os primeiros 7 nucleotídeos do éxon 3 (ESE1) são fundamentais para o *splicing* normal de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do GH, de tal modo que, algumas mutações em *nonsense* podem causar perda de um ou mais éxons durante o *splicing* de RNA nuclear. Além das mutações descritas de *splice* que resultam na deleção dos aminoácidos 32 a 71 do *GH1*, três outras mutações *missense* no *GH1* são descritas com substituição de

leucina por prolina, histidina para a arginina e fenilalanina para valina na posição do aminoácido 89 (P89V), 183 (R183H) e 110 (V110F) respectivamente [54]. A mutação em heterozigose c.731A>G (K41R–p.Lys67Arg) na região ESE2, levou a perda de aproximadamente 20% do éxon 3 resultando tanto em estatura baixa como normal [53].

Estudos recentes avaliaram a frequência de mutações no *GH1* em grandes casuísticas de pacientes com DIGH com imagem normal da região hipotalâmico hipofisária. Em um estudo avaliando pacientes da população holandesa, foram observadas mutações em heterozigose no *GH1* em 17% dos 51 pacientes com DIGH e imagem normal [34]. Em um estudo multiétnico, a frequência de mutações no GH1 foi de 7,4% em um grupo de 190 afetados, sendo 79% destas mutações responsáveis por DIGH tipo II [55].

Pacientes com diagnóstico de DIGH tipo II podem apresentar grande variabilidade na expressão fenotípica [6]. Indivíduos que apresentam mutações que comprometem diretamente os sítios de *splice* apresentam baixa estatura mais grave que os pacientes com mutações *missense* [6]. Análise de grandes famílias com DIGH tipo II demonstrou que membros de uma mesma família e com o mesmo tipo de mutação podem apresentar gravidades diferentes da baixa estatura, até mesmo havendo adultos com altura normal sem tratamento [35, 56].

Importante variabilidade é observada quanto a secreção de GH nos testes de estímulo nestes pacientes, que em geral é baixa, porém detectável, mas frequentemente apresenta valores acima de 5 µg/L [35, 56]. A

resposta secretória do GH pode variar em diferentes momentos [56], o que, por sua vez, pode dificultar o diagnóstico diferencial com a BEI e contribuir para aumentar a dificuldade em estabelecer critérios precisos e corretos para o padronização do diagnóstico diferencial entre as duas patologias.

2.5 Variantes alélicas na região promotora

Estudos que avaliaram a região promotora proximal do *GH1* em pacientes com DIGH [20], BEI [57] e indivíduos saudáveis [58], identificaram diversas variantes alélicas. Muitas destas variantes alélicas localizam-se em sítios de ligação dos fatores de transcrição que regulam a expressão do *GH1* [19]. Assim, três SNPs se aglomeram ao redor do sítio de iniciação transcricional do *GH1*, outros se localizam em sítios de ligação do VDRE proximal, adjacente à *TATA-box* e no VDRE distal, assim como em sítios de ligação do POU1F1 ou PIT1 e do NF1 [59] (Figura 6). Alguns haplótipos definidos por estes SNPs estão associados com o aumento ou redução da expressão do *GH1* em relação ao haplótipo referência, podendo modular a secreção de GH e influenciar na determinação da altura de indivíduos saudáveis [13].

Poucos estudos avaliaram sistematicamente as regiões promotoras do *GH1* em crianças com DIGH ou BEI [58, 60, 61]. Nos estudos que realizaram esta investigação, a característica polimórfica da região promotora proximal é bem caracterizada com achados de variantes raras de significado incerto e raras mutações que comprovadamente estariam associadas a menor

transcrição do *GH1* e consequentemente relacionada com o fenótipo de baixa estatura [58, 60, 61].

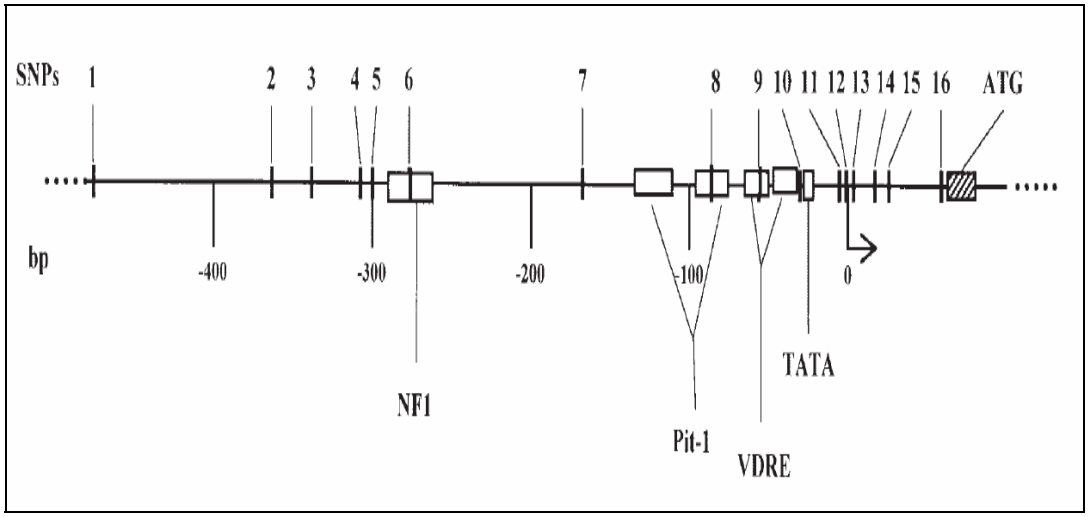

Figura 6- Região promotora do *GH1* e a localização de 16 SNPs. Região dos fatores iniciadores de transcrição está marcada pela seta, éxon 1 está marcado pela caixa hachurada e regiões de ligação aos fatores de transcrição como fator nuclear 1 (NF1), fator de transcrição pituitário específico 1 (PIT1 ou POU1F1), elemento responsivo à vitamina D (VDRE), região *TATA Box* e códon de iniciação translacional estão demarcados na figura. Adaptado de Horan et al. [13]

2.6 Mutações causando GH biologicamente inativo

O conceito de GH bioinativo foi pela primeira vez proposto por Kowarski *et al.*, baseado na observação de duas crianças com baixa estatura, concentrações normais ou elevadas de GH sérico, com valores séricos de IGF-1 baixo, porém com resposta normal ao GH exógeno [(62)]. Foi postulado que estes pacientes apresentavam molécula de GH que era detectada nos imunoensaios, porém incapaz de ativar o seu receptor. Na década de 90, Takahashi et al. descreveram dois pacientes japoneses com mutações *missense* em heterozigose no *GH1* [(63, 64)]. Os pacientes apresentavam baixa estatura importante (escore Z da altura -3,6 e -6,1), valores de GH basais e após estímulo elevados, em associação com IGF-1 sérico baixo, que apresentavam elevação com o tratamento com rhGH. O estudo molecular identificou duas mutações *missense* em heterozigose em cada paciente: p.Arg77Cys e p.Asp112Gly no éxon 4 do *GH1.* O GH mutante apresentou comprometimento da transcrição do gene consequente a redução da capacidade de ativar as vias de sinalização do GHR induzida pela ligação do GH ao GHR/GHBP. Porém, a mutação p.Arg77Cys também foi identificada em um pai fenotipicamente normal [(65)]. Posteriormente seis variantes de GH bioinativo foram sugeridos por Millar et al. [(61)]. Mais uma vez, todas estas mutações foram encontradas em heterozigose e não houve nenhuma correlação específica entre fenótipo clínico/laboratorial e genótipo do paciente.

O relato mais convincente de GH bioinativo descrito até o momento na literatura, é uma mutação missense em homozigose p.Cys53Ser, causando a ruptura da ligação da ponte dissulfeto entre Cys-53 e Cys-165 do GH [12]. Esta mutação foi encontrada em um menino de etnia sérvia com baixa estatura grave e perfil hormonal compatível com molécula de GH bioinativa. Estudos funcionais demonstraram que o GH mutado apresentava menor afinidade ao GHR e menor capacidade de ativar a via JAK2/STAT5 [12].

2.7 Resultados prévios do estudo do *GH1* em nosso grupo

Em nosso serviço, o *GH1* foi rotineiramente estudado em todos os pacientes com DIGH sem evidências de alterações na haste hipofisária ou processo tumoral em estudo de imagem com ressonância magnética da região hipotálamo hipofisária. Trinta e oito pacientes com deficiência grave de GH, definidos com pico máximo de GH em teste de estímulo < 3,3 µg/L, foram avaliados para mutação de ponto e deleção no *GH1,* incluindo região promotora, éxons e íntrons em estudo prévio [8, 66]. Foram identificados 7:38 (18%) pacientes com deleção em homozigose no *GH1*, um paciente com mutação em heterozigose composta (deleção e mutação no íntron 2, c.171+5G>C) e um (2,6%) paciente com mutação no íntron 3 do *GH1* em heterozigose responsável pela forma autossômica dominante (c.291+1G>T). Observa-se em nossa casuística uma menor frequência de mutações no *GH1* que conferem formas autossômicas dominantes de DIGH, principalmente ao considerar que em outras casuísticas, as mesmas estavam presentes em 11 a 17% dos casos semelhantes aos estudados [34, 55].

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal

Estudar o gene do hormônio de crescimento 1 em crianças com baixa estatura idiopática.

3.2 Objetivos específicos

Sequenciar toda a região codificadora (éxons) e íntrons do *GH1* em crianças com baixa estatura idiopática com diferentes respostas de secreção do GH no teste de estímulo.

4 Métodos

4.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki (adotada na 18ª Assembleia Médica Mundial, Helsinki, Finlândia, 1964). Esta pesquisa foi submetida à aprovação da Comissão de Ética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP). Após a aprovação do estudo, autorização por escrito foi obtida junto aos pacientes e/ou responsáveis legais para inclusão no projeto.

4.2 Pacientes

Os candidatos para o estudo foram selecionados a partir dos pacientes atendidos no ambulatório de endocrinologia da Faculdade de Medicina do Hospital das Clínicas de São Paulo com base nos seguintes critérios:

4.2.1 Critérios de inclusão

1) Baixa estatura de início pós-natal e com proporções corpóreas normais.
2) Escore-z da altura < -2 [67] e/ou com velocidade de crescimento, observada em um período igual ou superior a 6 meses inferior a -1 desvio padrão para idade e sexo (escore Z da velocidade de crescimento < -1) [68].

4.2.2 Critérios de exclusão

1) Deficiência de hormônio de crescimento
2) Causas conhecidas de baixa estatura após o nascimento como presença de distúrbios genéticos e cromossômicos, desnutrição, doenças hepáticas, patologias sistêmicas, ósseas ou endocrinológicas.
3) Deficiência de outros hormônios hipofisários.
4) Haste hipofisária não íntegra ou presença de lesões estruturais em exames de imagem, como ressonância nuclear magnética da região hipofisária.

Utilizando estes critérios para um grupo de aproximadamente 487 pacientes cadastrados em nosso serviço, 98 pacientes preencheram as características necessárias e encontraram-se disponíveis para o estudo. Pacientes com história familiar de baixa estatura (presença de irmãos ou um dos progenitores com baixa estatura) foram avaliados criteriosamente.

4.3 Casuística

Com base nos conhecimentos atuais das mutações do *GH1*, dividimos os pacientes selecionados para o estudo em três subgrupos de crianças com BEI de acordo com a resposta do valor de secreção do GH ao teste de estímulo (Figura 7). Um primeiro grupo selecionado compreendia crianças com BEI, secreção de GH entre 3,3 e 5 µg/L no teste de estímulo e valores baixos de IGF-1. Um segundo grupo era formado por crianças com valores de IGF-1 baixo e secreção de GH entre 5,1 a 10 µg/L. Nestes grupos, todos os éxons e íntrons do *GH1* foram analisados com o objetivo de rastrear mutações. Um terceiro subgrupo de crianças estudadas apresentavam BEI, valores de IGF-1 baixo e pico de resposta de GH no teste de estímulo > 10 µg/L. Nestas crianças o *GH1* foi estudado com objetivo de identificar mutações causadoras de molécula de GH biologicamente inativa, porém identificada nos imunoensaios (Figura 7). Na presença de mutações, seriam realizados segregação familiar e estudo funcional para comprovação do efeito patogênico.

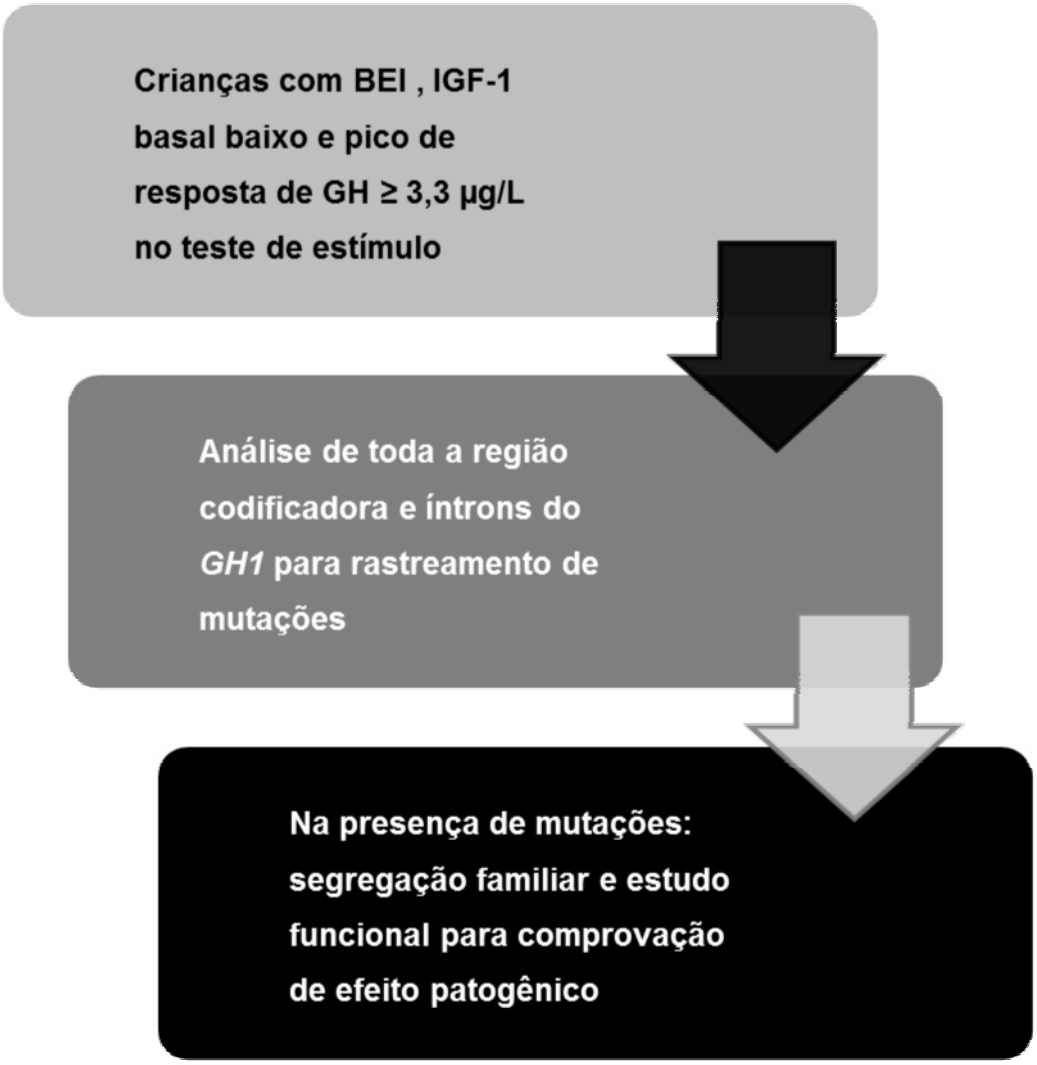

Figura 7 - Fluxograma da estratégia de estudo para os pacientes selecionados com BEI

4.4 Estudo Molecular

4.4.1 Extração do DNA genômico de linfócitos periféricos

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos indivíduos arrolados na pesquisa. Dez mililitros de sangue venoso foram colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se um volume de solução de lise (NH_4Cl a 114mM, NH_4HCO_3 a 1mM) duas vezes maior que o volume de sangue, incubado a 4^oC por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4^oC durante 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Germany), sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido uma vez.

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

retirado do tubo, em seguida lavado em etanol a 70% durante 5 minutos, com repetição do procedimento por mais três vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto, seguido de secagem por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após o procedimento, o DNA foi ressuspenso em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 0,1mM, pH 8,0).

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase

Em cada reação em cadeia da polimerase (PCR) foram amplificados 100 a 300ng do DNA genômico utilizando 200μM de cada trifosfato de nucleotídeo (dNTP), 20pmol/μl de cada *primer* específico, além do tampão TE (10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl2, 50mM KCl) e Taq DNA polimerase 2,5U (Pharmacia, Upsala, Sweden) para o volume final de 25μl. Os *primers* utilizados foram *GH éxon 1 sense, GH 5R, GH 2-F, GH 3 e 4-F, GH5F* desenhados para cobrir um fragmento de 1677 bp do *GH1*, incluindo a região codificadora (éxons 2,3,4 e 5) e íntrons (1,2,3 e 4) do gene. *A*s condições de amplificação foram padronizadas. Todas as amplificações foram acompanhadas por um controle negativo. As amostras amplificadas foram identificadas em gel de agarose a 2%, contendo o corante *Blue Green* fluorescente na concentração de 0,5μg/ml de gel, observadas em transiluminador ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid® (667 - 3 ¼ X 4 ¼).

4.4.3 Sequenciamento Automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi estimada através da comparação com fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida (ΦX) em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2U/μl) e exonuclease I (10U/μl) (PCR product pre-sequencing kit, Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA) com incubação a 37°C por 15 minutos seguido de 80°C por adicionais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit ABI PrismTM BigDye Terminator (Perkin Elmer) e quantidades variáveis de produto de PCR (10 a 100ng) de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer Perkin Elmer, Foster City, CA). A leitura dos eletroferogramas foi realizada através do programa Sequencher 4.10.1 (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, EUA).

4.4.4 Análise *in silico* das variantes alélicas identificadas no *GH1*

Todas as variantes alélicas encontradas foram estudadas *in silico* para avaliar o potencial impacto biológico. Foram realizadas pesquisas pelos programas *PubMed* e *The Human Gene Mutation Database* para verificar se as variantes estavam descritas na literatura. Foram realizadas pesquisas nos bancos de dados dos programas *Ensembl, dbSNP, HapMap e 1000 Genomes*, os quais são repositórios de informações sobre variabilidade genética. Para as variantes não sinônimas, foi realizada a predição *in silico* do impacto da troca de aminoácidos na estrutura e função da proteína, por meio do programa computacional *PolyPhen* (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph). Para todas as variantes alélicas, a avaliação quanto a mudança na previsão do sítio de clivagem (*splicing*) foi realizada pelo programa computacional *NatGene2* (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/).

5 Resultados

5.1 Características da casuística

Os noventa e oito pacientes foram selecionados para o estudo e agrupados em três subgrupos de acordo com o padrão de resposta de GH ao teste de estímulo: pico de GH entre 3,3 a 5 µg/L (n=24), 5,1 a 10 µg/L (n=53) e >10 µg/L (n=21). Na casuística analisada, a resposta ao teste de estímulo com valores de pico de GH entre 5,1 a 10 µg/L foi a mais frequente encontrada entre os pacientes (54%). As características clínicas e laboratoriais de todos os pacientes avaliados estão demonstradas na Tabela 1.

Foi observado em todos os subgrupos, predomínio de pacientes do sexo masculino. Presença de baixa estatura familiar (pai e/ou mãe com Z escore de altura ≤ -2) variou entre 43 a 62% entre os grupos. Consanguinidade familiar foi observada com frequência de 4 a 11%. Todos os grupos apresentaram Z escore de IGF-1 menor que -1 e Z escore de IGF-BP3 menor que -0,6. O Z escore de altura inicial foi semelhante entre os três grupos. O padrão de resposta do crescimento com o tratamento com rhGH foi similar entre os grupos, porém inferior a resposta observada em crianças classificadas como DIGH (pico de GH nos testes de estímulo < 3,3 µg/L) (Tabela 2).

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes selecionados para o estudo

	Pacientes classificados conforme o pico de GH em teste de estímulo		
	3,3 – 5,0 µg/L	**5,1- 10 µg/L**	**>10 µg/L**
Masculino : Feminino	14:10 (24)	37:16 (53)	15:6 (21)
Consanguinidade (%)	4	11	5
Z altura paterna	-1,0 ± 1,1	-1,4 ± 0,9	-1,5 ± 0,8
Z altura materna	-1,5 ± 1,2	-1,1 ± 1,1	-0,9 ± 1,3
História familiar BE (%)	50	43	62
Avaliação inicial			
Idade cronológica (a)	10,7 ± 4,6	9,2 ± 3,9	10,9 ±3,2
Δ Idade óssea (a)	2,4 ± 1,5	1,6 ± 1,3	2,4 ± 1,7
Z da altura	-2,7 ± 0,7	-2,7 ± 0,7	-2,7 ± 0,7
Z de IMC	-1,2 ± 1,7	-0,9 ± 1,5	-1,0 ± 1,4
Pre púberes (%)	54	70	57
Pico de GH (µg/L)	3.9 ± 1.0	7.7 ± 1.4	22.4 ± 8.7
Z do IGF-1	-1.3 ± 1.1	-1.6 ± 1.4	-1.1 ± 1.1
Z do IGFBP-3	-0.8 ± 1.2	-1.0 ± 1.1	-0.7 ± 1.0

1 – História familiar de baixa estatura foi considerada pela presença de pai e/ou mãe com Z da altura ≤ -2; Abreviações: a- ano, IMC- índice de massa corpórea, GH - hormônio de crescimento, IGF-1- fator de crescimento insulina símile tipo 1, IGFBP-3 - proteína de ligação para o fator de crescimento insulina símile tipo 3, Z-escore de desvio padrão em relação a idade e sexo, Δ- variação entre a idade óssea e a idade cronológica em anos na avaliação inicial)

Tabela 2- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes tratados com rhGH de acordo com o padrão de resposta ao GH

	Pico de GH em teste de estímulo		
	< 3,3 µg/L*	**3,3 – 10 µg/L**	**> 10 µg/L**
Masculino : Feminino	16 : 9	17 : 12	7 : 1
Z Altura alvo	-1,2 ± 0,9	-1,3 ± 0,8	-1,4 ± 0,5
Avaliação inicial			
Idade cronológica (a)	9,5 ± 4,7	9,5 ± 3,1	11,8 ± 1,9
Atraso na idade óssea (a)	3,5 ± 2,1[a]	2,4 ± 1,5	2,5 ± 1,5
Z da altura	-4,2 ± 1,4[b]	-3,2 ± 0,7	-3,4 ± 0,4
Estadio pré-púbere : púbere	13 : 6	21 : 8	6 : 1
1º ano de tratamento (rhGH)			
Dose (µg/kg/dia)	35 ± 9[c]	49 ± 6	43 ± 9
Vel. de crescimento (cm/a)	10,8 ± 4,9[a]	8,8 ± 2,3	7,1 ± 1,1
Variação Z da altura	1,1 ± 1,0[d]	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,2

* - Grupo de crianças com DIGH avaliados em nosso serviço com tratamento exclusivo com GH recombinante humano e sem o desenvolvimento de anticorpos neutralizadores da ação do GH

a - Crianças com pico de GH < 3,3 µg/L (DIGH) vs. crianças com pico de GH ≥ 3,3 µg/L; p = 0,018

b - Crianças com pico de GH < 3,3 µg/L (DIGH) vs. crianças com pico de GH ≥ 3,3 µg/L; p < 0,002

c - Crianças com pico de GH < 3,3 µg/L (DIGH) vs. crianças com pico de GH ≥ 3,3 µg/L; p < 0,001

d - Crianças com pico de GH < 3,3 µg/L (DIGH) vs. crianças com pico de GH ≥ 3,3 µg/L; p = 0,009

5.2 Resultados moleculares do grupo estudado

5.2.1 Análise de DNA

Foram identificadas dez variantes alélicas no grupo estudado (Tabela 3), sendo destas, três variantes ainda não descritas na literatura. Uma variante inédita identificada no íntron 4 do *GH1*, a 19 nucleotídeos após o término do éxon 4, com substituição de guanina por timina (c.456+19G>T) foi observada em uma paciente com pico de GH de 5,2 µg/L e Z escore de altura de -3,5. Tal variante não altera a predição do uso do sítio de *splice* habitual. Outra variante alélica ainda não descrita na literatura foi identificada em uma paciente com pico de GH de 7,1 µg/L e Z escore de altura de -2,6, localizada no códon 507 do éxon 5, com substituição de citosina por timina (c.507C>T), sem ocasionar mudança no aminoácido traduzido (p.Tyr169Tyr). No éxon 4 a variante inédita foi encontrada no códon 406, com substituição do aminoácido valina por isoleucina (p.Val136Ile) em paciente com pico de GH de 22,3 µg/L e Z escore de altura de - 2,6. Tal variante não segregou com o fenótipo de baixa estatura na família e análise *in silico* indica que a mesma não apresenta impacto sobre a função da proteína.

Seis outras variantes alélicas raras já descritas na literatura foram identificadas. Duas alterações eram não sinônimas sendo uma identificada no códon 363 do éxon 4 havendo substituição de serina por arginina (c.363T>A / p.Ser121Arg) em três pacientes e outra alteração não sinônima com troca de

isoleucina por metionina (c.615C>G / p.Ile205Met) foi encontrada no éxon 5 em um paciente. Ainda foram identificadas duas alterações sinônimas: uma no códon 447 do éxon 4, (c.447G>A / p.Thr149Thr) observada em 2 pacientes e uma no éxon 5, no códon 597 (c.597C>G / p.Tyr169Tyr) encontrada em outro paciente. Todas estas alterações ocorreram em frequência semelhante à observada em banco de dados de indivíduos saudáveis (Tabela 3). Três outras variantes foram encontradas em regiões intrônicas do *GH1*, sendo todas no íntron 4. Destas, duas já descritas com frequência semelhante a observada em banco de dados (c.456+22C>T e c.457-45A>G) e uma ainda não descrita na literatura (c.456+19G>T).

Um polimorfismo frequente do íntron 4 (rs2665802), com substituição de timina por adenina no nucleotídeo +90, foi encontrado em 45% dos pacientes do grupo, com frequência semelhante a dados já descritos na literatura (46%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Variantes alélicas encontradas após sequenciamento dos éxons 1 ao 5 e íntrons do *GH1* correspondentes a 98 pacientes analisados

Região	Localização		Frequência alélica	
	Nucleotídeo	**Proteína**	**Estudo**	**1000 *genomics***
Éxon 4	c.363T>A	p.Ser121Arg	1,8%	0,2%
Éxon 4	c.406G>A	p.Val136Ile	0.6%	Não descrita
Éxon 4	c.447G>A	p.Thr149Thr	1,2%	1,1%
Íntron 4	c.456+19G>T	-	0,6%	Não descrita
Íntron 4	c.456+22C>T	-	0.6%	0.01%
Íntron 4	c.456+90T>A	-	45%	46%
Íntron 4	c.457-45A>G	-	0.6%	0.01%
Éxon 5	c.507C>T	p.Tyr169Tyr	0,6%	Não descrita
Éxon 5	c.597C>G	p.Val199Val	0,6%	0,1%
Éxon 5	c.615C>G	p.Ile205Met	0,6%	0,1%

5.2.2 Análise *in silico* das variantes alélicas do *GH1*

5.2.2.1 Análise de predição de alteração de s*plice*

Para validar o modelo *in silico* de avaliação de alteração de *splice* pela ferramenta *NatGene2*, inicialmente avaliamos o impacto das mutações já descritas que ocasionam processamento aberrante do RNAm do *GH1* (Tabela 4).

Todas as mutações associadas ao DIGH tipo II por causarem a perda do éxon 3 no RNAm maduro por mecanismos de *splice* alterado, apresentam prejuízo do reconhecimento ou significante alteração no escore de predição de *splice* ao utilizar a ferramenta *NatGene2* (Tabela 4). No entanto, todas as variantes alélicas observadas no presente estudo não alteram a predição do uso destes mesmos sítios nem criam novos sítios de *splice*.

Tabela 4 - Análise de predição do uso dos sítios de *splice* do *GH1* das principais mutações descritas na literatura causando DIGH II baseado pela ferramenta *NatGene2*

Variante	Escores de predição de *Splice*								Ref.
	Sítios doadores				Sítios aceptores				
Localização	1	2	3	4	1	2	3	4	
Selvagem	0.64	0.55	0.76	0.91	0.72	0.17	1.0	1.0	
c.172-2 A>T	0.64	0.55	0.76	0.91	0.72	**0.0**	1.0	1.0	(69)
c.172G>T	0.64	0.55	0.76	0.91	0.72	**0.0**	1.0	1.0	(70)
c.176A>G	0.64	0.55	0.76	0.91	0.72	**0.0**	1.0	1.0	(51)
c.291+1G>A	0.64	0.55	**0.0**	0.91	0.72	0.17	1.0	1.0	(71)
c.291+2T>C	0.64	0.55	**0.0**	0.91	0.72	0.17	1.0	1.0	(72)
c.291+5G>A	0.64	0.55	**0.0**	0.91	0.72	0.17	1.0	1.0	(73)
c.291+6T>C	0.64	0.55	**0.55**	0.91	0.72	0.17	1.0	1.0	(74)
c.291+6T>G	0.64	0.55	**0.49**	0.91	0.72	0.17	1.0	1.0	(75)

Os escores de predição do uso de um determinado sítio como local de *splice*, demonstram o grau de confiabilidade do uso real deste sítio. As mutações estão nomeadas seguindo a sequência de referência do *GH1* NM_000515.3

5.2.2.2 Análise de predição de efeito deletério sobre a proteína das variantes *missense*

Inicialmente selecionamos as 6 mutações *missense* do *GH1* que apresentam efeito funcional comprovado e avaliamos a acurácia da ferramenta *PolyPhen2* em indicar que as mesmas apresentam um efeito deletério sobre a proteína (Tabela 5). Das 6 variantes analisadas, 4 foram corretamente identificadas como danosas, enquanto duas mutações foram indicadas como benignas.

Em relação as variantes alélicas não sinônimas identificadas no presente estudo (p.Ser121Arg, p.Val121Ile e p.Ile205Met) a análise *in silico* pelo programa *PolyPhen* indicou a ausência de predição de efeito deletério sobre a proteína do GH.

Tabela 5 - Análise de predição do impacto de mutações missense do *GH1* associadas com a geração de moléculas bioinativas descritas na literatura baseado pela ferramenta *PolyPhen2*

Padrão de herança	Éxon	Descrição da mutação		Dano na proteína		Ref.
		no cDNA	na proteína	Escore	Predição	
HT	3	c.200A>G	p.Lys67Arg	**1.00**	**Danosa**	(61)
HM	3	c.165G>C	p.Cys79Ser	**0.73**	**Danosa**	(12)
HT	3	c.289C>T	p.Ser97Phe	**1.00**	**Danosa**	(61)
HT	4	c.307C>T	p.Arg103Cys	0.09	Benigna	(63)
HT	4	c.413A>G	p.Asp138Gly	0.04	Benigna	(64)
HT	5	c.600A>G	p.Thr201Ala	**0.99**	**Danosa**	(61)

Abreviações: HT- heterozigose, HM- homozigose. As mutações estão nomeadas seguindo a sequência de referência do *GH1* NM_000515.3 do cDNA e NP_000506.2 para proteína

6 Discussão

A deficiência isolada de GH é uma condição heterogênea quanto a sua apresentação clínica e sua causa, sendo observada importante variação fenotípica, tanto em relação à gravidade do déficit de crescimento, como no comprometimento da secreção de GH [7, 34, 35, 56, 76]. Não existe um critério diagnóstico absoluto para caracterizar pacientes com DIGH, assim como pacientes com BEI, existindo pontos de sobreposição das duas condições em relação à apresentação clínica e quadro laboratorial (valores de IGF-1 ou GH após estímulo) [11, 40, 55]. Da mesma forma, em pacientes com DIGH bem caracterizados observa-se uma grande diversidade de defeitos moleculares implicados em sua etiologia [55].

Defeitos no *GH1* são responsáveis pela DIGH Tipo I ou forma autossômica recessiva e DIGH Tipo II ou forma autossômica dominante, bem como podem ser responsáveis pela geração de molécula de GH biologicamente inativa [7]. Em estudos prévios que investigaram o gene *GH1* em grandes grupos de pacientes com DIGH, as mutações responsáveis pela forma autossômica dominante ou Tipo II foram as mais frequentemente observadas [6, 33-35, 55, 56]. Por outro lado, em estudos anteriores em pacientes brasileiros com DIGH, foram identificadas somente deleções completas no *GH1* ou mutações no gene *GHRHR*, ambos com padrão de herança autossômica recessiva [8, 66]. Esta divergência pode representar uma diferença real na frequência das patologias entre diferentes populações ou, alternativamente, pode ser causada por diferentes critérios utilizados para

definir os pacientes com DIGH. O valor de corte do pico de GH (< 3,3 μg/L) utilizado para diagnosticar DIGH no nosso grupo é um dos mais rigorosos adotados, diferentemente da literatura que utiliza o valor de GH menor que 7 ou 10 μg/L [10]. Na casuística de nosso serviço, apenas deleções em homozigose foram identificadas, apesar de estudarmos criteriosamente o *GH1* em pacientes com DIGH, diferindo dos dados da literatura mundial, onde a forma mais frequente de DIGH de causa genética reportada apresenta herança autossômica dominante, tendo por etiologia, principalmente mutações de ponto localizadas no íntron 3 do *GH1* [7, 77].

Os critérios diagnósticos utilizados pelo nosso grupo, portanto, melhoram a especificidade [9], mas poucos dados existem quanto à possibilidade de comprometimento da sensibilidade no diagnóstico da DIGH. O maior rigor no critério dos valores de corte para o teste de estímulo do GH utilizado pelo nosso grupo, associado a importante variabilidade no padrão de resposta do GH que pode ser observada em pacientes com deficiência de GH aumentam a possibilidade de haver portadores de mutações no *GH1* com herança autossômica dominante, que poderiam estar erroneamente sendo diagnosticados como BEI em nosso serviço. Esse fator estimulou-nos a expandir o estudo do *GH1* em grande grupo de crianças com BEI, com o propósito de investigar a presença de mutações na região codificadora do gene. Estudamos as regiões exônicas e intrônicas do *GH1* em 98 pacientes acompanhados em nosso serviço, classificados como BEI e que apresentavam pico de GH ≥ 3,3 μg/L, não sendo identificadas mutações causadoras de DIGH tipo II em nossa casuística.

Nosso resultado diverge dos dados reportados na literatura, onde recentes estudos que avaliaram mutações no *GH1* em grandes casuísticas de pacientes com DIGH demonstram frequência de mutações em heterozigose no *GH1* de 7% (intervalo de confiança de 95% de 4 a 10% na frequência de DIGH tipo II) [34, 55]. Tal discrepância não pode ser explicada pelo número relativamente restrito de pacientes estudados. Para afastar uma frequência de 4% de DIGH tipo II com poder estatístico de 95%, são necessários 65 pacientes a serem estudados. Este número de pacientes foi suplantado com o presente estudo que analisou 77 pacientes com pico de GH entre 3,3 e 10 µg/L além dos 38 pacientes com DIGH (pico < 3,3 µg/L) também analisados pelo nosso grupo (dados ainda não publicados). Em contrapartida, a elevada frequência de DIGH tipo I causada por deleção completa do *GH1* em nossa casuística pode ser explicada pela alta frequência de consanguinidade no grupo com pico de GH < 3,3 µg/L (32%). Além disto não podemos descartar um viés de referência, sendo os casos mais graves de DIGH mais propensos a ser referido para nosso serviço.

No entanto, a ausência de mutação autossômica dominante no *GH1* em pacientes com picos de GH ≥ 3,3 µg/L no presente estudo, sugere que DIGH tipo II não é freqüente em nossa população. Podemos presumir que diferenças étnicas possam justificar a ausência de DIGH tipo II em nosso grupo.

No grupo de pacientes estudados com BEI e pico de GH > 20 µg/L não foram identificadas variantes alélicas responsáveis por GH biologicamente

inativo, mostrando que esta condição deva ser extremamente rara, como reflete a literatura médica [6, 12, 55].

Adicionalmente, em nossa casuística, os grupos de pacientes com pico de GH ≥ 3,3 µg/L tratados com rhGH, apresentaram resposta de crescimento semelhante entre os diferentes grupos de secreção de GH, porém inferior ao grupo de pacientes com pico de GH < 3,3 µg/L (dados ainda não publicados). Este resultado sugere que neste último grupo realmente apenas a deficiência de GH seja responsável pelo déficit de crescimento.

7 Conclusões

Mutações no *GH1* causadoras da forma autossômica dominante de DIGH (Tipo II) não foram encontradas em nossa casuística de pacientes com BEI e pico de GH maior que 3,3 µg/L. Sendo pouco provável que pacientes com DIGH tipo II estejam sendo erroneamente classificados como BEI em nosso grupo.

A frequência de DIGH tipo II é menor em nossa população do que em outras populações estudadas com esta condição.

Mutações no *GH1* causadoras de uma proteína bioinativa não foram identificadas em nossos pacientes com BEI.

8 Referências

1. Silventoinen K, Kaprio J, Lahelma E, Koskenvuo M. Relative effect of genetic and environmental factors on body height: differences across birth cohorts among Finnish men and women. Am J Public Health. 2000 Apr;90(4):627-30.

2. Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE, Seeburg PH. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. Genomics. 1989 May;4(4):479-97.

3. Dastot F, Duquesnoy P, Sobrier ML, Goossens M, Amselem S. Evolutionary divergence of the truncated growth hormone receptor isoform in its ability to generate a soluble growth hormone binding protein. Mol Cell Endocrinol. 1998 Feb;137(1):79-84.

4. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. Science. 1992 Jan 17;255(5042):306-12.

5. Mullis PE. Genetic control of growth. Eur J Endocrinol. 2005 Jan;152(1):11-31.

6. Binder G, Keller E, Mix M, Massa GG, Stokvis-Brantsma WH, Wit JM, et al. Isolated GH deficiency with dominant inheritance: new mutations, new insights. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Aug;86(8):3877-81.

7. Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency-an update. Nat Rev Endocrinol. 2010 Oct;6(10):562-76.

8. Osorio MG, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, et al. Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Nov;87(11):5076-84.

9. 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 Res. 2003;59(5):229-33.

10. Society GR. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Nov;85(11):3990-3.

11. Rosenfeld RG, Albertsson-Wikland K, Cassorla F, Frasier SD, Hasegawa Y, Hintz RL, et al. Diagnostic controversy: the diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. J Clin Endocrinol Metab. 1995 May;80(5):1532-40.

12. Besson A, Salemi S, Deladoey J, Vuissoz JM, Eble A, Bidlingmaier M, et al. Short stature caused by a biologically inactive mutant growth hormone (GH-C53S). J Clin Endocrinol Metab. 2005 May;90(5):2493-9.

13. Horan M, Millar DS, Hedderich J, Lewis G, Newsway V, Mo N, et al. Human growth hormone 1 (GH1) gene expression: complex haplotype-dependent influence of polymorphic variation in the proximal promoter and locus control region. Hum Mutat. 2003 Apr;21(4):408-23.

14. Strobl JS, Thomas MJ. Human growth hormone. Pharmacol Rev. 1994 Mar;46(1):1-34.

15. Muller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. Physiol Rev. 1999 Apr;79(2):511-607.

16. Lim CT, Korbonits M. Paediatric endocrine aspects of ghrelin. Pediatr Endocrinol Rev. 2012 Mar;9(3):628-38.

17. Mannik J, Vaas P, Rull K, Teesalu P, Rebane T, Laan M. Differential expression profile of growth hormone/chorionic somatomammotropin genes in placenta of small- and large-for-gestational-age newborns. J Clin Endocrinol Metab. 2010 May;95(5):2433-42.

18. Esteban C, Audi L, Carrascosa A, Fernandez-Cancio M, Perez-Arroyo A, Ulied A, et al. Human growth hormone (GH1) gene polymorphism map in a normal-statured adult population. Clin Endocrinol (Oxf). 2007 Feb;66(2):258-68.

19. Giordano M, Marchetti C, Chiorboli E, Bona G, Momigliano Richiardi P. Evidence for gene conversion in the generation of extensive polymorphism in the promoter of the growth hormone gene. Hum Genet. 1997 Aug;100(2):249-55.

20. Giordano M, Godi M, Mellone S, Petri A, Vivenza D, Tiradani L, et al. A functional common polymorphism in the vitamin D-responsive element of the GH1 promoter contributes to isolated growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2008 Mar;93(3):1005-12.

21. Shewchuk BM, Asa SL, Cooke NE, Liebhaber SA. Pit-1 binding sites at the somatotrope-specific DNase I hypersensitive sites I, II of the human growth hormone locus control region are essential for in vivo hGH-N gene activation. J Biol Chem. 1999 Dec 10;274(50):35725-33.

22. DeNoto FM, Moore DD, Goodman HM. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. Nucleic Acids Res. 1981 Aug 11;9(15):3719-30.

23. Lecomte CM, Renard A, Martial JA. A new natural hGH variant 17.5 kDa produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. Nucleid Acids Res. 1987;15:6331-48.

24. Lewis UJ, Singh RN, Bonewald LF, Lewis LJ, Vanderlaan WP. Human growth hormone: additional members of the complex. Endocrinology. 1979 May;104(5):1256-65.

25. Stolar MW, Amburn K, Baumann G. Plasma "big" and "big-big" growth hormone (GH) in man: an oligomeric series composed of structurally diverse GH monomers. J Clin Endocrinol Metab. 1984 Aug;59(2):212-8.

26. Mannor DA, Winer LM, Shaw M, A., Baumann Cl. Plasma growth hormone binding proteins: effect on growth hormone binding to receptors and on growth hormone action. J Clin Endocrinol Metab. 1991;73:30-4.

27. Wells JA. Binding in the growth hormone receptor complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 9;93(1):1-6.

28. Herrington J, Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. Trends Endocrinol Metab. 2001 Aug;12(6):252-7.

29. 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 Res. 2001 Jun;11(3):137-65.

30. Saggese G, Ranke MB, Saenger P, Rosenfeld RG, Tanaka T, Chaussain JL, et al. Diagnosis and treatment of growth hormone deficiency in children and adolescents: towards a consensus. Ten years after the Availability of Recombinant Human Growth Hormone Workshop held in Pisa, Italy, 27-28 March 1998. Horm Res. 1998;50(6):320-40.

31. Ghigo E, Bellone J, Aimaretti G, Bellone S, Loche S, Cappa M, et al. Reliability of provocative tests to assess growth hormone secretory status. Study in 472 normally growing children. J Clin Endocrinol Metab. 1996 Sep;81(9):3323-7.

32. Jorge AA, Setian N, Sociedade Brasileira de Pediatria, Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Baixa etatura por deficiência do hormônio de crescimento: Diagnóstico. In: Jatene FB, Nobre MRC, Bernardo WM, editors. Projeto Diretrizes. 1 ed. Brasilia: Conselho Federal de Medicina; 2006. p. 15-27.

33. Binder G. Growth hormone deficiency: new approaches to the diagnosis. Pediatr Endocrinol Rev. 2011 Sep;9 Suppl 1:535-7.

34. de Graaff LC, Argente J, Veenma DC, Herrebout MA, Friesema EC, Uitterlinden AG, et al. Genetic screening of a Dutch population with isolated GH deficiency (IGHD). Clin Endocrinol (Oxf). 2009 May;70(5):742-50.

35. Hamid R, Phillips JA, 3rd, Holladay C, Cogan JD, Austin ED, Backeljauw PF, et al. A molecular basis for variation in clinical severity of isolated growth hormone deficiency type II. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Dec;94(12):4728-34.

36. Illig R. Growth hormone antibodies in patients treated with different preparations of human growth hormone (HGH). J Clin Endocrinol Metab. 1970 Dec;31(6):679-88.

37. Phillips JA, 3rd, Hjelle BL, Seeburg PH, Zachmann M. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Oct;78(10):6372-5.

38. Illig R, Zachmann M, Prader A. “A-type” isolated growth hormone deficiency (IGHD). Pediatric Research. 1981;15:1540-.

39. Hauffa BP, Illig R, Torresani T, Stolecke H, Phillips JA, 3rd. Discordant immune and growth response to pituitary and biosynthetic growth hormone in siblings with isolated growth hormone deficiency type IA. Acta Endocrinol (Copenh). 1989 Nov;121(5):609-14.

40. Phillips JA, Hjelle BL, Seeburg PH, Plotnick LP, Migeon CJ, Zachmann M. Heterogeneity in the molecular basis of familial growth hormone deficiency (IGHD). Am J Hum Genet. 1981;33:52.

41. Phillips JA. Inherited defects in growth hormone synthesis and action. . Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,. 1995 1995;II:3023–44.

42. Mullis PE. Prevalence of human growth hormone-1 gene deletions among patients with isolated growth hormone deficiency from different populations. Pediatr Res. 1992 May;31(5):532-4.

43. Parks JS, Meacham LR, McKean MC, Keret R, Josefsberg Z, Laron Z. Growth hormone gene deletion is the most common cause of severe GH deficiency among oriental Jewish children. Pediatr Res. 1989;25:90.

44. Kamijo T, Phillips JA, 3rd, Ogawa M, Yuan L, Shi Y, Bao XL. Screening for growth hormone gene deletions in patients with isolated growth hormone deficiency. J Pediatr. 1991 Feb;118(2):245-8.

45. Wagner JK, Eble A, Hindmarsh PC, Mullis PE. Prevalence of human GH-1 gene alterations in patients with isolated growth hormone deficiency. Pediatr Res. 1998 Jan;43(1):105-10.

46. Ruiz-Pacheco R, Chatelain P, Sizonenko PC, Bost M, Garandau P, Sultan C. Genetic and molecular analysis of familial isolated growth hormone deficiency. Hum Genet. 1993 Oct 1;92(3):273-81.

47. Igarashi Y, Ogawa M, Kamijo T, Iwatani N, Nishi Y, Kohno H, et al. A new mutation causing inherited growth hormone deficiency: a compound heterozygote of a 6.7 kb deletion and a two base deletion in the third exon of the GH-1 gene. Hum Mol Genet. 1993 Jul;2(7):1073-4.

48. Abdul-Latif H, Leiberman E, Brown MR, Carmi R, Parks JS. Growth hormone deficiency type IB caused by cryptic splicing of the GH-1 gene. J Pediatr Endocrinol Metab. 2000 Jan;13(1):21-8.

49. Mayo KE. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. Mol Endocrinol. 1992 Oct;6(10):1734-44.

50. Graves TK, Patel S, Dannies PS, Hinkle PM. Misfolded growth hormone causes fragmentation of the Golgi apparatus and disrupts endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic. J Cell Sci. 2001 Oct;114(Pt 20):3685-94.

51. Moseley CT, Mullis PE, Prince MA, Phillips JA, 3rd. An exon splice enhancer mutation causes autosomal dominant GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Feb;87(2):847-52.

52. Mullis PE, Deladoey J, Dannies PS. Molecular and cellular basis of isolated dominant-negative growth hormone deficiency, IGHD type II: insights on the secretory pathway of peptide hormones. Horm Res. 2002;58(2):53-66.

53. Ryther RC, Flynt AS, Harris BD, Phillips JA, 3rd, Patton JG. GH1 splicing is regulated by multiple enhancers whose mutation produces a dominant-negative GH isoform that can be degraded by allele-specific small interfering RNA (siRNA). Endocrinology. 2004 Jun;145(6):2988-96.

54. Deladoey J, Stocker P, Mullis PE. Autosomal dominant GH deficiency due to an Arg183His GH-1 gene mutation: clinical and molecular evidence of impaired regulated GH secretion. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Aug;86(8):3941-7.

55. Alatzoglou KS, Turton JP, Kelberman D, Clayton PE, Mehta A, Buchanan C, et al. Expanding the spectrum of mutations in GH1 and GHRHR: genetic screening in a large cohort of patients with congenital isolated growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Sep;94(9):3191-9.

56. 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 Metab. 2007 Nov;92(11):4387-93.

57. Procter AM, Phillips JA, 3rd, Cooper DN. The molecular genetics of growth hormone deficiency. Hum Genet. 1998 Sep;103(3):255-72.

58. Wagner JK, Eble A, Cogan JD, Prince MA, Phillips JA, 3rd, Mullis PE. Allelic variations in the human growth hormone-1 gene promoter of growth hormone-deficient patients and normal controls. Eur J Endocrinol. 1997 Nov;137(5):474-81.

59. Courtois SJ, Lafontaine DA, Lemaigre FP, Durviaux SM, Rousseau GG. Nuclear factor-I and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. Nucleic Acids Res 1990;18:57-64.

60. de Graaff LC, Argente J, van Meurs JB, Uitterlinden AG, Hokken-Koelega AC. Genetic polymorphisms in the locus control region and promoter of GH1 are related to serum IGF-I levels and height in patients with isolated growth hormone deficiency and healthy controls. Horm Res Paediatr. 2010;73(1):25-34.

61. Millar DS, Lewis MD, Horan M, Newsway V, Easter TE, Gregory JW, et al. Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. Hum Mutat. 2003 Apr;21(4):424-40.

62. Kowarski AA, Schneider J, Ben-Galim E, Weldon VV, Daughaday WH. Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. J Clin Endocrinol Metab. 1978 Aug;47(2):461-4.

63. Takahashi Y, Kaji H, Okimura Y, Goji K, Abe H, Chihara K. Brief report: short stature caused by a mutant growth hormone. N Engl J Med. 1996 Feb 15;334(7):432-6.

64. Takahashi Y, Shirono H, Arisaka O, Takahashi K, Yagi T, Koga J, et al. Biologically inactive growth hormone caused by an amino acid substitution. J Clin Invest. 1997 Sep 1;100(5):1159-65.

65. Petkovic V, Thevis M, Lochmatter D, Besson A, Eble A, Fluck CE, et al. GH mutant (R77C) in a pedigree presenting with the delay of growth and pubertal development: structural analysis of the mutant and evaluation of the biological activity. Eur J Endocrinol. 2007 Aug;157 Suppl 1:S67-74.

66. 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 Metab. 2010 Nov;95(11):E384-91.

67. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. Adv Data. 2000 Jun 8(314):1-27.

68. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. Arch Dis Child. 1966 Oct;41(219):454-71.

69. Fofanova OV, Evgrafov OV, Polyakov AV, Poltaraus AB, Peterkova VA, Dedov, II. A novel IVS2 -2A>T splicing mutation in the GH-1 gene in familial isolated growth hormone deficiency type II in the spectrum of other splicing mutations in the Russian population. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Feb;88(2):820-6.

70. Takahashi I, Takahashi T, Komatsu M, Sato T, Takada G. An exonic mutation of the GH-1 gene causing familial isolated growth hormone deficiency type II. Clin Genet. 2002 Mar;61(3):222-5.

71. Cogan JD, Ramel B, Lehto M, Phillips J, 3rd, Prince M, Blizzard RM, et al. A recurring dominant negative mutation causes autosomal dominant growth hormone deficiency--a clinical research center study. J Clin Endocrinol Metab. 1995 Dec;80(12):3591-5.

72. Fofanova OV, Evgrafov OV, Polyakov AV, Peterkova VA, Dedov, II. GH-1 gene splicing mutations: molecular basis of hereditary isolated growth hormone deficiency in children. Bull Exp Biol Med. 2006 Mar;141(3):347-52.

73. Missarelli C, Herrera L, Mericq V, Carvallo P. Two different 5' splice site mutations in the growth hormone gene causing autosomal dominant growth hormone deficiency. Hum Genet. 1997 Nov;101(1):113-7.

74. Phillips JA, 3rd, Cogan JD. Genetic basis of endocrine disease. 6. Molecular basis of familial human growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 1994 Jan;78(1):11-6.

75. Katsumata N, Matsuo S, Sato N, Tanaka T. A novel and de novo splice-donor site mutation in intron 3 of the GH-1 gene in a patient with isolated growth hormone deficiency. Growth Horm IGF Res. 2001 Dec;11(6):378-83.

76. Netchine I, Talon P, Dastot F, Vitaux F, Goossens M, Amselem S. Extensive phenotypic analysis of a family with growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Feb;83(2):432-6.

77. Binder G, Brown M, Parks JS. Mechanisms responsible for dominant expression of human growth hormone gene mutations. J Clin Endocrinol Metab. 1996 Nov;81(11):4047-50.