ANDRÉA DE CASTRO LEAL

Caracterização da insensibilidade ao fator de crescimento insulina-símile tipo 1 em pacientes com defeitos no receptor tipo 1 de IGFs (IGF-1R)

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

Programa de: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

SÃO PAULO

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Leal, Andréa de Castro

Caracterização da insensibilidade ao fator de crescimento insulina-símile tipo 1 em pacientes com defeitos no receptor tipo 1 de IGFs (IGF-1R) / Andréa de Castro Leal. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Alexandre Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Fatores de crescimento insulin-like 2.Receptor IGF tipo 1
3.Retardo do crescimento fetal 4.Transtornos do crescimento 5. Insuficiência de crescimento 6.Mutação

USP/FM/DBD-216/12

Este trabalho foi realizado na Unidade Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM 42) da disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Projeto temático 05/04726-0 e bolsa de doutorado direto 08/57915-2.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, David e Rosa Maria

Aos meus irmãos David André e Débora

Aos meus avós, José André, Maria e Hilda

Ao Tulio e ao nosso amado filho Daniel

Pelo amor que nos une

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois a sua onipresença nos fortalece e dignifica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, pela amizade, dedicação e, sobretudo, generosidade para com seus alunos e a todos que o cercam. Seu empenho em ensinar e alegria em aprender torna nosso trabalho mais leve e prazeroso. Muito obrigada.

À Prof. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos e pela presença constante em todas as etapas de nosso estudo.

Ao Prof. Dr. Ivo J. P. Arnhold, pelas sugestões sempre muito pertinentes, pelo incentivo e longanimidade.

À Prof. Dra. Ana Cláudia Latrônico, pelo otimismo e alegria contagiante e por sua admirável dedicação.

Às Prof. Dras. Elaine Costa, Maria Cândida Fragoso e Tania Bachega pelo apoio e carinho demonstrado desde o início desta tese.

À Dra. Regina Martin pelo incentivo constante e amizade.

À Dra. Lucuani de Carvalho, Dr. Madson Almeida e Prof. Dr. Carlos Longui pelas sugestões e contribuição na qualificação desta tese.

A todos os funcionários do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 pelos ensinamentos, paciência e dedicação em especial à Francinilda da Silva P. Oliveira (Nildinha), Cristina Rossi, Miriam Yumie Nishi, Maria Aparecida Medeiros (Cidinha), Luciane Bussmann, Fran, Érica e Andressa.

À Helena Valassi e Luciana Montenegro pelos ensinamentos, ajuda em momentos críticos na bancada e amizade.

À Débora Cabral Coutinho pelo incentivo, alegria e amizade. Esta tese é continuidade de seu trabalho que foi realizado com muito esmero e dedicação.

À Tamaya Castro Ribeiro e Renata Saito pela ajuda na realização de experimentos fundamentais para a conclusão desta tese.

Aos queridos amigos de pós-graduação por dividirmos momentos de descontração e de amizade: Alexsandra, Aline Otto, Adriana, Ana Canton, Andria, Fernanda, Renata, Gabriela, Marcela, Luciana Brito, Guilherme, Beatriz, Daiane e Laura.

Aos meus pais pelo apoio às escolhas que faço e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus sogros, Maria da Graça e Antônio, pelo carinho e ajuda com o nosso pequeno Daniel.

Ao Tulio pelo companheirismo, cumplicidade e pelo maravilhoso presente que é nosso filho Daniel.

Ao Daniel pela sua inocência e alegria cativante que transforma e faz crescer nosso amor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Aos pacientes pela sua contribuição valiosa a este trabalho.

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

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

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

São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Receptor 1 da IGF (IGF-1R): do gene à proteína	4
1.2	Mutações no gene do IGF1R	8
1.3	Características fenotípicas e clínicas dos carreadores das mutações no IGF1R	14
1.4	Resultados prévios que motivaram o presente estudo	16
1.4.1	Descrição das mutações no IGF1R	17
1.4.2	Descrição analítica da expressão do IGF1R	19
2	OBJETIVOS	21
3	MÉTODOS	33
3.1	Considerações éticas	24
3.2	Casuística	24
3.3	Descrição dos pacientes selecionados	25
3.3.1	Paciente SGA1	25
3.3.2	Paciente SGA2	28
3.3.3	Paciente SGA3	30
3.3.4	Paciente SGA4	32
3.4	Metodologia experimental empregada	36
3.4.1	Preparação das amostras	36

3.4.2	Avaliação do efeito proliferativo	38
3.4.3	Análise da expressão do IGF1R em linhagens de fibroblastos.....	40
3.4.4	Análise do conteúdo do IGF-1R nas linhagens estudadas	40
3.4.5	Avaliação da via de sinalização do IGF-1	41
3.4.6	Avaliação da localização sub intracelular do IGF-1R.....	43
3.4.7	Avaliação da localização na superfície celular do IGF1R.....	44
3.5	Análises estatísticas	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Avaliação do efeito proliferativo	47
4.2	Avaliação da expressão e conteúdo de IGF-1R	48
4.3	Avaliação da via de sinalização do IGF-1	51
4.4	Avaliação da localização celular do IGF-1R	54
5	DISCUSSÃO	58
5.1	Análise da linhagem SGA1	59
5.2	Análise da linhagem SGA2	62
5.3.	Análise das linhagens SGA3 e SGA4.....	64
5.4	Avaliação clínica dos pacientes com mutação e diminuição da expressão do IGF1R.....	65
6	CONCLUSÕES	69
7	ANEXOS	70
8	REFERÊNCIAS	76
9	APÊNDICE	

LISTAS

ABREVIATURAS

AIG	adequado para idade gestacional
aGnRH	análogo do hormônio liberador de gonadotrofina
AKT	serina/tirosina quinase
C1	controle 1
C2	controle 2
CN	comprimento ao nascimento
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPM	desenvolvimento neuropsicomotor
ERK	quinases extracelulares sinalizadoras
F	Feminino
GDP	guanosina difosfato
GH	hormônio do crescimento
GHr	receptor do hormônio do crescimento
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	guanosina trifosfato
rhGH	hormônio de crescimento recombinante humano
IGF-1R	receptor do fator de crescimento insulina-símile tipo 1
IGF-1	fator de crescimento insulina-símile 1
IGF-2	fator de crescimento insulina-símile 2
IGFs	fatores de crescimento insulina-símile
IgG	imunoglobulina G
IMC	índice de massa corporal

IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
JNK:	<i>Jun kinase</i>
KO	nocaute
M	masculino
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	<i>mitogen extracellular kinase</i>
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MTS	composto de tretrazolium
NADP	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
N.D.	não disponível
p85 e p110	<i>subunidades 85 e 110 da phosphatidyl inositol 3 kinase</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>
PH	<i>pleckstrin homology domain</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PI3K	<i>fosfatidilinositol 3 quinase</i>
PIG	pequeno para a idade gestacional
PN	peso ao nascimento
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>
pY	tirosina fosforilada
PES	reagente de ligação de elétrons
QI	coeficiente de inteligência
RAF	<i>murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
RAS	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RCIU	retardo de crescimento intra-uterino

RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SFM	meio livre de hormônios
SHC	<i>Src homology collagen</i>
SHP	<i>Src homology phosphatase</i>
SNC	sistema nervoso central
SOS 1	<i>son of sevenless 1</i>
TTOG	teste de tolerância oral à glicose

SÍMBOLOS

cm/ano	centímetros por ano
cm ²	centímetros quadrados
cm	centímetros
g	gramas
kb	quilobase
kDa	quilodalton
mg/L	miligramas por litro
mg/dL	miligramas por decilitro
mm	milímetros
ng/mL	nanogramas por mililitros
rpm	rotações por minuto
µg/kg/dia	microgramas por quilo por dia
µg/L	microgramas por litro
µU/mL	microunidades por mililitro
U/Kg/dia	unidades por quilo por dia

FIGURAS

Figura 1 –Estrutura do IGF-1R	05
Figura 2 –Transdução do sinal do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1).....	07
Figura 3 – Fluxograma esquematizando a estratégia de estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo.....	17
Figura 4 – Alinhamento do <i>IGF1R</i> de diversas espécies mostrando que o aminoácido glicina na posição 6 é bem conservado.....	18
Figura 5 – Alinhamento do <i>IGF1R</i> de diversas espécies, mostrando que o aminoácido arginina na posição 511 é bem conservado entre estas.....	18
Figura 6 –Análise da expressão do <i>IGF1R</i>	20
Figura 7 –Gráfico de crescimento do paciente <i>SGA1</i>	26
Figura 8 –Heredrograma da família com a mutação p.Arg511Trp.....	27
Figura 9 –Gráfico de crescimento do paciente <i>SGA2</i>	29
Figura 10 – Heredrograma da família com a mutação p.Gly6Arg.....	30
Figura 11 – Gráfico de crescimento do paciente <i>SGA3</i>	32
Figura 12 – Gráfico de crescimento do paciente <i>SGA4</i>	34
Figura 13 – Desenvolvimento das linhagens de fibroblastos	37
Figura 14 –Esquema do ensaio de proliferação.	39
Figura 15 –Resposta proliferativa dos fibroblastos dos pacientes e controle frente ao estímulo com doses crescentes de IGF-1 (10, 25 e 50 ng/mL) por 72 horas em relação às células não tratadas.....	49
Figura 16 –Análise da expressão do <i>IGF1R</i>	50
Figura 17 –Avaliação do conteúdo de IGF1-R nas linhagens celulares dos pacientes PIG (<i>SGA1</i> , <i>SGA2</i> , <i>SGA3</i> e <i>SGA4</i>) e	

controles (C1 e C2) através de <i>imunoblot</i> de extrato de proteína intracelular.....	51
Figura 18 – Efeito da ação do IGF-1 em cultura de fibroblastos sobre a fosforilação de AKT (Ser473) nas linhagens SGA2, SGA3, SGA4 e controles.....	53
Figura 19 – Avaliação da via PI3K após estímulo com IGF-1	54
Figura 20 – Avaliação da localização celular do IGF-1R.	56
Figura 21 –Expressão na superfície celular do IGF-1R obtida pela média dos ensaios de citometria de fluxo.....	58
Figura 22 –Imagem representativa da distribuição dos domínios nas subunidades α e β e a localização aproximada das pontes dissulfídicas α - α e α - β no dímero IGF-R.....	61
Figura 23 – Representação esquemática da região amino-terminal do pré-pró-IGF-1R, ilustrando o peptídeo sinal e o sítio de clivagem	64

TABELAS

Tabela 1 – Dados clínicos e laboratoriais das nove famílias com mutação em heterozigose do <i>IGF1R</i>	12
Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes selecionados para os estudos <i>in vitro</i>	35

RESUMO

Leal AC. *Caracterização da insensibilidade ao fator de crescimento insulina-símile tipo 1 em pacientes com defeitos no receptor tipo 1 de IGFs (IGF-1R)*[tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012:84p.

Introdução: Crianças nascidas pequenas para a idade gestacional (PIG) apresentam maior risco de permanecerem com baixa estatura na vida adulta. Os fatores de crescimento insulino-símile tipo 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) são os principais fatores endócrinos determinantes do crescimento fetal. A maioria das ações conhecidas destes hormônios é mediada via um receptor tirosina quinase, conhecido como IGF-1R. As mutações inativadoras e deleções do gene do *IGF1R* em heterozigose vêm sendo relatadas de forma crescente nos últimos 9 anos em pacientes com história de déficit de crescimento pré e pós-natal. Postula-se que pelo menos 2 a 3% das crianças nascidas PIG poderiam apresentar defeitos no *IGF1R*. O quadro clínico destes pacientes apresenta grande variabilidade quanto à gravidade do retardo de crescimento pré- e pós-natal e aos parâmetros hormonais.

Objetivo: Caracterizar *in vitro* a resistência ao IGF-1 de pacientes com defeitos no *IGF1R*, identificados em nosso ambulatório.

Material e métodos: Desenvolvemos cultura de fibroblastos de 2 controles (C1 e C2) e de 4 pacientes nascidos PIG (SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4) com suspeita de insensibilidade ao IGF-1 por ausência de recuperação do crescimento na vida pós natal. Destes pacientes, um paciente (SGA1) era portador de mutação missense em heterozigose no gene *IGF1R* (p.Arg511Trp) e os demais apresentavam baixa expressão dos *IGF1R* em leucócitos periféricos quando avaliados por PCR em tempo real. Um destes pacientes (SGA2) apresentava também a variante alélica p.Gly6Arg do *IGF1R* em heterozigose, alteração esta encontrada também em controles e familiares sem déficit de crescimento. As ações do IGF-1 foram determinadas por ensaios de proliferação, análise da expressão do IGF-1R e estudos de fosforilação de proteínas da via de sinalização do IGF-1 em fibroblastos (via PI3K). **Resultados:** As linhagens SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4 proliferaram respectivamente 55%, 66%, 64% e 28% a menos sob estímulo de IGF-1 em relação às linhagens controles. No estudo da expressão do RNAm do *IGF1R* por PCR em tempo real, foi observada redução na expressão do *IGF1R* nas linhagens SGA2, SGA3 e SGA4 em relação aos controles, assim como o conteúdo total da proteína IGF-1R. Por outro lado, a linhagem SGA1 mostrou expressão aumentada do *IGF1R* e no conteúdo da proteína em relação aos controles. Em relação à ativação da via PI3K, todas as linhagens dos pacientes apresentaram menor fosforilação de AKT após estímulo com IGF-1, quando comparadas com as linhagens controles. **Conclusão:** Demonstramos a presença de insensibilidade parcial ao IGF-1 nas linhagens estudadas. A baixa expressão do *IGF1R* observada em leucócitos periféricos nas linhagens SGA2, SGA3 e SGA4 foi confirmada em fibroblastos tanto em nível de RNAm quanto da sua proteína. Nestas linhagens a insensibilidade ao IGF-1 é secundária a diminuição da expressão deste receptor. Em

contraste a na linhagem com a mutação p.Arg511Trp (SGA1) observou-se expressão normal do IGF-1R na superfície celular. Pacientes com alterações no gene *IGF1R* não apresentam um fenótipo característico que os diferencie de outras crianças nascidas PIG sem alterações neste gene, mostrando a importância dos estudos moleculares neste grupo de pacientes.

Descritores: 1.Fatores de Crescimento Insulin-Like I 2.Receptor IGF Tipo 13.Retardo do Crescimento Fetal 4.Transtornos do Crescimento 5.Insuficiência de Crescimento 6.Mutação

SUMMARY

Leal AC. *Characterization of an insensitivity to type 1 insulin-like growth factor in patients with defects in the type 1 IGF receptor (IGF-1R)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 84p.

Small for gestational age (SGA) children are at a greater risk of having a short stature in adulthood. The type 1 and 2 insulin-like growth factors (IGF-1 and IGF-2) are the main endocrine factors determining fetal growth, and most of the known actions of these hormones are mediated via a receptor tyrosine kinase, IGF-1R. Inactivating mutations and deletions of the *IGF1R* gene in heterozygosis have been reported with increasing frequency in the last 9 years in patients with a history of a failure to thrive pre- and postnatally. It is postulated that at least 2-3% of the children born SGA could be defective for the *IGF1R*. The clinical presentation of these patients is highly variable with regard to the severity of growth retardation and pre- and post-natal hormonal parameters. **Objectives:** The goal of this study was to identify the *in vitro* insensitivity to IGF-1 in patients with defects in *IGF1R*. **Methods:** We developed fibroblast cultures from two controls (C1 and C2) and 4 patients born SGA (SGA1, SGA2, SGA3 and SGA4) with a suspected insensitivity to IGF-1 by the absence of catch-up growth during their postnatal life. Of these patients, one (SGA1) carried a heterozygous missense mutation in the *IGF1R* gene (p.Arg511Trp), and the others exhibited low expression levels of *IGF1R* in their peripheral leukocytes, as evaluated using real-time PCR. One of these patients (SGA2) was also heterozygous for the allelic variant p.Gly6Arg of *IGF1R*, an alteration also found in the controls and family members not displaying growth restriction. The actions of IGF-1 were determined using proliferation assays, an analysis of the expression of IGF-1R and phosphorylation studies of proteins of the IGF-1 signaling pathway in fibroblasts (via PI3K). **Results:** The SGA1, SGA2, SGA3 and SGA4 fibroblasts proliferated 55%, 66%, 64% and 28%, respectively, less under the stimulation of IGF-1 compared to the control lines. Using real-time PCR, the *IGF1R* mRNA expression showed reduced levels of *IGF1R* in the SGA2, SGA3 and SGA4 cells compared to the controls, and the total IGF-1R protein was also decreased in these cells. Moreover, the SGA1 cells showed increased expression levels of *IGF1R* mRNA and protein compared to the controls. In relation to the activation of PI3K, all of the cells showed decreased phosphorylation of AKT after the stimulation with IGF-1 compared to the control cells. **Conclusion:** We demonstrated the presence of a partial insensitivity to IGF-1 in the studied samples. The low expression of *IGF1R* observed in the peripheral leukocytes in the SGA2, SGA3 and SGA4 fibroblasts was confirmed at both the mRNA and protein levels, and the

insensitivity of the cells to IGF-1 is secondary to the decreased expression of the receptor. In contrast, the cells with the mutation p.Arg511Trp (SGA1) displayed normal IGF-1R expression on the cell surface. The patients with alterations in the *IGF1R* gene do not exhibit a characteristic phenotype that differentiates them from other children born SGA and with no changes in this gene, thus showing the importance of molecular studies for this group of patients.

Descriptors: 1. Insulin-Like Growth Factors I 2. Receptor, IGF Type 1 3. Fetal Growth Retardation 4. Growth Disorders 5. Failure to Thrive 6. Mutation

1 INTRODUÇÃO

A fisiologia do crescimento pré-natal difere consideravelmente daquela do crescimento pós-natal. O hormônio do crescimento (GH, *growth hormone*) e o fator de crescimento insulina-símile tipo 1 (IGF-1, *insulin-like growth factor 1*) compõem o principal sistema endócrino regulador do crescimento linear durante a infância. Entretanto, na vida pré-natal, o GH exerce pouco efeito sobre o crescimento fetal ^[1]. Nesta fase o IGF-1 e o fator de crescimento insulina-símile tipo 2 (IGF-2, *insulin-like growth factor 2*), de maneira independente da secreção de GH, são os principais fatores endócrinos determinantes do crescimento. Os efeitos biológicos destes IGFs são mediados pelo receptor de IGF tipo 1 (IGF-1R) durante todas as fases da vida ^[2].

Aproximadamente 20% das crianças com baixa estatura apresentaram retardo do crescimento intra-uterino (RCIU) ^[3]. O termo RCIU refere-se ao crescimento fetal atenuado e, frequentemente, resulta no nascimento de uma criança pequena para idade gestacional (PIG) ^[4, 5]. A maioria das crianças nascidas PIG apresenta recuperação espontânea do crescimento na vida pós-natal, com normalização da sua estatura ao redor do segundo ano de vida. Entretanto, 10% a 15% de crianças nascidas PIG permanecem baixas, apresentando escore Z da altura inferior a -2. As causas desse

*déficit*de crescimento pré-natal e a sua manutenção após o nascimento ainda não são completamente conhecidas [3, 4, 6].

O envolvimento do sistema IGFs/IGF-1R, como causa genética da baixa estatura em crianças nascidas PIG, foi comprovada em 1996 por *Woods e cols.* que descreveram o primeiro paciente com defeito no gene *IGF1*. O paciente apresentava deleção em homozigose dos exons 4 e 5 deste gene [1]. Posteriormente, em 2003, *Bonapace e cols.* descreveram um paciente que apresentava uma troca de T→A na região 3' não traduzida do exon 6 do *IGF1* (região reguladora do processo de poliadenilação) [7]. Entretanto, este achado foi descrito pelo nosso grupo em indivíduos controles [8]. Em 2005, *Walenkamp e cols.* identificaram uma mutação em homozigose causadora da troca do aminoácido valina por metionina na posição 92 da proteína do IGF-1 (c.274 G>A, p.Val92Met), levando à formação de uma molécula biologicamente inativa [9]. Recentemente, foi descrita mutação homozigota *missense*, que causa a troca do aminoácido arginina por glutamina na posição 84 (c.251 G>A, p.Arg84Gln), ocasionando prejuízo de sua ligação ao receptor IGF-1R [10]. Dos quatro pacientes descritos, três apresentavam características comuns: baixo peso e comprimento ao nascimento, baixa estatura importante na idade adulta, microcefalia, micrognatia, surdez neurosensorial e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) [1, 7, 9]. O quarto paciente apresentava quadro clínico menos grave [10]. Laboratorialmente, todos estes pacientes apresentavam valores normais ou elevados de GH, com concentrações de IGF-1 indetectáveis, nos casos de mutações que

causavam deficiência de IGF-1, ou elevado, no caso do paciente com IGF-1 biologicamente inativo. Apesar destas descrições isoladas, defeitos no IGF-1 são causas raras de RCIU [8].

Em contraste, mutações inativadoras e deleções do gene do *IGF1R* em heterozigose vêm sendo relatadas de forma crescente, nos últimos 9 anos, em pacientes com história de déficit de crescimento pré e pós-natal [11-18]. Postula-se que pelo menos 2 a 3% das crianças nascidas PIG poderiam apresentar defeitos no *IGF1R*^[12]. O quadro clínico destes pacientes apresenta grande variabilidade quanto à gravidade do retardo de crescimento pré- e pós-natal e aos parâmetros hormonais. A presente tese tem como objetivo a caracterização *in vitro* da resistência ao IGF-1 de pacientes com defeitos no *IGF1R*, identificados em nosso ambulatório.

1.1 Receptor 1 da IGF (IGF-1R): do gene à proteína

O IGF-1R humano é codificado por um único gene (*IGF1R*, NM_147370), com tamanho de 307 quilobases e organizado em 21 exons. Este gene localiza-se na região distal do braço longo do cromossomo 15, posição 25-26 (15q25-26), e possui um único sítio de início de transcrição [19]. Os exons 1 a 11 codificam a região 5' não traduzida, o peptídeo sinal e a subunidade α , enquanto que os exons 12 a 21 codificam a subunidade β do *IGF1R* (Figura 1). O exon 14 codifica a porção transmembrânica do receptor, enquanto que os exons 16 a 21 codificam o domínio tirosina-quinase intracelular. O final do exon 21 codifica ainda a região 3' não traduzida. O

sítio de clivagem é codificado pelo exon 11 e, nesta região, o pró-IGF-1R é clivado em subunidades α e β (Figura 1). O *IGF1R* possui dois transcritos resultantes de um “splice” alternativo no exon 14 (região codificadora da porção extracelular da subunidade β): o primeiro transcrito corresponde à sequência íntegra de cDNA; o segundo difere do primeiro pela perda de três nucleotídeos (CAG) a partir da posição 2829 do cDNA^[19].

Figura 1 –Organização do gene *IGF1R*. Os exons são representados pelas barras preenchidas e os introns pelas em branco. Cada estrutura principal da proteína IGF-1R encontra-se indicada em relação ao exon correspondente.

O IGF-1R é sintetizado como um peptídeo de cadeia única (pré-pró-receptor), incluindo os 30 resíduos do peptídeo sinal e o sítio de clivagem (Arg₇₀₈ – Lys₇₀₉ – Arg₇₁₀ – Arg₇₁₁). Durante a sua transferência para o retículo endoplasmático, ocorre a retirada dos 30 resíduos do peptídeo sinal formando o pró-IGF-1R. Os monômeros de pró-receptor sofrem modificações pós-traducionais com o adequado enovelamento da proteína e formação de pontes dissulfídicas. Após a amino glicosilação, são transportados para o complexo de Golgi. No interior desta organela, a

maturação do pró-receptor é completada por glicosilação terminal e clivagem do prореceptor pela protease furina, resultando na glicoproteína heterotetramérica $\alpha 2\beta 2$ madura ^[20]. Todo este processo é essencial para que o receptor maduro possa ser transportado à superfície celular a fim de exercer suas funções biológicas.

O IGF-1R é uma glicoproteína transmembrânica que se liga com maior afinidade ao IGF-1 e com menor afinidade ao IGF-2 e à insulina. Estruturalmente, é semelhante ao receptor de insulina, com aproximadamente 50% de homologia na sequência de aminoácidos. Ambos são receptores tirosina quinase, compostos de duas subunidades α extracelulares, contendo um sítio de ligação ao ligante e duas subunidades β intracelulares com atividade tirosina quinase intrínseca ^[21]. Enquanto o receptor de insulina confere preferencialmente sinalização que mantém a homeostase metabólica, o IGF-1R tem seu principal papel na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular, regulando, desta forma, o crescimento longitudinal e do organismo.

A ligação do IGF-1 ao seu receptor promove a ativação da sua atividade tirosina quinase intrínseca, resultando na autofosforilação em sítios de tirosina. Por sua vez, as tirosinas fosforiladas (pY) servem como sítios acopladores de proteínas intracitoplasmáticas, que contêm domínios de reconhecimento destas pY, conhecidos como domínios SH2 (Figura 2). A principal proteína ativada pelo IGF-1R é o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1, *insulin receptor substrate 1*), uma fosfoproteína hidrofílica que pode recrutar e regular a atividade de outras proteínas intracelulares. A IRS-1

funciona como molécula adaptadora, ativando cascatas de sinalização associadas a receptores tirosino quinases. Uma das principais vias de sinalização do IGF-1R é a via denominada proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*), responsável principalmente pelos efeitos proliferativos das IGFs [22]. Outra via de sinalização do IGF-1R ocorre por ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3K, *Phosphatidylinositol 3-kinase*), responsável pelos principais efeitos metabólicos estimulados pelas IGFs, como a captação de glicose via GLUT4 e a síntese de glicogênio, efeitos idênticos aos promovidos pela insulina ao se ligar ao seu receptor [23].

Figura 2 –Transdução do sinal do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1).

1.2 Mutações no gene do *IGF1R*

As primeiras mutações no gene *IGF1R* foram descritas em 2003, por *Abuzzahab e cols.*^[11]. Nestes últimos 9 anos, onze famílias (34 indivíduos) foram descritas na literatura com mutações neste gene. Destes 34 indivíduos, 10 apresentavam mutação *nonsense* e 24 apresentam mutações *missense*, quase todas em heterozigose simples, excetuando três pacientes com duas mutações *missense* em heterozigose composta (Tabela 1). Além destas mutações de ponto, diversos relatos de pacientes com deleções completas do *IGF1R*, algumas secundárias a aberrações cromossômicas, foram relatadas neste período^[12].

Foram duas as mutações descritas por *Abuzzahab e cols.*^[11]: a primeira em heterozigose composta no exon 2, com a troca de arginina por glutamina no aminoácido 138 (p.Arg138Gln) e troca de lisina por asparagina no aminoácido 145 (p.Lys145Asn). Em conjunto, estas alterações levaram à menor afinidade de ligação do IGF-1 pelo IGF-1R, causando redução na ativação do receptor. A segunda mutação era em heterozigose simples, no exon 2, com a troca de arginina por um códon de parada prematura (*stop codon*) no aminoácido 89 (p.Arg89X), ocasionando proteína truncada sem função^[11, 15].

Em 2005, *Kawashima e cols.* descreveram mutação em heterozigose no exon 11 do *IGF1R*, havendo troca de arginina por glutamina no aminoácido 739 (p.Arg739Gln)^[14]. Esta alteração leva à diminuição do

processamento do pro IGF-1R para IGF-1R, por alterar o sítio de clivagem entre as sub-unidades α e β . A mutação p.Arg511Gln, descrita por Inagaki em 2007, resulta na troca da arginina por glutamina no códon 511 da proteína ^[13]. Esse resíduo corresponde ao domínio N-terminal da fibronectina tipo III do IGF-1R, localizado próximo à primeira ponte dissulfídica entre as duas subunidades α . Os estudos funcionais destas mutações demonstraram que não havia prejuízo na afinidade do receptor pelo IGF-1; contudo, evidenciou-se diminuição da auto-fosforilação do IGF-1R mutado e da síntese de DNA estimulada pelo IGF-1 nas linhagens de fibroblastos obtidos dos pacientes com as mutações. Estas evidências corroboram com a hipótese de que a alteração conformacional e na estrutura do receptor prejudica a transdução do sinal após sua ligação ao IGF-1.

Walenkamp e cols. descreveram mutação no exon 16 do gene *IGF1R*, em 2006, conduzindo à troca de ácido glutâmico por lisina na posição 1050 da proteína (p.Glu1050Lys) ^[9]. A mutação p.Gly1155Ala foi descrita por *Kruis e cols.*, em 2010, encontra-se localizada no exon 19, havendo troca da glicina pela alalina no códon 1155 ^[17]. Ambas as mutações ocorrem no resíduo de aminoácido altamente conservado, localizado no domínio tirosina quinase intracelular, ocasionando menor auto-fosforilação do receptor mutado e, conseqüentemente, redução na ativação da via MAPK e PI3K. Contudo, a expressão do IGF-1R e sua afinidade ao ligante não ficaram comprometidas.

Wallborn e cols., em 2010, descreveram mutação do gene *IGF1R*, levando à troca de timina por adenina na posição 1886. Esta situação

resultou na mudança do aminoácido valina pelo ácido glutâmico no códon 629 da proteína (p.Val629Glu) ^[18]. Através de estudos funcionais, demonstrou-se importante prejuízo na fosforilação do IGF-1R, na via de sinalização da PI3K e na expressão do IGF-1R na superfície celular. Igualmente, foi observado acúmulo do pró-IGF-1R no retículo endoplasmático. Através destes achados, pode-se afirmar que esta mutação interfere no tráfego do IGF-1R e, conseqüentemente, compromete o processamento de seu pró-receptor e a sua localização na superfície celular.

Fang e cols. descreveram duplicação de 19 nucleotídeos em heterozigose no exon 18 do *IGF1R*, ocasionando a mudança no código de leitura (*frameshift*) e a formação de códon de parada prematuro (p.Gly1122fsX1136) ^[24]. O mesmo grupo descreveu recentemente um paciente com mutação em heterozigose composta (p.Glu121Lys/p.Glu234Lys) em outro paciente com retardo de crescimento grave de início pré-natal. Estudos *in vitro* demonstraram que ambas as mutações ocasionam uma retenção intracelular do peptídeo formado resultando em uma baixa expressão do receptor maduro na superfície celular ^[25].

A mutação p.Tyr387X foi descrita por *Mohn e cols.*, tratando-se de troca de timina por adenina em heterozigose na posição 1161, resultando na formação do códon de parada na posição 387. O receptor truncado não possui os domínios de fibronectina, tanto na subunidade α , quanto na β , levando à perda de sua ancoragem na membrana plasmática ^[26]. Estas mutações resultam na diminuição da proteína IGF-1R e conseqüente

diminuição da ativação da via de sinalização do IGF-1R, através do mecanismo de decaimento do RNA mensageiro (*nonsense-mediated mRNA decay*) [24, 26]. A mais recente mutação encontrada foi descrita por *Kawashima e cols.* e trata-se de uma mutação missense em heterozigose no domínio L2 do IGF-1R (p.Arg431Leu) que ocasiona menor ativação do receptor quando ligado pelo IGF-1 [27].

Em resumo, todas as mutações demonstraram diminuição substancial na autofosforilação da subunidade β do IGF-1R, acompanhada por redução na ativação de pelo menos uma das duas principais vias de sinalização. Em alguns casos, estes resultados foram reforçados por estudos que demonstraram diminuição da proliferação de fibroblastos dos pacientes. Além do fenômeno de haploinsuficiência, algumas mutações do *IGF1R* podem apresentar efeito dominante negativo, apesar deste mecanismo ainda não ter sido completamente caracterizado nos estudos existentes [13].

Tabela 1 –Dados clínicos e laboratoriais das onze famílias com mutação heterozigota do *IGF1R*

Família	Pacient e	Mutação	Ao Nascimento		Microcefali a	Atraso no DNPM	Z de Altura	Avaliação Hormonal			Referência
			Z do Peso	Z do Comprimento				IGF-1	IGFBP-3	Pico de GH (µg/L)	
1A	Índice	p.Arg138Gln/ Lys145Asn	-3,5	N.D.	N.D.	Sim	-4.8 ¹	Normal	Elevado	51	[11]
1B	Mãe	p.Lys145Asn	-2,0	N.D.	N.D.	N.D.	-1.6 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[11]
1C	Pai	p.Arg138Gln	-2,0	N.D.	N.D.	N.D.	-2.8 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[11]
2A	Índice	p.Arg89X	-3,5	-5.8	Sim	Sim	-2.6 ¹	Normal	Normal	5.7	[11, 15]
2B	Irmão	p.Arg89X	-2,7	-2.1	Sim	Sim	-3,2 ¹	Normal	Normal	9.8	[11, 15]
2C	Mãe	p.Arg89X	-2,6	-1.6	Não	N.D.	-2.6 ²	Normal	N.D.	N.D.	[11, 15]
3A	Índice	p.Arg739Gln	-1,5	-1.0	N.D.	Sim	-2.1 ¹	Normal	Normal	N.D.	[14]
3B	Mãe	p.Arg739Gln	-1,6	N.D.	N.D.	N.D.	-2.9 ²	Normal	Normal	N.D.	[14]
4A	Mãe	p.Glu1050Lys	-2,1	-0.3	Sim	Não	-4.0 ²	Normal	Normal	20	[16]
4B	Filha	p.Glu1050Lys	-3,3	-4.2	Sim	Sim	-2.3 ¹	Elevado	Normal	74	[16]
5A	Índice	p.Arg511Gln	-4,9	-3.1	N.D.	Não	-5,0 ¹	Elevado	Elevado	10.6	[13]
5B	Tia	p.Arg511Gln	N.D.	N.D.	N.D.	Não	-5.0 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[13]
6A	Índice	p.Gly1155Ala	-1,8	-1.8	Sim	Não	-3.3 ¹	Normal	Normal	21	[17]
6B	irmão	p.Gly1155Ala	-1,9	N.D.	Não	N.D.	-2.3 ¹	N.D.	N.D.	N.D.	[17]
6C	Mãe	p.Gly1155Ala	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-3.9 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[17]
6D	Tio	p.Gly1155Ala	-2,2	-1.4	Não	N.D.	-1.6 ¹	N.D.	N.D.	N.D.	[17]
6E	Avô	p.Gly1155Ala	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-2.8 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[17]
6F	Prima	p.Gly1155Ala	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-2.8 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[17]
6G	Prima	p.Gly1155Ala	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-2.5 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[17]

N.D.: Não disponível. 1 – na infância. 2 – na vida adulta.

(continua)

(continuação)

Tabela 1 –Dados clínicos e laboratoriais das onze famílias com mutação heterozigota do *IGF1R*

Família	Paciente	Mutação	Ao Nascimento		Microcefalia	Atraso no DNPM	Z de Altura	Avaliação Hormonal			Referência
			Z do Peso	Z do Comprimento				IGF-1	IGFBP-3	Pico de GH (µg/L)	
7 ^a	Índice	p.Val629Glu	-2,2	-1,8	Sim	Sim	-2,1 ¹	Elevado	Normal	N.D.	[18]
7B	Mãe	p.Val629Glu	-2,2	-2,3	Sim	N.D.	-3,3 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[18]
8 ^a	Índice	c.3348_3366 dup19	-2,2	-0,6	Sim	Não	-3,6 ¹	Normal	Normal	9,1	[24]
8B	Mãe	c.3348_3366 dup19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-4,6 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[24]
8C	Irmã	c.3348_3366 dup19	-3,8	N.D.	N.D.	N.D.	-1,9 ¹	N.D.	N.D.	N.D.	[24]
9A	Índice	p.Tyr387X	-2,0	-3,1	Não	Não	-4,9 ²	+1,0	N.D.	13,5	[26]
9B	Irmã	p.Tyr387X	-1,7	-2,9	N.D.	Não	-1,8 ²	+1,1	N.D.	N.D.	[26]
9C	Tia	p.Tyr387X	-1,9	-1,8	N.D.	Não	-2,8 ²	-0,9	N.D.	N.D.	[26]
	paterna										
9D	Tia	p.Tyr387X	-2,4	-2,3	N.D.	Não	-3,2 ²	+0,2	N.D.	N.D.	[26]
	paterna										
10A	Índice	p.Glu121Lys/ Glu234Lys	-2,8	-3,5	Sim	Sim	-5,9 ¹	elevado	normal	>16	[25]
10B	irmã	p.Glu121Lys/ Glu234Lys	-3,2	-0,8	N.D.	Sim	-3,4 ¹	elevado	elevado	N.D.	[25]
10C	mãe	p.Glu121Lys	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-1,2 ²	normal	normal	N.D.	[25]
10D	pai	p.Glu234Lys	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-1,5 ²	normal	normal	N.D.	[25]
11A	Índice	p.Arg431Leu	-1,8	-3,2	Sim	Não	-2,7 ¹	+1	N.D.	37,4	[27]
11B	mãe	p.Arg431Leu	-1,7	-1,2	N.D.	N.D.	-1,2 ²	N.D.	N.D.	N.D.	[27]

N.D.: Não disponível. ¹ – na infância. ² – na vida adulta.

1.3 Características fenotípicas e clínicas dos carreadores das mutações no *IGF1R*

Todos pacientes com a mutação no *IGF1R* apresentavam peso e/ou comprimento de nascimento abaixo do normal ou no limite inferior da normalidade, observando-se segregação das mutações com o fenótipo de baixa estatura nas várias famílias estudadas. Além disto, a estatura na infância e idade adulta apresentou grande variabilidade entre os casos descritos, mesmo dentro da mesma família (Tabela 2). Nas crianças foi observado, em praticamente todos os casos, atraso na idade óssea ao redor de 1 ano em relação à idade cronológica. A puberdade atrasada foi descrita em três pacientes do sexo feminino ^[16, 17]; porém, os demais estudos não caracterizaram adequadamente o desenvolvimento puberal. Pacientes com deficiência primária de IGF-1 ^[18] ou com deficiência de subunidade ácido-lábil ^[28], que cursam com baixos valores circulantes de IGF-1, também apresentam atraso puberal, sugerindo o papel deste hormônio no mecanismo que regula o início da puberdade.

A microcefalia pode ser considerada como a segunda característica mais comum da resistência ao IGF-1, presente em 72% dos casos índices avaliados. Esta característica indica a importância do sistema IGF-1 / IGF-1R no desenvolvimento do sistema nervoso central ^[29]. O comprometimento cognitivo é, todavia, muito variável. Ao contrário dos indivíduos com mutações no gene *IGF1*, o comprometimento no DNPM é discreto e não foi

descrito surdez neuro-sensorial em nenhum dos pacientes com defeito no *IGF1R*^[1, 12]. A presença de coeficiente de inteligência (QI) abaixo da média e retardo da fala foram bem caracterizados em sete casos (21%) de mutação heterozigota do *IGF1R*^[11, 14-17]. Outras características dismórficas foram observadas de forma isolada: clinodactilia (14,7%), face triangular (5,9%), hipo e hipertelorismo (3%), boca pequena com lábios finos (14,7%), pavilhão auricular alterado (8,8%), dedos curtos (10,7%), *pectus excavatum* (3,6%), apagamento do filtro nasal (3,6%), úvula bífida (3,6%), palato em ogiva (5,9%) e epicanto (5,9%).

A análise das famílias estudadas permite observar que quadros clínicos mais graves estão associados a genótipos de mutações *nonsense*^[11, 15] e a mutações em heterozigose composta^[11, 25]. Por sua vez, os pacientes com mutações *missense* em heterozigose simples, na maioria das vezes, apresentam formas clínicas mais leves, de difícil identificação. Esta grande variabilidade, quanto à gravidade de retardo de crescimento pré- e pós-natal, presença de características dismórficas e do comprometimento cognitivo dos indivíduos das onze famílias com a mutação do *IGF1R*, pode refletir um espectro da atividade remanescente da sinalização do IGF-1^[12, 17]. Pode-se concluir que o quadro clínico é compatível com o número de alelos funcionantes do *IGF1R*, corroborando com a condição de herança autossômica dominante com fenótipo ou expressividade variável.

Laboratorialmente, esses pacientes apresentam grande variabilidade nas concentrações de IGF-1 que alternaram de valores normais a discretamente elevados, enquanto os valores de IGFBP-3 encontram-se

dentro dos limites da normalidade em praticamente todos os pacientes avaliados (Tabela 1). A secreção de GH, avaliada por testes de estímulo, permite afastar deficiência de GH; porém, poucos pacientes apresentaram valores nitidamente elevados deste hormônio [11, 16, 17].

1.4 Resultados prévios que motivaram o presente estudo

Em nosso laboratório estudamos o gene *IGF1R* em um grupo de 25 crianças nascidas PIG, sem recuperação espontânea do crescimento na vida pós-natal, e que apresentavam valores de IGF-1 acima da média para idade e sexo. O cDNA foi sintetizado a partir de RNA total obtido de leucócitos mononucleares periféricos. Todos os pacientes tiveram a região codificadora do *IGF1R* sequenciada e sua expressão analisada por PCR em tempo real. Identificamos 2 pacientes portadores de mutações missense em heterozigose no gene *IGF1R* (p.Gly6Arg e p.Arg511Trp). Adicionalmente, foram identificados 5 pacientes (25%) com expressão reduzida do *IGF1R* em leucócitos.

Figura 3 –Fluxograma esquematizando a estratégia de estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo.

1.4.1 Descrição das mutações no *IGF1R*

O sequenciamento do *IGF1R* identificou 2 pacientes portadores de variantes alélicas em heterozigose neste gene. A primeira variante alélica acarreta substituição de G >A no primeiro nucleotídeo do códon 6 (exon 1), levando a troca de glicina, um aminoácido alifático, não polar, por arginina, um aminoácido básico, polar, no códon 6 (p.Gly6Arg), alterando as propriedades físico-químicas deste resíduo. A glicina na posição seis é bem conservada entre as espécies (Figura 4) e a variante p.Gly6Arg modifica as propriedades físico-químicas do aminoácido neste resíduo, localizado no peptídeo sinal.

Figura 4 – Alinhamento do *IGF1R* de diversas espécies mostrando que o aminoácido glicina na posição 6 é bem conservado.

A segunda variante alélica acarreta a substituição de citosina por timina no nucleotídeo 1531 do cDNA (c.1531C>T), levando a troca de arginina por triptofano no primeiro nucleotídeo do códon 511 (exon 7) (p.Arg511Trp). A arginina na posição 511 é conservada entre as diversas espécies (Figura 5) e essa troca de aminoácidos resulta em modificação nas propriedades físico-químicas do aminoácido, já que a arginina é um aminoácido polar, básico e o triptofano é um aminoácido apolar, aromático.

Figura 5 – Alinhamento do *IGF1R* de diversas espécies, mostrando que o aminoácido arginina na posição 511 é bem conservado entre estas.

Estas duas variantes alélicas nunca foram descritas na literatura. A variante alélica p.Gly6Arg foi encontrada em dois de 153 indivíduos adultos

nascidos AIG com estatura normal (frequência alélica de 0,7%), enquanto a mutação p.Arg511Trp não foi observada no mesmo número de controles. No paciente carreador da variante alélica p.Gly6Arg, foi observado também redução na expressão do *IGF1R* nos leucócitos, motivando a continuidade do estudo deste caso do ponto de vista celular.

1.4.2 Descrição analítica da expressão do *IGF1R*

A expressão relativa do *IGF1R* foi obtida pela comparação da expressão deste gene em cada paciente com a obtida em um pool de cDNA de crianças nascidas adequadas para idade gestacional e com crescimento pós-natal normal (Pool controle), sendo considerada como expressão relativa = 1, com intervalo de confiança de 0,6 a 1,5. Como controle endógeno, foi utilizado a β actina.

Um paciente com hemizigose do *IGF1R*, devido a um grande rearranjo cromossômico, apresentava expressão relativa de 0,4 em relação ao pool controle, compatível com uma redução aproximadamente em 50% na expressão do *IGF1R*, causado pela presença de apenas uma cópia normal deste gene. Duas outras crianças, nascidas AIG com baixa estatura de início pós-natal (C1 e C2), apresentaram nível de expressão relativa de *IGF1R* de 0,96 e 1,6 em relação ao pool controle. Estes resultados validaram a pesquisa nos demais pacientes.

Identificou-se 5 pacientes (20%) com expressão reduzida do *IGF1R* em leucócitos, expressão relativa entre 0,41 a 0,56 em relação ao pool controle (Figura 6). Nenhum destes pacientes apresentou mutação na região codificadora do *IGF1R*.

Figura 6 –Análise da expressão do *IGF1R*. Os valores são expressos em quantidade de expressão relativa do *IGF1R* em relação ao observado no pool controle (mediana resultante do ensaio em triplicata), sendo utilizada a β -actina como gene normalizador. Del ch15 refere-se ao resultado da paciente com deleção de uma cópia do *IGF1R*. C1 e C2 amostras de crianças nascidas AIG com baixa estatura pós-natal. (Resultado da tese de Doutorado da aluna Debora Cabral Coutinho, defendida em 2009). Paciente 1 = SGA 2, Paciente 2 = SGA1, Paciente 3 = SGA 4 e Paciente 4 = SGA3.

2 OBJETIVOS

Analisar *in vitro* a sensibilidade ao IGF-1 através de estudo funcional de fibroblastos de pacientes com suspeita de insensibilidade ao IGF-1

Objetivos específicos

- 1 Avaliar a resposta proliferativa induzida por IGF-1 dos fibroblastos dos pacientes selecionados
- 2 Avaliar a expressão do IGF-1R nestes fibroblastos
- 3 Avaliar a ativação das vias de sinalização PI-3K estimulada por IGF-1 nestas linhagens celulares
- 4 Caracterizar os pacientes selecionados do ponto de vista clínico e laboratorial

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, contidos nas orientações expressas na Declaração de Helsinki. O protocolo de estudo foi submetido e aprovado pela comissão de ética em pesquisa da instituição (CEP 0002/09) e está registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o número CAAE - 0011.0.015.000-09. Foram obtidos consentimento por escrito de todos os pacientes, ou de seus pais/tutores conforme o caso, antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados.

3.2 Casuística

Quatro crianças nascidas PIG foram submetidas à investigação clínica e laboratorial em nosso grupo e selecionadas para o presente estudo por apresentarem mutação no gene *IGF1R* e/ou baixa expressão do RNAm deste receptor em leucócitos periféricos. Desenvolveu-se cultura de fibroblastos destes pacientes para avaliar *in vitro* a ação do IGF-1 e melhor caracterizar o estado de insensibilidade ao IGF-1 destes pacientes.

Como controle utilizamos linhagens de fibroblastos de indivíduos nascidos adequados para idade gestacional e com altura e peso normais

para a idade e sexo. Atualmente, obtivemos 4 linhagens de fibroblasto controles já desenvolvidas em nosso serviço, de indivíduos com idade semelhante a dos pacientes selecionados para o estudo.

3.3 Descrição dos pacientes selecionados

3.3.1 Paciente SGA1

Este paciente é uma criança do sexo feminino, filha de pais não consanguíneos, mãe com baixa estatura sem história de doenças pregressas. Possui dois irmãos com estatura normal e um meio irmão por parte de mãe que não foi avaliado. Pré-natal sem intercorrências. A criança nascida a termo pesando 2.275g e comprimento de nascimento desconhecido. O DNPM da criança foi normal e relata aproveitamento escolar adequado. A paciente apresentava alguns estigmas discretos que não permitem o seu enquadramento em nenhuma síndrome conhecida: perímetro cefálico no limite inferior da normalidade ($Z = -2$), fronte olímpica, clinodactilia do quinto dedo de ambas as mãos e palato ogival. A paciente foi avaliada inicialmente em nosso serviço com 5,8 anos e apresentava altura de 100,5 cm ($Z = -2,2$) e 13,7kg de peso (Z do IMC = $-1,5$) (Tabela 2).

Os exames laboratoriais de rotina, realizados para investigação da baixa estatura, foram normais, assim como o cariótipo (46,XX). A paciente apresentava concentrações de GH basal e estimulado dentro da normalidade, assim como os valores de IGF-1 e IGFBP-3 (Tabela 2).

O tratamento com rhGH foi iniciado aos 8,3 anos, na dose de 0,15 U/Kg/dia (50 µg/kg/dia), e a velocidade de crescimento elevou-se de 3,2 cm/ano para 8,2 cm/ano no primeiro ano de tratamento. Durante o tratamento com rhGH, o paciente manteve valores normais de IGF-1 ($Z = 0$ a $+0,8$) e IGFBP-3 ($Z = 0$ a $+1$). A criança iniciou a puberdade com 8,3 anos, que evoluiu sem anormalidades. Atualmente, está com 13,3 anos, altura de 146,7 cm ($Z = -1,5$). Ainda em uso de rhGH 0,15 UI/Kg/dia, crescendo 5,1 cm/ano (Figura 7).

Figura 7 –Gráfico de crescimento do paciente SGA1

Nesta paciente foi identificada no exon 7 do *IGF1R* a mutação p.Arg511Trp. Ela apresenta expressão relativa do *IGF1R* em leucócitos periféricos de 1,6 em relação ao pool controle (Paciente 2 da Figura 6).

Realizamos segregação familiar e observamos que a mãe da criança avaliada, que também apresentava baixa estatura e havia nascido PIG, tinha a mesma mutação da filha, enquanto que o pai e os irmãos, de estatura normal, apresentavam a sequência selvagem (Figura 8). Laboratorialmente, sua mãe apresentou concentrações séricas de GH, IGF-1 e IGFBP-3 dentro dos limites da normalidade (0,7 ng/mL, 205 ng/mL e 4,7 mg/L, respectivamente). Aos 40 anos realizou teste de tolerância oral à glicose (TTOG) com dosagem concomitante de glicemia e insulina sérica (mg/dL/ μ U/mL): tempo 0': 88/12,2; 30': 119/25,6; 60': 118/30,2; 90': 166/37,8 e 120': 197/60,6, sendo diagnosticado intolerância à glicose.

Figura 8 – Heredograma da família com a mutação p.Arg511Trp. Os indivíduos com a mutação são representados com símbolos cheios (● e ■). O caso índice encontra-se indicado por uma flecha. Os indivíduos foram classificados como PIG ou AIG conforme o peso e comprimento ao nascimento para idade gestacional. Os números abaixo de cada figura representam o Z de altura de cada paciente.

3.3.2 Paciente SGA2

O paciente é uma criança do sexo masculino, filho único de pais não consanguíneos com baixa estatura (Tabela 2). Possui 2 meios-irmãos maternos com estatura normal.

Criança nascida a termo, após gestação sem intercorrências, parto cesárea, com peso de 2.480g ($Z = -2$) e comprimento ao nascimento de 47 cm ($Z = -1,9$). Apresentou DNPM normal, mas referia baixo rendimento escolar. Apresenta alguns estigmas discretos, que não permitem o seu enquadramento em nenhuma síndrome conhecida: micrognatia, lentiginoses e manchas café com leite pelo tronco e membros inferiores.

O paciente foi avaliado inicialmente, em nosso serviço, com 7,3 anos. Apresentava altura de 105 cm ($Z = -3,3$) e peso de 16,1 Kg (Z do IMC = -0,8). Os exames laboratoriais de rotina, realizados para investigação da baixa estatura, foram normais. O paciente apresentava concentrações de GH basal e estimulado dentro da normalidade, assim como os valores de IGF-1 e IGFBP-3 (Tabela 3).

Iniciou tratamento com rhGH aos 9,1 anos, na dose de 0,15 U/Kg/dia (50 µg/kg/dia) e a velocidade de crescimento aumentou de 4,2 cm/ano para 6,8 cm/ano no primeiro ano de tratamento. Durante o tratamento, com rhGH, o paciente manteve valores normais de IGF-1 ($Z = -0,2$ a $+0,8$) e IGFBP-3 ($Z = +0,3$ a $+0,7$). A criança iniciou a puberdade com 11 anos, cujo desenvolvimento evoluiu sem anormalidades. O tratamento com rhGH foi

suspenso aos 13,1 anos por desejo do paciente. Na última avaliação com 15,9 anos e altura de 154,6 cm, crescendo 4,0 cm/ano (Figura 9).

Figura 9 –Gráfico de crescimento do paciente SGA2

Identificou-se no exon 1 do *IGF1R* uma variante alélica p.Gly6Arg. Este paciente apresenta expressão relativa do *IGF1R* em leucócitos periféricos de 0,6 em relação ao pool controle (paciente 1 da Figura 6), compatível com redução aproximadamente em 40% na sua expressão em relação ao controle.

Realizamos segregação familiar e observamos que a mãe e a avó materna do paciente, ambas com baixa estatura, apresentavam a mesma alteração do paciente. Entretanto, a variante alélica encontrada também estava presente em um irmão nascido AIG e com crescimento normal (Figura 10).

Figura 10 –Heredograma da família com a mutação p.Gly6Arg. Os indivíduos com a mutação são representados com símbolos cheios (● e ■). O caso índice encontra-se indicado por uma flecha. Os indivíduos foram classificados como PIG ou AIG conforme peso e comprimento ao nascimento para idade gestacional. Os números abaixo de cada figura representam o Z de altura de cada paciente.

3.3.3 Paciente *SGA3*

Criança do sexo feminino, filha de pais não consanguíneos ambos saudáveis. Pré-natal sem intercorrências, nasceu de parto cesáreo por apresentação pélvica, com idade gestacional de 39 semanas. Peso ao nascimento de 2.410g ($Z = -2,2$) e comprimento ao nascimento de 42 cm ($Z = -4,6$). Apresentou sofrimento fetal, ficando internada em UTI por 12 dias. Antecedente de Comunicação interatrial corrigida aos 4 anos de vida.

Apresentou DNPM normal e refere aproveitamento escolar adequado. Apresenta alguns estigmas discretos que não permitem o seu enquadramento em nenhuma síndrome conhecida: fronte olímpica, clinodactilia do quinto dedo de ambas as mãos e acentuação de lordose lombar.

A paciente foi avaliada inicialmente em nosso serviço com 4,9 anos, com altura de 87,6 cm ($Z = -4,0$) e 10,5 kg de peso (Z do IMC = $-1,5$). Os exames laboratoriais de rotina, realizados para investigação da baixa estatura, obtiveram resultados normais, assim como o cariótipo (46,XX). A paciente apresentava concentrações de GH basal e estimulado dentro da normalidade, assim como os valores de IGF-1 e IGFBP-3 (Tabela 3). O tratamento com rhGH foi iniciado aos 5,5 anos, na dose de 0,15 U/Kg/dia (50 μ g/kg/dia), com aumento da velocidade de crescimento de 4,8cm/ano para 7,2 cm/ano no primeiro ano. Durante o tratamento com rhGH, a paciente manteve valores elevados de IGF-1 ($Z = +1,3$ a $+2,5$) e IGFBP-3 ($Z = +1$ a $+2,3$).

A criança iniciou a puberdade com 8,8 anos. Na época, apresentava Z de altura $= -2,3$, sendo optado por bloqueio da puberdade com análogo do GnRH que foi mantido até a idade de 12,5 anos. Atualmente, encontra-se com 13,4 anos, altura de 137 cm, crescendo 1,4 cm/ano (Figura 11).

Figura 11 –Gráfico de crescimento do paciente SGA3

Esta paciente apresenta expressão relativa do *IGF1R* em leucócitos periféricos de 0,4 em relação ao pool controle (paciente 4 da Figura 6), compatível com redução aproximadamente em 60% na sua expressão. O sequenciamento do *IGF1R* não identificou mutações tanto em sua região codificadora, como nos introns flangeadores e na região promotora. Também foi afastado hemizigose do gene do *IGF1R* por amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA – *multiplex ligation-dependent probe amplification*).

3.3.4 Paciente SGA4

Criança do sexo masculino, filho de pais não consanguíneos ambos saudáveis e de altura dentro da normalidade (Tabela 2). Tem 2 irmãos com

estatura normal. Apresentou retardo de crescimento intra-uterino desde 31 semanas de gestação, nasceu de parto cesáreo com 38 semanas de idade gestacional, com peso de nascimento de 2.440g ($Z = -1,7$), comprimento ao nascimento de 44 cm ($Z = -3,2$) e perímetro cefálico ao nascimento de 33 cm ($Z = -1$). Apresentou DNPM normal com aproveitamento escolar adequado, além de alguns estigmas discretos que não permitem o seu enquadramento em nenhuma síndrome conhecida: palato ogival, epicanto e clinodactilia do quinto dedo de ambas as mãos.

O paciente foi avaliado inicialmente em nosso serviço com 6 anos e apresentava altura de 103,9 cm ($Z = -2,1$) e 16 kg de peso (Z do IMC = $-0,5$). Os exames laboratoriais de rotina, realizados para investigação da baixa estatura, foram normais. O paciente obteve concentrações de GH basal e estimulado dentro da normalidade, assim como os valores de IGF-1 e IGFBP-3 (Tabela 2). O paciente foi acompanhado clinicamente sem tratamento para a baixa estatura. Iniciou puberdade com 12 anos. Na última avaliação apresentava idade cronológica de 16 anos, altura = 158,7 cm crescendo 6 cm/ano (Figura 12).

Figura 12 –Gráfico de crescimento do paciente *SGA4*

A expressão relativa do *IGF1R* em leucócitos periféricos foi de 0,4 em relação ao pool controle (paciente 3 da Figura 6), compatível com redução aproximadamente em 60% na sua expressão. O sequenciamento do *IGF1R* não identificou mutações tanto em sua região codificadora, como nos introns flanqueadores e na região promotora. Também foi afastado hemizigose do gene do *IGF1R* por amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA).

Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes selecionados para os estudos *in vitro*

	SGA1	SGA2	SGA3	SGA4
Defeito no <i>IGF1R</i>	p.Arg511Trp	p.Gly6Arg e baixa expressão	Baixa expressão	Baixa expressão
Sexo	F	M	F	M
Dados dos pais				
Altura da Mãe (cm)	144*	148,5*	158,7	153
Altura do Pai (cm)	175	150	160	176,5
Dados ao nascimento				
Idade gestacional (sem)	39	39	39	38
Peso (g)	2.275	2.480	2.410	2.440
Z do peso ao nascimento	-2,5	-2,0	-2,2	-1,7
Comprimento (cm)	ND	47	42	44
Z do comprimento	ND	-1,9	-4,6	-3,2
Dados da 1ª avaliação				
Idade (anos)	5,8	7,3	4,9	6,0
Idade óssea (anos)	3,0	4,5	ND	4,0
Z da altura	-2,2	-3,3	-4,0	-2,1
Z do IMC	-1,5	-0,8	-1,5	-0,5
GH basal (ng/mL)	0,3 - 3,8	0,1 - 0,4	0,4 - 5,1	0,1 - 0,9
Pico de GH (ng/mL)	12,1	5,8	26,5	20,3
Z do IGF-1	1,3	0,5	1,5	0,0
Z do IGFBP-3	1,0	1,3	1,5	0,5
Dados ao iniciar o tratamento com rhGH				
Idade (anos)	8,3	9,1	5,5	-
Idade óssea (anos)	6,8	5,0	5,0	-
Z da altura	-2,3	-3,2	-4,0	-
1º ano de tratamento com rhGH				
Δ Velocidade de crescimento (cm/a)	3,5	2,6	2,4	-
Δ Z da altura	0,4	0,4	0,7	-
Δ Idade óssea (anos)	2,0 ¹	0,5	1,8	-
Última avaliação				
Tempo de tratamento (anos)	5,0 ²	4,0	4,6 ³	NR
Idade (anos)	13,3	15,9	14,0	16,0
Z da altura	-1,5	-2,3	-3,5	-1,9
Velocidade de crescimento (cm/ano)	5,1	4,0	1,4	6,0

* - parente carreador da mesma alteração encontrada na criança.

ND – não disponível; NR – não realizado

1 – avaliado em 1,5 anos de observação

2 - criança ainda em tratamento com rhGH

3 – paciente teve tratamento concomitante com aGnRH entre as idades de 8,8 a 12,5 anos

Escores-Z do peso e comprimento ao nascimento foram calculados utilizando as tabelas de Usher & McLean. ^[30]

Escores-Z de altura e IMC foram calculados utilizando as tabelas de *Tanner e cols.* de 1966 ^[31] e do *National Center for Health Statistics (NCHS)* ^[32], respectivamente. Os escores-Z do IGF-1 e IGFBP-3 foram calculados conforme dados fornecidos pelo fabricante do kit

3.4 Metodologia experimental empregada

3.4.1 Preparação das amostras

Escolhemos fibroblastos para os estudos *in vitro* em razão da facilidade de obtenção do tecido, por existir comprovação que estas células expressam receptores funcionais de IGF-1, além das proteínas necessárias para a transdução do sinal ^[33]. Estes modelos foram validados em trabalhos anteriores, como modelos *in vitro*, para determinar a sensibilidade de um organismo sob ação do IGF-1 ^[11, 22, 34, 35].

Os fibroblastos foram obtidos por biópsia de pele (*punch* de 3 mm de diâmetro) da região do antebraço, realizada ambulatorialmente após assepsia e anestesia local. As idades dos pacientes no momento da biópsia eram: 13,9 anos para SGA2; 11,5 anos para SGA3 e 14,9 anos para SGA4. Com relação ao paciente SGA1, a biópsia foi realizada em sua mãe, carreadora da mesma mutação, com a idade de 35 anos.

O produto da biópsia de pele foi fragmentado em aproximadamente 12 diminutos fragmento, transferidos para frascos apropriados para cultura celular de 25cm², contendo AmnioMaxTM-C100 Basal com 20% de AmnioMaxTM-C100 Supplement. Mantivemos os frascos de cultura em estufa a 37° C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Após 10 a 12 dias foram observados no microscópio de inversão os primeiros fibroblastos aderentes que emergiram do fragmento inicial (Figura 13A). Com a proliferação dos fibroblastos, os fragmentos iniciais

foram retirados e os fibroblastos aderentes, tratados com tripsina e transferidos para frascos de 75cm², onde se expandiram até a confluência (Figura 13B). Após este período, os fibroblastos foram transferidos para criotubo e congelados em nitrogênio líquido para estudos posteriores. Todo o estudo foi realizado com células entre a 4^ª e a 13^ª passagem. Para analisar a sensibilidade ao IGF-1 *in vitro*, utilizamos três abordagens que avaliam aspectos distintos da ação deste hormônio: proliferação celular, produção de IGFBP3 e ativação de proteínas da cascata da via de sinalização do IGF-1 [36].

Figura 13 – Desenvolvimento das linhagens de fibroblastos. O fragmento de pele, obtido por biópsia, foi desfeito em fragmentos menores e então colocado em frascos próprios para cultura. Após aproximadamente 20 dias foi possível visualizar fibroblastos emergentes do fragmento inicial **(A)**. Quando chegaram à confluência **(B)** foram então transferidos para garrafas de cultura maiores (75cm²) para expansão da cultura e criopreservação em nitrogênio líquido.

3.4.2 Avaliação do efeito proliferativo

A proliferação das células foi quantificada a partir da utilização de um ensaio baseado na capacidade de células viáveis em reduzir o sal de tetrazolium (amarelo) para formazan (azul). O CellTiter® é formado por combinação de compostos tetrazolium (MTS) e outro reagente de ligação de elétrons (PES). O PES aumenta a estabilidade química, formando uma solução estável quando combinado com MTS. A redução do sal de tetrazolium é mediada por NADPH ou NADH, produzido pelas enzimas desidrogenases que refletem a atividade metabólica das células. Este método possuiu a sensibilidade e a acurácia necessária para avaliar a diferença de resposta proliferativa dos ensaios planejados, sendo comparável ou superior ao uso da incorporação de timidina marcada, com a vantagem de utilizar um método colorimétrico e não radioativo [37].

As células foram semeadas em densidade de 5×10^3 células por poço em placa de 96 poços e depois submetidas a tratamento com doses crescentes de IGF-1. Também foi usado meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 0.1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) para controle negativo de proliferação e DMEM, suplementado com soro fetal bovino (5-10%) para controle positivo de proliferação. Todos em volume final de 100µl (Figura 14).

	1	2	3	4	5	6
	Fibroblastos do paciente A					
	IGF-I					
A						
B	SFM	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	SFM	FCS 5%
C	SFM	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	SFM	FCS 5%
D	SFM	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	SFM	FCS 5%
	IGF-I			IGF-I		
E	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml
F	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml
G	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml
H						

Figura 14 –Esquema do ensaio de proliferação. Fibroblastos foram semeados em placa de 96 poços e um grupo de 3 poços foram usados para cada modalidade de tratamento: meio livre de hormônio (SFM, controle negativo de proliferação), meio suplementado com soro bovino fetal, controle positivo de proliferação) e doses crescentes de IGF-1.

Após o período de 72 horas de tratamento, adicionou-se o sal metrazolium, que foi reduzido para formazan através da atividade metabólica mitocondrial celular. Assim sendo, a redução do sal foi proporcional ao número de células presentes em cada poço. Posteriormente, foi realizada a leitura da placa em leito de ELISA. Como controle de qualidade de cada experimento, analisamos apenas ensaios onde a diferença entre os valores obtidos nos dois controles negativos de proliferação (SFM) foi menor que 12%, ainda, observamos a proliferação acima 50% no estímulo com soro fetal bovino.

3.4.3 Análise da expressão do *IGF1R* em linhagens de fibroblastos

Analizamos por PCR em tempo real a expressão do *IGF1R* nas linhagens de fibroblastos. RNA total foi extraído destas linhagens celulares pelo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol[®]) e transformado em cDNA usando o kit comercial *High Capacity cDNA Archive Kit[®]* (Applied Biosystems). Para a análise de expressão empregamos a metodologia TaqMan[®], em que foi utilizado o ensaio de *IGF1R*, Hs00181385_m1 e como gene endógeno a beta actina. A quantificação relativa do *IGF1R* efetiva-se a partir da utilização do calibrador RNA extraído de células controles. Para o cálculo da quantificação, de forma a permitir comparações expressas em número de vezes em relação à expressão nas células controles, usamos o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme descrito por Livak et al [38].

3.4.4 Análise do conteúdo do IGF-1R nas linhagens estudadas

Com o objetivo de analisar o conteúdo de IGF-1R, comparamos as culturas de fibroblastos dos pacientes selecionados com a de controles através do ensaio de *Western blot*.

As culturas de fibroblastos foram cultivadas em placas de seis poços e, após atingirem aproximadamente 100% de confluência as células foram lisadas para extração de proteínas intracelulares com solução de lise celular. O extrato de proteínas obtidas de cada experimento foi submetido à SDS-

PAGE e, na sequência, transferidos do gel para uma membrana de nitrocelulose, método denominado *western blot*. Posteriormente, a membrana, contendo as proteínas transferidas do gel, foi bloqueada com leite desnatado 10% por 1 hora e com BSA 3% por mais 1 hora para a redução de sinais inespecíficos. Depois de bloqueada, a membrana foi incubada *overnight* com o 1º anticorpo específico contra proteína IGF-1R diluído em BSA 1% em concentração 1:400. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-Tween e incubada por mais uma hora com o 2º anticorpo anti-IgG de coelho ou camundongo (dependendo do 1º anticorpo), associado à peroxidase na concentração de 1:5000 diluído em PBS-Tween. O resultado foi detectado através do sistema de quimiluminescência ECL™ *western blotting* e as imagens geradas, decorrentes da captação pelo aparelho Storm860, foram analisadas pelo programa ImageQuant 5.2. Para normalização do conteúdo total das proteínas estudadas, uma segunda hibridização com anticorpo β -tubulina foi realizada.

3.4.5 Avaliação da via de sinalização do IGF-1

Com o objetivo de analisar as duas vias principais de sinalização do IGF-1R, comparamos as culturas de fibroblastos dos pacientes selecionados com a de controles quanto à sua responsividade ao IGF-1 no que se refere à fosforilação de proteínas importantes e representativas da cascata de sinalização da via PI3K (AKT1/2).

As culturas de fibroblastos foram cultivadas em placas de seis poços e, após atingirem aproximadamente 80% de confluência, foram lavados com PBS e incubados por 24 horas com meio livre de hormônio. Após esse período, foram novamente lavadas com PBS e incubadas com SFM por mais 24 horas, totalizando um período de 48 horas de jejum, para redução máxima de suas atividades para níveis basais. Após o período de “jejum”, as células foram tratadas com IGF-1 (25ng/mL) por períodos de 20 e 60 minutos. Na sequência, as células foram lisadas para extração de proteínas intracelulares com solução de lise celular.

O extrato de proteínas obtidas de cada experimento foi submetido à SDS-PAGE e, na sequência, transferidos do gel para uma membrana de nitrocelulose, método denominado *western blot*. Posteriormente, a membrana, contendo as proteínas transferidas do gel, foi bloqueada com leite desnatado 10% por 1 hora e com BSA 3% por mais 1 hora para a redução de sinais inespecíficos. Depois de bloqueada, a membrana foi incubada *overnight* com o 1º anticorpo específico contra proteínas fosforiladas da cascata de sinalização do IGF-1; α pAKT1/2/3 (Ser473) diluídos em BSA 1% em concentração 1:400. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-Tween e incubada por mais uma hora com o 2º anticorpo anti-IgG de coelho ou camundongo (dependendo do 1º anticorpo), associado à peroxidase na concentração de 1:5000 diluído em PBS-Tween. O resultado foi detectado através do sistema de quimiluminescência ECLTM *western blotting* e as imagens geradas,

decorrentes da captação pelo aparelho Storm860, foram analisadas pelo programa ImageQuant 5.2.

Posteriormente, o primeiro anticorpo foi retirado da membrana com solução própria. Para quantificação do conteúdo total das proteínas estudadas, uma segunda hibridização com anticorpos α AKT1/2, que reconhecem as formas com ou sem fosforilação, foi realizada. Este resultado foi utilizado para equalizar os valores obtidos de fosforilação.

3.4.6 Avaliação da localização sub e intracelular do IGF-1R

Para analisar a localização sub e intracelular do IGF-1R nas culturas de fibroblastos das linhagens SGA1 e controle pareada pela faixa etária, foi utilizada as técnicas de imunofluorescência indireta e microscopia confocal de varredura a laser. Cada experimento foi feito em triplicata e pelo menos 7 campos de microscopia foram analisados por experimento. O ensaio foi realizado com e sem permeabilização das células no intuito de avaliar a distribuição do IGF-1R nestas duas condições, facilitando a visualização de sua distribuição na membrana citoplasmática quando não permeabilizadas e no citoplasma quando permeabilizadas. Foram semeadas em uma placa de 24 poços (densidade de 1×10^4 células por poço) e cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino. Cada poço contem lamínula de 13 mm previamente auto clavada. Após 24 horas de incubação as placas são lavadas com tampão fosfato/salina (*Phosphate-Buffered Saline* - PBS) e incubadas em meio livre de hormônio (*Serum Free Medium*- SFM) por 24

horas. Após este período, foi adicionado 500 µL de paraformaldeído 2% por 15 minutos para fixação. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton X – 100/ PBS 0,2% por 15 minutos em temperatura ambiente, e incubadas com o anticorpo primário (IGF-1R subunidade alfa) por 24 horas a 4 °C. Após a lavagem com PBS, as células foram incubadas com o anticorpo secundário (Alexa 488) no escuro, em câmara úmida, por uma hora, em temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS, as células foram incubadas com DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, Sigma), um marcador específico para núcleo, na proporção de 1:500 e com faloidina, um marcador de citoesqueleto, na concentração de 1:200 por 15 minutos no escuro. Após última lavagem, as lamínulas foram montadas para posterior avaliação através da microscopia confocal ^[39].

3.4.7 Avaliação da localização na superfície celular do IGF1R:

Para analisar a localização sub e intracelular do IGF-1R as culturas de fibroblastos das linhagens SGA1, SGA2 e controle pareado pela faixa etária foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente e através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula.

Em resumo, os fibroblastos foram semeados em um frasco de 75 cm² (densidade de 1×10^5 células por frasco) e cultivados em meio suplementado com soro fetal bovino a 20%. Depois de sua confluência estas células são soltas com PBS-EDTA e bloqueadas em solução PBS BSA1% a 37°C por 15min. Após o bloqueio, elas são lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo IGF1R (RDFAB391P) e seu controle de isotipo (GOAT anti-mouse imunoglobulins F(ab2) RPE – da marca DAKO catalogo R-0480) na concentração de 10µg/ml por 1h a temperatura ambiente. Após incubação as células foram lavadas 1x com PBS e avaliadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A intensidade de fluorescência foi quantificada através das médias geométricas dos ensaios e os dados foram expressos em gráficos de histogramas através do programa Cell Quest Pro da Becton & Dickson®.

3.5 Análises estatísticas

A comparação dos resultados entre as diversas linhagens celulares foi realizada através do teste-t não pareado ou teste Mann-Whitney de acordo com a presença de distribuição paramétrica ou não, respectivamente. Para toda análise estatística foram considerados como estatisticamente significante valores de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com SigmaStat para Windows (versão 3.5, SPSS, Inc., San Rafael, CA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito proliferativo

Nas linhagens de fibroblastos controles, o tratamento com IGF-1 foi capaz de estimular a proliferação celular de forma semelhante (Figura 15). Foi observado que as linhagens SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4 apresentaram proliferação significativamente menor em relação às duas linhagens controles em todas as concentrações de IGF-1 utilizadas (10, 25 e 50 ng/mL). Em relação à proliferação obtida por fibroblastos controles (C1 e C2), as linhagens SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4 proliferaram, respectivamente, 55%, 66%, 64% e 28% a menos sob estímulo de IGF-1 (25 ng/mL) (Figura 15). Estes resultados indicam a presença de insensibilidade ao IGF-1 nas linhagens SGAs.

Figura 15 – Resposta proliferativa dos fibroblastos dos pacientes e controle frente ao estímulo com doses crescentes de IGF-1 (10, 25 e 50 ng/mL) por 72 horas em relação às células não tratadas. Os resultados são expressos como média $\pm$ 1 erro padrão. * - $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.2 Avaliação da expressão e conteúdo de IGF-1R

Os resultados obtidos em triplicada mostraram uma expressão reduzida do *IGF1R* nas linhagens SGA2, SGA3 e SGA4 (quantificação relativa em relação à linhagem controle de 0,16 a 0,25), enquanto a linhagem SGA 1 apresentou aumento de expressão *IGF1R* em relação aos controles (Quantificação relativa em relação a linhagem controle de 3,6; $p < 0.05$) (Figura 16). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos da expressão do *IGF1R* em leucócitos (Figura 6). Frente a estes achados, decidimos avaliar a expressão da proteína IGF-1R nestas linhagens de fibroblastos.

Figura 16 – Análise da expressão do *IGF1R*. Os valores são expressos em quantidade de expressão relativa do *IGF1R* em relação ao observado nos fibroblastos C1 (média $\pm$ 1 erro padrão de três ensaios independentes). * - $p < 0.05$ em relação ao controle.

Através do *western blot* do extrato de proteína total obtida das linhagens celulares dos pacientes e controles, realizamos *immunoblotting* com anticorpo anti IGF-1R e β -tubulina. Os resultados finais, obtidos em quadruplicata, demonstraram redução significativa no conteúdo de IGF-1R na linhagem SGA2, SGA3 e SGA4 (58%, 22% e 38% em relação ao controle, $p < 0,05$); enquanto a linhagem SGA1 apresentou aumento de 60% no conteúdo de IGF-1R em relação as linhagens controles ($p < 0.05$) (Figura 17A e B). Os resultados foram concordantes com os achados da expressão do *IGF1R* por PCR em tempo real, tanto em leucócitos como em fibroblastos. O resultado sugere que a insensibilidade ao IGF-1, observada

nas linhagens SGA2, SGA3 e SGA4, pode ser causada por menor expressão e consequente menor síntese de IGF-1R.

Figura 17 –Avaliação do conteúdo de IGF1-R nas linhagens celulares dos pacientes PIG (SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4) e controles (C1 e C2) através de *imunoblot* de extrato de proteína intracelular. A quantidade de proteína aplicada em cada amostra foi normalizada pelo sinal da β tubulina, uma proteína expressa constitutivamente. **A**- O *western blot* demonstrado é representativo de três experimentos independentes com resultados equivalentes. **B**- As bandas de *western blot* foram quantificadas por densitometria e expressas em unidades arbitrárias. As barras verticais representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes (* - $p < 0,05$ em relação às linhagens controles).

4.3 Avaliação da via de sinalização do IGF-1

Observou-se menor fosforilação de AKT após o estímulo com IGF-1 nas linhagens SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4 quando comparadas as linhagens controle C1 e C2 (Figura 18A, B e C). As linhagens SGA2, SGA3 e SGA4 foram as que apresentaram menor fosforilação de AKT após estímulo com dose de 25 ng/mL de IGF-1, obtendo valores 58, 43 e 57% inferiores aos dos controles, respectivamente. A linhagem SGA1 apresentou fosforilação de AKT 29% menor que os controles quando estimulado com 25 ng/mL de IGF-1 e 51% menor quando o estímulo foi realizado com doses de 2 e 10 ng/mL de IGF-1 (Figura 19A e B). O conteúdo total de AKT foi semelhante em todas as linhagens estudadas.

Figura 18 –Efeito da ação do IGF-1 em cultura de fibroblastos sobre a fosforilação de AKT (Ser473) nas linhagens SGA1, SGA2, SGA3, SGA4 e controle. *Imunoblot* de extrato de proteína intracelular com anticorpo anti forma fosforilada de AKT e anti-AKT total após 20' de estímulo com IGF-1 (0, 2, 10 e 25ng/mL) em linhagens de fibroblasto controle (C2) e da linhagem de fibroblastos SGA1 (A) SGA2 (B), SGA3 (C) e SGA4 (D).

Figura 19 – Avaliação da via PI3K após estímulo com IGF-1. Os fibroblastos submetidos a meio livre de hormônio foram incubados com e sem IGF-1 (2, 10 e 25 ng/mL) por 20 minutos. Os lisados celulares foram obtidos de cada experimento e submetidos à SDS-PAGE e, na sequência, transferidos para uma membrana de nitrocelulose, e o fosfo-AKT imunodetectado por um anticorpo específico. A membrana foi reincubada com anticorpo que reconhece o AKT total. As barras verticais representam a média $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes nas linhagens C2, SGA2 (p.Gly6Arg), SGA3 e SGA4 (linhagens com baixa expressão do *IGF1R*) (**A**) e C1, SGA1 (p.Arg511Trp) (**B**).

4.4 Avaliação da localização celular do IGF-1R:

Através do ensaio de imunofluorescência e sua posterior análise pela microscopia confocal de varredura a laser, avaliamos a localização do IGF-1R subunidade alfa nas linhagens de fibroblastos SGA1 e controle (C1). Os resultados das imagens obtidas das linhagens de fibroblastos SGA1, após análise pela microscopia confocal de varredura a laser, foram semelhantes ao controle (Figura 20).

Figura 20 –Avaliação da localização celular do IGF-1R. As linhagens celulares SGA1 e controle foram submetidas a imunofluorescência indireta, através do anticorpo primário policlonal de coelho anti-IGF1R subunidade alfa e anticorpo secundário Alexa 488 anti-coelho (verde) em duas situações: **A-** com permeabilização e **B-** sem permeabilização. As células foram coradas com DAPI (azul) e faloidina (branco). Barra de escala: 10.

Através do ensaio de citometria de fluxo também avaliamos a distribuição na superfície celular do IGF-1R nas linhagens de fibroblastos SGA1, SGA2 e seus controles (C1 e C2, respectivamente). A expressão na superfície celular do IGF1R das linhagens de fibroblastos SGA1 após análise pela citometria de fluxo foram aproximadamente 20% maior em relação ao controle, enquanto que as linhagens de fibroblastos SGA2 foram aproximadamente 50% menor em relação ao controle (Figura 21). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Desta forma, os resultados observados nas linhagens SGA1 e SGA2 são concordantes com o observado na análise de expressão do *IGF1R* pelo PCR em tempo real e da quantificação de sua proteína pelo ensaio de *western blot*. Na linhagem SGA2 aventamos a hipótese de que a diminuição da expressão do *IGF1R* esteja envolvida no distúrbio de crescimento do paciente com esta variante alélica (p.Gly6Arg). Enquanto que na linhagem SGA1, a mutação p.Arg511Trp pode ser responsável pelo acúmulo na superfície celular de receptores IGF-1R não funcionantes, levando como consequência, a um também prejuízo no crescimento do paciente com esta mutação.

Figura 21 – Expressão na superfície celular do IGF-1R obtida pela média dos ensaios de citometria de fluxo. Os valores foram expressos em relação às células controles. A média da intensidade da fluorescência (MFI) foi alcançada através de três experimentos independentes.

Desde a primeira descrição de dois pacientes nascidos pequenos para a idade gestacional que apresentavam resistência ao IGF-1 e falha na recuperação do crescimento pós-natal ^[11], uma série de publicações confirmaram o impacto da patogenicidade das mutações no gene do *IGF1R* no crescimento pré- e pós-natal humano ^[12-18].

No presente estudo, caracterizamos *in vitro* a insensibilidade ao IGF-1 através de estudo de fibroblastos de 4 pacientes nascidos PIG e sem recuperação espontânea da altura na vida pós-natal.

5.1 Análise da linhagem SGA1

A mutação p.Arg511Trp foi encontrada em uma paciente com baixa estatura de início pós-natal. A mutação também se manifestou em sua mãe (também com história de ter nascido pequena para idade gestacional), contudo, não esteve presente em familiares, fenotipicamente normais, e não foi observada em um grande número de controles. Esta mutação encontra-se em região bem conservada entre as diversas espécies, ocasionando mudança nas propriedades físico-químicas do aminoácido. O resíduo R511 está localizado próximo ao aminoácido cisteína na posição 544, responsável pela primeira ponte dissulfídica entre as 2 subunidades α , fundamental para a estrutura tetramérica do IGF-1R, correspondendo ao domínio N-terminal da fibronectina tipo III do IGF-1R (Figura 22). Modelos de predição

insilico indicam um provável efeito deletério desta mutação (<http://www.mutationtaster.org/>). A fibronectina age como mediadora das interações proteína-proteína, incluindo a ligação ao ligante e atuando como espaçador objetivando posicionar funcionalmente importantes regiões das proteínas extracelulares ^[20]. Mutações no resíduo R511 podem prejudicar a dimerização do receptor, levando a alterações conformacionais e consequentemente diminuição na ativação do receptor pelo seu ligante.

Figura 22 – Imagem representativa da distribuição dos domínios nas subunidades α e β e a localização aproximada das pontes dissulfídicas α - α e α - β no dímero IGF-1R. (Adaptado de Adams, 2000)

Nossos resultados mostraram evidências de resistência ao IGF-1 na linhagem de fibroblasto do paciente com a mutação p.Arg511Trp (linhagem SGA1), pois apresentaram menor capacidade de proliferação e de ativação da via fosfatidilinositol 3-quinase, frente ao estímulo com IGF-1, quando comparado com células controles. Entretanto, de forma inesperada, foi observado aumento do conteúdo de IGF-1R nas linhagens celulares do

paciente em relação às células controles. Os resultados foram concordantes com os achados da expressão do *IGF1R* por PCR em tempo real, tanto em leucócitos como em fibroblastos. O próximo passo foi avaliar a localização da subunidade alfa do IGF-1R nas linhagens de fibroblastos SGA1 e controle através da citometria de fluxo e do ensaio de imunofluorescência e sua posterior análise pela microscopia confocal de varredura a laser. Os resultados das imagens, obtidas das linhagens de fibroblastos SGA1 após análise pela microscopia confocal, foram semelhantes ao controle. E na citometria de fluxo o mesmo demonstrou um aumento não significativo na quantidade de IGF-1R na superfície celular. Desta forma, não confirmamos a hipótese de comprometimento do tráfego intracelular do IGF-1R, levando sua retenção em organelas como o retículo citoplasmático.

Em 2007, *Inagaki e cols.*^[13] descreveram uma paciente com retardo de crescimento pré e pós-natal que apresentava substituição no nucleotídeo subsequente ao encontrado no presente estudo (c.1532 G>A), resultando na troca de arginina por glutamina no mesmo códon (p.Arg511Gln). Os estudos funcionais utilizando células NIH-3T3 transfectadas com o receptor selvagem e o mutado demonstraram que a mutação p.Arg511Gln não alterava a ligação do IGF-1 ao receptor, porém causava diminuição na fosforilação na subunidade β do receptor mutante quando estimulado, assim como diminuição da fosforilação de AKT e MAPK^[13].

Estes achados em conjunto permitem associar a mutação p.Arg511Trp com o fenótipo de baixa estatura pré- e pós-natal.

5.2 Análise da linhagem SGA2

A variante alélica p.Gly6Arg foi encontrada em um paciente com baixa estatura de início pós-natal e microcefalia, porém esteve presente em familiares fenotipicamente normais assim como em uma pequena parcela de controles (0,7%).

A variante alélica p.Gly6Arg encontra-se em região de peptídeo sinal do pré-pró-IGF-1R. O peptídeo sinal é responsável pelo direcionamento e transporte da proteína recém-sintetizada para o retículo endoplasmático. Após este processo, o peptídeo sinal pode ser clivado da proteína de origem por peptidases específicas, como ocorre com o pré-pró-IGF-1R, originando o pró-IGF-1R. O peptídeo sinal do IGF-1R é composto por uma região central hidrofóbica, flanqueada por uma sequência amino-terminal hidrofílica e básica e uma porção carboxi-terminal polar, contendo aminoácidos sem carga nas posições -1 e -3 que determinam o sítio de clivagem pela peptidase (Figura 23) ^[40]. Mutações no peptídeo sinal, ou na região próxima a este, são responsáveis pela alteração no transporte de proteínas ou na posterior clivagem do peptídeo sinal por peptidases podendo prejudicar a ação das mesmas ^[41]. A glicina na posição seis é bem conservada nas espécies e a variante p.Gly6Arg modifica as propriedades físico-químicas do aminoácido neste resíduo. No entanto, a análise *in silico* não indicava efeito deletério desta variante alélica sobre a função do IGF-1R (<http://www.mutationtaster.org/>).

Figura 23 – Representação esquemática da região amino-terminal do pré-pró-IGF-1R, ilustrando o peptídeo sinal e o sítio de clivagem.

Apesar destas evidências contra uma relação causal entre pGly6Arg e o fenótipo de retardo de crescimento de início pré-natal, leucócitos deste paciente apresentaram redução significativa da expressão do IGF1R, estimulando a continuidade dos estudos moleculares.

O estudo funcional nesta linhagem de fibroblastos evidenciou resistência ao IGF-1, pois apresentaram menor capacidade de proliferação e de ativação da via PI-3K. Na avaliação da expressão e conteúdo de IGF-1R nas linhagens SGA2 podemos observar redução significativa no conteúdo (58%) de IGF-1R em relação aos controles. Os resultados foram concordantes com os achados da expressão do *IGF1R* por PCR em tempo real, tanto em leucócitos quanto em fibroblastos. Adicionalmente análise por citometria de fluxo mostrou uma significativa redução do IGF-1R na superfície celular dos fibroblastos SGA2, sugerindo a hipótese que uma redução na expressão do *IGF1R* esteja envolvida no distúrbio de crescimento deste paciente. A ausência de deleções ou mutações nas regiões promotoras, codificadoras e introns flanqueadoras não suporta a hipótese de haploinsuficiência do *IGF1R*. O mecanismo de redução da

expressão pode estar associado às alterações intrônicas fora das regiões flanqueadoras, defeitos em fatores de transcrição importantes para a expressão do *IGF1R* e/ou alteração na expressão de microRNAs que poderiam resultar em redução do RNAm do *IGF1R* e consequente redução deste receptor e da sinalização induzida por IGF-1 ^[42]. Novos estudos são necessários para maior esclarecimento da causa da redução da expressão do *IGF1R* nesta linhagem celular.

5.3. Análise das linhagens SGA3 e SGA4

As duas linhagens de fibroblastos dos pacientes com redução da expressão do *IGF1R* em leucócitos periféricos (SGA3 e SGA4), de forma semelhante ao observado na linhagem SGA2, apresentaram redução da expressão e do conteúdo proteico do *IGF1R*, além da menor capacidade de proliferação e de ativação da via PI-3K em relação ao controle. O estudo da região codificadora do *IGF1R* destes pacientes foi normal, porém a expressão relativa deste gene em leucócitos foi comparável à observada em uma paciente com monossomia do *IGF1R*. A região promotora proximal (900 pb) e as regiões intrônicas flanqueadoras dos exons também foram sequenciados, não sendo identificadas mutações nestas regiões. Em semelhança ao discutido para linhagem SGA2, este achado inédito poderia ser justificado pela presença de mutações em regiões intrônicas não avaliadas que poderiam alterar o processo de “*splicing*”, por defeitos em fatores de transcrição críticos para a síntese do *IGF1R*, perfis distintos de

metilação na região promotora e ainda por alterações de microRNA, que poderiam ser responsáveis por degradar o RNAm do *IGF1*. Todas estas possibilidades ainda necessitam de caracterização em estudos futuros.

Até o momento apenas os pacientes com deleções em heterozigose no cromossomo 15q no *IGF1R*^[12], quanto naqueles com mutações *nonsense*^[11] e 19Dup do *IGF1R*^[24], apresentam comprometimento na expressão do RNAm e de sua proteína, apesar de todas as mutações heterozigotas do *IGF1R* descritas levarem ao comprometimento das vias de sinalização do IGF-1R. Nossos achados suscitam interessantes especulações, pois, mesmo em pacientes sem mutações na região codificadora do *IGF1R*, a expressão reduzida deste gene pode estar envolvida no retardo de crescimento pré-natal e de sua persistência pós-natal.

5.4 Avaliação clínica dos pacientes com mutação e diminuição da expressão do *IGF1R*

A análise do fenótipo dos pacientes com mutação ou redução da expressão do *IGF1R* não identificou nenhuma característica peculiar. Foi observada nos pacientes com redução da expressão do *IGF1R* uma liberação de GH acentuada no teste de estímulo farmacológico, com escore-Z do pico de resposta do GH = +1,3 (SGA4) e +2,3 (SGA3) em comparação com crianças saudáveis do nosso ambulatório ^[43]. Este dado corrobora a hipótese de insensibilidade ao IGF-1, causando um menor “feed-back”

negativo deste hormônio sobre a secreção de GH. No entanto, a gravidade do retardo de crescimento pré e pós-natal, assim como os valores de IGF-1 e IGFBP-3 eram semelhantes no grupo de paciente com e sem defeitos identificados no *IGF1R*.

Diferente do observado em pacientes com defeitos no *IGF1*, que apresentam resistência à insulina evidente ^[44], poucos pacientes com mutações no *IGF1R* foram avaliados quanto ao metabolismo de carboidrato, apresentando resultados variáveis: uma paciente de 35 anos com discreta resistência à insulina ^[9] e 4 familiares, onde três apresentavam intolerância à glicose e um com histórico de diabetes gestacional ^[26]. Como observado nestes trabalhos, a mãe da paciente com a mutação p.Arg511Trp também apresenta-se intolerante à glicose. Permanece obscuro o mecanismo pelo qual as mutações no *IGF1R* levam à interferência no metabolismo dos carboidratos, entretanto existem evidências que sugerem a associação entre ter nascido pequeno para a idade gestacional e apresentar reduzida função de células β pancreáticas ^{[45][46]}. Por outro lado, estudos *in vitro* avaliaram a resposta à insulina de fibroblastos de um paciente com mutação no *IGF1R*, demonstraram que a sua haploinsuficiência neste gene leva ao aumento da sensibilidade à insulina. O provável mecanismo deste fenômeno origina-se da diminuição dos receptores híbridos IGF-1R/INSR, os quais não são sensíveis à insulina, em favor do aumento dos holoreceptores de insulina (INSR). Entretanto esta melhora da sensibilidade insulínica, observada *in vitro*, não foi refletida nos testes de tolerância oral à glicose realizada nestes pacientes ^[15].

Como muitos pacientes apresentam dados clínicos e laboratoriais pouco alterados, defeitos do *IGF1R* devem ser suspeitados em casos de crianças nascidas PIG sem recuperação do crescimento na vida pós-natal, principalmente quando associado à microcefalia, atraso leve no DNPM, valores elevados de IGF-1 e/ou com história familiar semelhante sugerindo herança autossômica dominante. Deve-se inicialmente descartar causas conhecidas de RCIU e baixa estatura.

Em um futuro próximo, a disponibilidade de estudos de genética-molecular deverão auxiliar o reconhecimento destes pacientes na prática clínica. Estudos posteriores, avaliando maior número de pacientes com defeitos no *IGF1R*, poderão melhor caracterizar o fenótipo destes pacientes e determinar os benefícios da intervenção terapêutica com rhGH neste subgrupo especial de crianças nascidas PIG, apontando desta forma, opções para evitar possíveis comorbidades ou diminuir estes efeitos.

6 CONCLUSÕES

Demonstramos *in vitro* a presença de insensibilidade parcial ao IGF-1 nas quatro linhagens de fibroblastos estudadas através da menor proliferação e fosforilação de AKT induzida pelo estímulo com IGF-1.

A baixa expressão do *IGF1R* observada em leucócitos periféricos nas linhagens SGA2, SGA3 e SGA4 foi confirmada em fibroblastos tanto em nível de RNAm quanto da sua proteína.

Demonstramos que a insensibilidade ao IGF-1 observada nas linhagens SGA2, SGA3 e SGA4 pode ser causada por menor expressão e consequente síntese de IGF-1R. Em contraste a insensibilidade ao IGF-1 observada na linhagem com a mutação p.Arg511Trp (SGA1) não é causada por alteração da expressão do IGF-1R na superfície celular.

Pacientes com alterações no gene *IGF1R* não apresentam um fenótipo característico que os diferencie de outras crianças nascidas com IUGR sem alterações neste gene, evidenciando, desta forma, a importância dos estudos moleculares nestes pacientes.

7 ANEXOS

Anexo 1 – Lista de reagentes e soluções utilizadas no estudo

1. Meio de cultura:

Aminomax T100 - Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA

AmnioMax™-C100 Supplement - Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA.

BSA (Bovine Serum Albumin)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose 1X - 11965

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Low Glucose 1X - 12320

2. Solução de lise celular:

EDTA 10mm: 1,25mL do 200mM

Trisma base 100mM: 2,5 do 1M

H₂O: completar para 25 mL

Fluoreto de Sódio 10mM: 0,105g

Pirofosfato de Na 100mM: 0,1125g

P40 (1X): 300µl

Deoxicholato de sódio 1% (0,250g)

10mg/mL de aprotina

1mg/mL leupeptina

1mg/mL pepstatina

PMSF (0,035g em 1mL de álcool etílico)

Ortovanato de Na: 250µl da solução 200mM

3. Acrilamida 30%

150g de acrilamida

4g de bis-acrilamida

500mL de água

4. Persulfato de amônio (APS)

250mg APS

2.5mL de água

5. SDS 10% (Lauryl sulphate)

10g de SDS

100mL água

6. Tampão de amostra: pH: 6.5

13.3% SDS

0.42M Tris-base

0.013% bromophenol blue¹⁵

7. Tampão de corrida 4X Ph: 8.3

200mM Tris-base – 24.25g

1.52M Glicina - 114g

EDTA 7.18mM – 2.6g

0.4% SDS - 4g

1L de água

8. Tampão de transferência

25mM Tris-base – 3.025g

192mM glicina – 14.41g

SDS 0.02% - 0.4g

800mL de água

20% metanol

9. PBS + 0.1% Tween: Ph:7.5

11.5g Na_2HPO_4 ou 14.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (80mM)

2.96g NaH_2PO_4 ou 2.75g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (20mM)

5.84g NaCl

1L de água

10. Solução para retitulação de anticorpos da membrana de nitrocelulose

Tris-HCL 10mM pH 7,5

Uréia 8M

β -mercaptoetanol 0,5M

Soro albumina bovina 1,5M

11. Anticorpos usados:

pAKT1/2 (Ser473): Santa Cruz – número de catálogo sc-7985-R

AKT1/2 total (H-136): Santa Cruz – número de catálogo sc-8312

IGF-1R (C-20) subunidade β : Santa Cruz - número de catálogo: sc-713

β -tubulina III: Sigma – número de catálogo T 2200

12. IGF-1 recombinante:

IGF-1 recombinante humano: Chemicon – número de catálogo GF006

13. Kit de quimioluminescência

ECLTM Western blotting :Amershan Pharmacia – número de catálogo RPN2132

14. Kit colorimétrico para proliferação

CellTiter 96® - Promega USA - número de catálogo E3030

15. Kit para obtenção de cDNA

High Capacity cDNA Archive Kit - Applied Biosystems - número de catálogo 432217

16. Kit Taqman[®]

IGF-1R - Hs00181385_m1

17. Kit para determinação de proteínas totais

Kit micro lowry – Sigma - número de catálogo TP0300

18. Kit para concentração de proteínas totais

Ultracel YM-30 – Millipore - número de catálogo 42409

8 REFERÊNCIAS

- [1] Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med.* 1996;335(18):1363-7.
- [2] Gluckman PD. Clinical review 68: The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(4):1047-50.
- [3] Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL. Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res.* 1995;38(2):267-71.
- [4] Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics.* 2003 Jun;111(6 Pt 1):1253-61.
- [5] Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):804-10.

- [6] Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO. Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocrine Reviews*. 2007;28(2):219-51.
- [7] Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P. A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J Med Genet*. 2003;40(12):913-7.
- [8] Coutinho DC, Coletta RR, Costa EM, Pachi PR, Boguszewski MC, Damiani D, et al. Polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal of IGF1 gene exon 6 do not cause pre- and postnatal growth impairment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4889-92.
- [9] Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, et al. Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2855-64.
- [10] Netchine I, Azzi S, Houang M, Seurin D, Perin L, Ricort JM, et al. Partial primary deficiency of insulin-like growth factor (IGF)-I activity associated with IGF1 mutation demonstrates its critical role in growth and brain development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(10):3913-21.
- [11] Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, et al. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med*. 2003;349(23):2211-22.
- [12] Ester WA, van Duyvenvoorde HA, de Wit CC, Broekman AJ, Ruivenkamp CA, Govaerts LC, et al. Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor

- haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4717-27.
- [13] Inagaki K, Tiulpakov A, Rubtsov P, Sverdlova P, Peterkova V, Yakar S, et al. A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(4):1542-8.
- [14] Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi J, et al. Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(8):4679-87.
- [15] Raile K, Klammt J, Schneider A, Keller A, Laue S, Smith R, et al. Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2264-71.
- [16] Walenkamp MJ, van der Kamp HJ, Pereira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, et al. A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3062-70.
- [17] Kruis T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlicke M, Muller E, et al. Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1137-42.
- [18] Wallborn T, Wuller S, Klammt J, Kruis T, Kratzsch J, Schmidt G, et al. A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor

- causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2316-24.
- [19] Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM, Smith RJ. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem.* 1992;267(15):10759-63.
- [20] Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(7):1050-93.
- [21] Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocrine Reviews.* 2001;22(6):818-35.
- [22] Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME. Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocrine Reviews.* 1998;19(5):625-46.
- [23] Dupont J. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *J Horm Res.* 2001;55:22-6.
- [24] Fang P, Schwartz ID, Johnson BD, Derr MA, Roberts CT, Jr., Hwa V, et al. Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor I receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1740-7.
- [25] Fang P, Cho YH, Derr MA, Rosenfeld RG, Hwa V, Cowell CT. Severe short stature caused by novel compound heterozygous mutations of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R). *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):E243-7.

- [26] Mohn A, Marcovecchio ML, de Giorgis T, Pfaeffle R, Chiarelli F, Kiess W. An insulin-like growth factor-I receptor defect associated with short stature and impaired carbohydrate homeostasis in an Italian pedigree. *Horm Res Paediatr*. 2011;76(2):136-43.
- [27] Kawashima Y, Higaki K, Fukushima T, Hakuno F, Nagaishi JI, Hanaki K, et al. Novel missense mutation in the IGF-I receptor L2 domain results in intrauterine and postnatal growth retardation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 *in press*.
- [28] Domene HM, Martinez AS, Frystyk J, Bengolea SV, Ropelato MG, Scaglia PA, et al. Normal growth spurt and final height despite low levels of all forms of circulating insulin-like growth factor-I in a patient with acid-labile subunit deficiency. *Horm Res*. 2007;67(5):243-9.
- [29] van Nieuwpoort IC, Drent ML. Cognition in the adult with childhood-onset GH deficiency. *Eur J Endocrinol*. 2008;159 Suppl 1:S53-7.
- [30] Usher R, McLean F. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr*. 1969;74(6):901-10.
- [31] 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;41(219):454-71.
- [32] Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data*. 2000;8(314):1-27.

- [33] Kamp G. Skin fibroblasts of children with idiopathic short stature show an increased mitogenic response to IGF-I and secrete more IGFBP-3. *Clin Endocrinol.* 2002;56:439-47.
- [34] Schmidt A. Growth failure in a child showing characteristics of Seckel syndrome: possible effects of IGF-I and endogenous IGFBP-3. *Clin Endocrinol.* 2002;57:293-9.
- [35] Okubo Y, Siddle K, Firth H, O'Rahilly S, Wilson LC, Willatt L, et al. Cell proliferation activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(12):5981-8.
- [36] Martin BM, editor. *Tissue Culture Techniques: An Introduction*. Boston: Birkhauser; 1994.
- [37] Tada H. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986;93: 157-65.
- [38] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- [39] Rastogi S, Joshi B, Fusaro G, Chellappan S. Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed cells through a CRM-1-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2006;281(5):2951-9.
- [40] Martoglio B, Dobberstein B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in cell biology.* 1998;8(10):410-5.

- [41] Racchi M, Watzke HH, High KA, Lively MO. Human coagulation factor X deficiency caused by a mutant signal peptide that blocks cleavage by signal peptidase but not targeting and translocation to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1993;268(8):5735-40.
- [42] Jordan SD, Kruger M, Willmes DM, Redemann N, Wunderlich FT, Bronneke HS, et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011;13(4):434-46.
- [43] 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.
- [44] Woods KA, Camacho-Hubner C, Bergman RN, Barter D, Clark AJ, Savage MO. Effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) therapy on body composition and insulin resistance in IGF-I gene deletion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(4):1407-11.
- [45] Ong KK, Petry CJ, Emmett PM, Sandhu MS, Kiess W, Hales CN, et al. Insulin sensitivity and secretion in normal children related to size at birth, postnatal growth, and plasma insulin-like growth factor-I levels. *Diabetologia*. 2004;47(6):1064-70.
- [46] Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*. 2008;359(1):61-73.

Mutações no gene do receptor do fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF1R) como causa de retardo do crescimento pré- e pós-natal

Mutations in insulin-like growth factor receptor 1 gene (IGF1R) resulting in intrauterine and postnatal growth retardation

Andréa de Castro Leal¹, Ana Pinheiro Machado Canton²,
Luciana Ribeiro Montenegro¹, Débora Cabral Coutinho¹,
Ivo Jorge Prado Arnhold¹, Alexander Augusto de Lima Jorge²

SUMÁRIO

Aproximadamente 10% das crianças nascidas pequenas para a idade gestacional (PIGs) não apresentam recuperação espontânea do crescimento. As causas desse déficit de crescimento pré-natal e sua manutenção após o nascimento ainda não são completamente conhecidas na maioria dos casos. Nos últimos oito anos, diversas mutações inativadoras e deleções do gene *IGF1R* em heterozigose foram relatadas, indicando o papel de defeitos no eixo IGFs/IGF1R como causa do déficit de crescimento. Postula-se que pelo menos 2,5% das crianças nascidas PIGs possam apresentar defeitos no gene *IGF1R*. O quadro clínico desses pacientes apresenta grande variabilidade quanto à gravidade do retardo de crescimento e aos parâmetros hormonais. Nos casos mais evidentes, os pacientes apresentam microcefalia, déficit cognitivo leve e valores elevados de IGF-1, associados à baixa estatura de início pré-natal. Esta revisão abordará os aspectos clínicos, moleculares e do tratamento da baixa estatura com hrGH de crianças com mutações no *IGF1R*. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55(8):541-9

Descritores

Receptor do fator de crescimento insulina-símile 1; mutação; retardo do crescimento intrauterino; transtornos do crescimento; crianças nascidas pequenas para a idade gestacional

SUMMARY

Approximately 10% of children born small-for-gestational age (SGA) do not show spontaneous growth catch-up. The causes of this deficit in prenatal growth and its maintenance after birth are not completely known, in most cases. Over the past eight years, several heterozygous inactivating mutations and deletions in *IGF1R* gene have been reported, indicating the role of defects in the IGFs/IGF1R axis as a cause of growth deficit. It has been hypothesized that at least 2.5% of children born SGA may have *IGF1R* gene defects. The clinical presentation of these patients is highly variable in the severity of growth retardation and hormonal parameters. In the most evident cases, patients have microcephaly, mild cognitive impairment and high levels of IGF-1, associated with short stature of prenatal onset. This review will describe the clinical, molecular and treatment of short stature with hrGH of children with mutations in the *IGF1R* gene. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55(8):541-9

Keywords

Insulin-like growth factor I; receptor; IGF type 1; mutation; fetal growth retardation; growth disorders

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 20% das crianças com baixa estatura apresentaram deficiência de crescimento

intrauterino (RCIU) (1). O termo RCIU refere-se ao crescimento fetal atenuado e frequentemente resulta no nascimento de uma criança pequena para a idade

¹ Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil
² Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM/25, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas, FMUSP, SP, Brasil

Correspondência para:
Alexander Augusto de Lima Jorge
Faculdade de Medicina da USP
(LIM-25)
Av. Dr. Arnaldo, 455, 5º andar, sala 5340
01246-903 – São Paulo, SP, Brasil
alex@usp.br ou alex@pq.cnpq.br

Recebido em 15/Out/2011
Aceito em 20/Out/2011

gestacional (PIG) (2,3). A maioria das crianças nascidas PIGs apresenta recuperação espontânea do crescimento na vida pós-natal, com normalização da sua estatura ao redor do segundo ano de vida, quer nascidas prematuras ou a termo. Entretanto, 10% a 15% de crianças nascidas PIGs permanecem baixas, apresentando Z da altura inferior a -2. As causas desse déficit de crescimento pré-natal e sua manutenção após o nascimento ainda não são completamente conhecidas (1,2,4).

A fisiologia do crescimento pré-natal difere consideravelmente daquela do crescimento pós-natal. O hormônio do crescimento (GH, *growth hormone*) e o fator de crescimento insulina-símile tipo 1 (IGF-1, *insulin-like growth factor 1*) compõem o principal sistema endócrino regulador do crescimento linear durante a infância. Entretanto, na vida pré-natal, o GH exerce pouco efeito sobre o crescimento fetal (5). Nessa fase, o IGF-1 e o fator de crescimento insulina-símile tipo 2 (IGF-2, *insulin-like growth factor 2*), de maneira independente da secreção de GH, são os principais fatores endócrinos determinantes do crescimento. Os efeitos biológicos desses IGFs são mediados pelo receptor de IGF tipo 1 (IGF-1R) durante todas as fases da vida (6).

O envolvimento do sistema IGFs/IGF-1R como causa genética da baixa estatura em crianças nascidas PIGs foi comprovado em 1996 por Woods e cols., que descreveram o primeiro paciente com defeito no gene *IGF1*, o qual apresentava deleção em homozigose dos éxons 4 e 5 desse gene (5). Posteriormente em 2003, Bonapace e cols. descreveram um paciente que apresentava uma troca de T→A na região 3' não traduzida do éxon 6 do *IGF1* (região reguladora do processo de poliadenilação) (7), porém essa alteração foi identificada por Coutinho e cols. em indivíduos controles (8). Já em 2005, Walenkamp e cols. identificaram uma mutação homozigota que causa a troca do aminoácido valina por metionina na posição 92 da proteína do IGF-1 (c.274 G>A, p.V92M), levando à formação de uma molécula biologicamente inativa (9). Recentemente, foi descrita mutação homozigota *missense* que causa a troca do aminoácido arginina por glutamina na posição 84 (c.251 G>A, p.R84Q), ocasionando prejuízo da atividade mitogênica do IGF-1 e de sua ligação ao receptor IGF-1R (10). Dos quatro pacientes descritos, três apresentavam características comuns: baixo peso e comprimento ao nascimento, baixa estatura importante na idade adulta, microcefalia, micrognatia, surdez neurossensorial e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM). O quarto paciente apresentava quadro clínico menos grave.

Laboratorialmente, apresentavam valores normais ou elevados de GH, com concentrações de IGF-1 indetectáveis nos casos de mutações que causavam deficiência de IGF-1 ou elevado no caso do paciente com IGF-1 biologicamente inativo. Apesar dessas descrições isoladas, defeitos no IGF-1 são uma causa rara de RCIU (8).

Em contraste, mutações inativadoras e deleções do gene do *IGFIR* em heterozigose vêm sendo relatadas de forma crescente nos últimos oito anos em pacientes com história de déficit de crescimento pré- e pós-natal (11-18). Postula-se que pelo menos 2% a 3% das crianças nascidas PIGs poderiam apresentar defeitos no *IGFIR* (12). O quadro clínico desses pacientes apresenta grande variabilidade quanto à gravidade do retardo de crescimento pré- e pós-natal e aos parâmetros hormonais. Esta revisão abordará os aspectos clínicos, moleculares e do tratamento da baixa estatura com hrGH de crianças por mutações no *IGFIR*.

RECEPTOR 1 DA IGF (IGF1R) – DO GENE À PROTEÍNA

O IGF-1R humano é codificado por um único gene (*IGFIR*, NM_147370) com tamanho de 307 quilobases e organizados em 21 éxons, localizado na região distal do braço longo do cromossomo 15, posição 25-26 (15q25-26) (19). Possui um único sítio de início de transcrição. Os éxons 1 a 11 codificam a região 5' não traduzida, o peptídeo sinal e a subunidade α , enquanto os éxons 12 a 21 codificam a subunidade β do *IGFIR* (Figura 1). O éxon 14 codifica a porção transmembrânica do receptor, enquanto os éxons 16 a 21 codificam o domínio tirosina-quinase intracelular. O final do éxon 21 codifica ainda a região 3' não traduzida. O sítio de clivagem é codificado pelo éxon 11 e nessa região o pró-IGF-1R é clivado em subunidades α e β (Figura 1). O *IGFIR* possui dois transcritos resultantes de um "splice" alternativo no éxon 14 (região codificadora da porção extracelular da subunidade β): o primeiro transcrito corresponde à sequência íntegra de cDNA e o segundo difere do primeiro pela perda de três nucleotídeos (CAG) a partir da posição 2829 do cDNA (19).

O IGF-1R é sintetizado como um peptídeo de cadeia única (pré-pró-receptor), contendo os 30 resíduos do peptídeo sinal e o sítio de clivagem (Arg₇₀₈ – Lys₇₀₉ – Arg₇₁₀ – Arg₇₁₁). Durante sua transferência para o retículo endoplasmático, ocorre a retirada dos 30 resíduos do peptídeo sinal formando o pró-IGF-1R. Os monômeros de pré-receptor sofrem modifica-

ções pós-traducionais com o adequado enovelamento da proteína, formação de pontes dissulfídicas e, após a aminoglicosilação, são transportados para o complexo de Golgi. No interior dessa organela, a maturação do pró-receptor é completada por glicosilação terminal e clivagem do pró-receptor pela protease Furina, resultando na glicoproteína heterotetramérica $\alpha 2\beta 2$ madura (20). Todo esse processo é essencial para que o receptor maduro possa ser transportado à superfície celular para exercer suas funções biológicas.

O IGF-1R é uma glicoproteína transmembrânica que se liga com maior afinidade ao IGF-1 e com menor afinidade ao IGF-2 e à insulina. Estruturalmente, é semelhante ao receptor de insulina com aproximadamente 50% de homologia na sequência de aminoácidos. Ambos são receptores tirosina-quinase com-

postos de duas subunidades α extracelulares, contendo um sítio de ligação ao ligante e duas subunidades β intracelulares com atividade tirosina-quinase intrínseca (21). Enquanto o receptor de insulina confere preferencialmente sinalização que mantém a homeostase metabólica, o IGF-1R tem seu principal papel na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular, regulando, dessa forma, o crescimento longitudinal e do organismo.

A ligação do IGF-1 ao seu receptor promove a ativação da sua atividade tirosina-quinase intrínseca, resultando na autofosforilação em sítios de tirosina. Por sua vez, as tirosinas fosforiladas (pY) servem como sítios acopladores de proteínas intracitoplasmáticas que contêm domínios de reconhecimento dessas pY, conhecidos como domínios SH2 (Figura 2). A

Figura 1. Estrutura do IGF1R. Os éxons são representados pelas barras preenchidas.

Figura 2. Transdução do sinal do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). MAPK: Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase; PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase; ERK: extracellular signal-regulated kinase; AKT: V-akt murine thymoma viral oncogene homolog; JNK: Jun kinase; GDP: guanosine diphosphate; GTP: guanosine triphosphate; IRS: insulin receptor substrate; MEK: mitogen extracellular kinase; PDK: phosphoinositide-dependent kinase; PH: pleckstrin homology domain; PTEN: phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; SHC: Src homology collagen; SHP: Src homology phosphatase; Grib2: growth factor receptor-bound protein 2; SOS 1: son of sevenless 1; RAF: murine sarcoma viral oncogene homolog; RAS: rat sarcoma viral oncogene homolog; p85 e p110: subunidades 85 e 110 da phosphatidylinositol 3 kinase [adaptado de Dupont and LeRoith (23)].

principal proteína ativada pelo IGF-1R é o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1, *insulin receptor substrate 1*), uma fosfoproteína hidrofílica que pode recrutar e regular a atividade de outras proteínas intracelulares. A IRS-1 funciona como uma molécula adaptadora, ativando cascatas de sinalização associadas a receptores tirosina-quinases. Uma das principais vias de sinalização do IGF-1R é a via denominada proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), responsável principalmente pelos efeitos proliferativos das IGFs (22). Outra via de sinalização do IGF-1R ocorre por ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*), responsável pelos principais efeitos metabólicos estimulados pelas IGFs, como a captação de glicose via GLUT4 e a síntese de glicogênio, efeitos idênticos aos promovidos pela insulina ao se ligar ao seu receptor (23).

MODELOS ANIMAIS DE DEFEITOS NO SISTEMA IGFs/IGF1R

Nos últimos 13 anos, uma série de experimentos com animais transgênicos identificou a importância do IGF-1, IGF-2, da insulina e de seus respectivos receptores na regulação do crescimento fetal (Tabela 1). Tanto o *nocaute* em homozigose para *Igf1* como para *Igf2* determinaram importante retardo de crescimento intrauterino (redução de 40% do peso em relação ao controle), mostrando a importância desses dois hormônios no crescimento fetal (24,25). O *nocaute* duplo do *Igf1*+*Igf2* ocasionou déficit de crescimento mais grave e semelhante ao *nocaute* em homozigose do *Igf1r* (redução de 70% do peso no nascimento). Porém, os animais *nocautes* homozigotos para o *Igf1r* morreram logo após o nascimento por insuficiência respiratória. Por sua vez, os animais *nocautes* heterozigotos para o *Igf1r* são fenotipicamente normais no nascimento. O *nocaute* do *Igf1* ou *Igf2*, associado ao *nocaute* do *Igf1r*, não se diferenciou do *nocaute* isolado *Igf1r*, sugerindo a ação predominante desses dois hormônios por meio do IGF-1R na determinação do crescimento fetal (24). Os animais apresentavam, além do RCIU, alta mortalidade perinatal por problemas respiratórios e hipoplasia de diversos órgãos (SNC, pele, músculo e esqueleto). *Nocautes* de outros hormônios e receptores (como insulina e GH) influíram de forma menos expressivas no desenvolvimento pré-natal (26).

Tabela 1. Fenótipo em relação ao crescimento pré-natal de diversos modelos animais com *nocaute* em diversos genes

Gene deletado	% do peso no nascimento em relação ao controle	Referência
<i>Igf1</i>	60	(24,25)
<i>Igf2</i>	60	(27)
<i>Igf1/Igf2</i>	30	(24)
<i>Igf-1R</i>	45	(24)
<i>Igf1/IGF-1R</i>	45	(24)
<i>Igf2/IGF-1R</i>	45	(24)
<i>Insulina</i>	78	(28)
<i>Ir</i>	78	(26,29,30)
<i>Ghr</i>	83	(31)

r: ratão.

MUTAÇÕES NO GENE DO IGF1R

As primeiras mutações no gene *IGF1R* foram descritas em 2003 por Abuzzahab e cols. Nestes últimos oito anos, nove famílias (28 indivíduos) foram identificadas com mutações nesse gene. Desses 28 indivíduos, 10 apresentavam mutação *nonsense* e 18 apresentavam mutações *missense*, quase todas em heterozigose simples, excetuando um único paciente heterozigoto composto para duas mutações *missense* (Tabela 2). Além dessas mutações de ponto, diversos relatos de pacientes com deleções completas do *IGF1R*, algumas secundárias a aberrações cromossômicas, foram descritos nesse período (12).

Foram duas as mutações descritas por Abuzzahab e cols. (11). A primeira em heterozigose composta no éxon 2, com a troca de arginina por glutamina no aminoácido 138 (p.R138Q) e troca de lisina por asparagina no aminoácido 145 (p.K145N). Em conjunto, essas alterações levaram a menor afinidade de ligação do IGF-1 pelo IGF-1R, causando redução na ativação do receptor. A segunda mutação era em heterozigose simples no éxon 2, com a troca de arginina por um códon de parada prematura (*stop codon*) no aminoácido 89 (p.R89X), ocasionando proteína truncada sem função (11,15).

Em 2005, Kawashima e cols. descreveram mutação em heterozigose no éxon 11 do *IGF1R*, havendo troca de arginina por glutamina no aminoácido 739 (p.R739Q) (14). Essa alteração leva à diminuição do processamento do pro IGF-1R para IGF-1R por alterar o sítio de clivagem. A mutação p.R511Q, descrita por Inagaki e cols. em 2007, resulta na troca da arginina por glutamina no códon 511 da proteína (13). Esse resíduo corresponde ao domínio N-terminal da fibronectina tipo III do IGF-1R e está localizado próximo à

primeira ponte dissulfídica entre as duas subunidades α . Os estudos funcionais dessas mutações demonstraram que não havia prejuízo na afinidade do receptor pelo IGF-1, mas foi evidenciada diminuição da autofosforilação do IGF-1R mutado e da síntese de DNA estimulada pelo IGF-1 nas linhagens de fibroblastos obtidos dos pacientes com as mutações. Essas evidências corroboram a hipótese de que a alteração conformacional e na estrutura do receptor prejudica a transdução do sinal após sua ligação ao IGF-1.

Walenkamp e cols. descreveram mutação no éxon 16 do gene *IGFIR* em 2006, levando a troca de ácido glutâmico por lisina na posição 1050 da proteína

(p.E1050K) (13). A mutação p.G1155A foi descrita por Kruis e cols. em 2010 e encontra-se localizada no éxon 19, havendo troca da glicina pela alanina no códon 1155 (32). Ambas as mutações ocorrem no resíduo de aminoácido altamente conservado, localizado no domínio tirosina-quinase intracelular, ocasionando menor autofosforilação do receptor mutado e, consequentemente, redução na ativação de ERK (pela via MAPK) e AKT (pela via PI3K); porém a expressão do IGF-1R e sua afinidade ao ligante não ficaram comprometidas.

Wallborn e cols. em 2010 descreveram mutação do gene *IGFIR* levando à troca de timina por adenina na posição 1886, resultando na mudança do aminoácido

Tabela 2. Dados clínicos e laboratoriais das sete famílias com mutação heterozigota do *IGF1R*

Família	Paciente	Mutação	Ao nascimento		Microcefalia	Atraso no DNPM	Z de altura	Avaliação hormonal			Referência
			Z do peso	Z do comprimento				IGF-1	IGFBP-3	Pico de GH ($\mu\text{g/L}$)	
1A	Indice	p.R138Q/K145N	-3,5	N.D.	N.D.	Sim	-4,8 ¹	Normal	Elevado	51	(11)
1B	Mãe	p.K145N	-2,0	N.D.	N.D.	N.D.	-1,6 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(11)
1C	Pai	p.R138Q	-2,0	N.D.	N.D.	N.D.	-2,8 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(11)
2A	Indice	p.R89X	-3,5	-5,8	Sim	Sim	-2,6 ¹	Normal	Normal	5,7	(11,15)
2B	Irmão	p.R89X	-2,7	-2,1	Sim	Sim	-3,2 ¹	Normal	Normal	9,8	(11,15)
2C	Mãe	p.R89X	-2,6	-1,6	Não	N.D.	-2,6 ²	Normal	N.D.	N.D.	(11,15)
3A	Indice	p.R739Q	-1,5	-1,0	N.D.	Sim	-2,1 ¹	Normal	Normal	N.D.	(14)
3B	Mãe	p.R739Q	-1,6	N.D.	N.D.	N.D.	-2,9 ²	Normal	Normal	N.D.	(14)
4A	Mãe	p.E1050K	-2,1	-0,3	Sim	Não	-4,0 ²	Normal	Normal	20	(16)
4B	Filha	p.E1050K	-3,3	-4,2	Sim	Sim	-2,3 ¹	Elevado	Normal	74	(16)
5A	Indice	p.R511Q	-4,9	-3,1	N.D.	Não	-5,0 ¹	Elevado	Elevado	10,6	(13)
5B	Tia	p.R511Q	N.D.	N.D.	N.D.	Não	-5,0 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(13)
6A	Indice	p.G1155A	-1,8	-1,8	Sim	Não	-3,3 ¹	Normal	Normal	21	(32)
6B	Irmão	p.G1155A	-1,9	N.D.	Não	N.D.	-2,3 ¹	N.D.	N.D.	N.D.	(32)
6C	Mãe	p.G1155A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-3,9 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(32)
6D	Tio	p.G1155A	-2,2	-1,4	Não	N.D.	-1,6 ¹	N.D.	N.D.	N.D.	(32)
6E	Avô	p.G1155A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-2,8 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(32)
6F	Prima	p.G1155A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-2,8 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(32)
6G	Prima	p.G1155A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-2,5 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(32)
7A	Indice	p.V629E	-2,2	-1,8	Sim	Sim	-2,1 ¹	Elevado	Normal	N.D.	(33)
7B	Mãe	p.V629E	-2,2	-2,3	Sim	N.D.	-3,3 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(33)
8A	Indice	c.3348_3366 dup19	-2,2	-0,63	Sim	Não	-3,6 ¹	Normal	Normal	9,1	(34)
8B	Mãe	c.3348_3366 dup19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-4,6 ²	N.D.	N.D.	N.D.	(34)
8C	Irmã	c.3348_3366 dup19	-3,8	N.D.	N.D.	N.D.	-1,9 ¹	N.D.	N.D.	N.D.	(34)
9A	Indice	p.Y387X	-2,0	-3,1	Não	Não	-4,9 ²	+1,0	N.D.	N.D.	(35)
9B	Irmã	p.Y387X	-1,7	-2,9	N.D.	Não	-1,8 ²	+1,1	N.D.	N.D.	(35)
9C	Tia paterna	p.Y387X	-1,9	-1,8	N.D.	Não	-2,8 ²	-0,9	N.D.	N.D.	(35)
9D	Tia materna	p.Y387X	-2,4	-2,3	N.D.	Não	-3,2 ²	+0,2	N.D.	N.D.	(35)

N.D.: não disponível. ¹: na infância; ²: na vida adulta.

valina pelo ácido glutâmico no códon 629 da proteína (p.V629E) (33). Por meio de estudos funcionais, demonstrou-se importante prejuízo na fosforilação do IGF-1R, na via de sinalização da PI3K e na expressão do IGF-1R na superfície celular. Foi observado também acúmulo do pró-IGF-1R no retículo endoplasmático. Com base nesses achados, pode-se afirmar que essa mutação interfere no tráfego do IGF-1R e, consequentemente, compromete o processamento de seu pró-receptor e sua localização na superfície celular.

Fang e cols. descreveram duplicação de 19 nucleotídeos em heterozigose no éxon 18 do *IGF1R*, ocasionando a mudança no código de leitura (*frameshift*) e formação de códon de parada em um alelo (34). A mais recente mutação encontrada foi descrita por Mohn e cols., tratando-se de troca de timina por adenina em heterozigose na posição 1161, resultando na formação do códon de parada na posição 387 (p.Y387X) (35). O receptor truncado não possui os domínios de fibronectina tanto na subunidade α quanto na β , levando à perda de sua ancoragem na membrana plasmática. Essas mutações resultam na diminuição da proteína IGF-1R e consequente diminuição da ativação da via de sinalização do IGF-1R por meio do mecanismo de decaimento do RNA mensageiro (*nonsense-mediated mRNA decay*) (35).

Em resumo, todas as mutações demonstraram diminuição substancial na autofosforilação da subunidade β do IGF-1R acompanhado por uma redução na ativação de pelo menos uma das duas grandes vias de sinalização, fornecendo evidências moleculares adicionais para uma deficiente resposta celular ao IGF-1. Para alguns casos, esses resultados foram reforçados por estudos funcionais, que demonstraram diminuição da proliferação de fibroblastos dos pacientes. Além do fenômeno de haploinsuficiência, algumas mutações do *IGF1R* podem apresentar efeito dominante negativo, apesar de que esse mecanismo ainda não foi completamente caracterizado nos estudos existentes (36).

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E CLÍNICAS DOS CARREADORES DAS MUTAÇÕES NO IGF-1R

Todos os pacientes com a mutação no *IGF1R* apresentavam peso e/ou comprimento de nascimento abaixo do normal ou no limite inferior da normalidade (Tabela 2), observando-se segregação das mutações com o fenótipo de baixa estatura nas várias famílias estudadas. Além disso, a estatura na infância e idade adulta apresentou grande variabilidade entre os casos descritos, mesmo dentro

da mesma família (Tabela 2). Nas crianças foi observado em praticamente todos os casos atraso na idade óssea ao redor de 1 ano em relação à idade cronológica. A puberdade atrasada foi descrita em três pacientes do sexo feminino (16,32), porém muitos estudos não caracterizaram adequadamente o desenvolvimento puberal. Pacientes com deficiência primária de IGF-1 (33) ou com deficiência de subunidade ácido-lábil (37), que cursam com baixos valores circulantes de IGF-1, também apresentam atraso puberal, sugerindo o papel desse hormônio no mecanismo que regula o início da puberdade.

A microcefalia pode ser considerada como a segunda característica mais comum da resistência ao IGF-1, presente em 67% dos casos avaliados, indicando a importância do sistema IGF-1/IGF-1R no desenvolvimento do sistema nervoso central (38). Porém, o comprometimento cognitivo é muito variável. Ao contrário dos indivíduos com mutações no gene *IGF1*, o comprometimento no DNPM é discreto e não foi descrita surdez neurossensorial em nenhum dos pacientes com defeito no *IGF1R* (5,12). A presença de coeficiente de inteligência (QI) abaixo da média e retardo da fala foi bem caracterizada em seis casos (30%) de mutação heterozigota do *IGF1R* (11,14-16,32,35). Outras características dismórficas foram observadas de forma isolada: clinodactilia (14,3%), face triangular (7,1%), hipo e hipertelorismo (3,6%), boca pequena com lábios finos (10,7%), pavilhão auricular proeminente (3,6%), dedos curtos (10,7%), *pectus excavatum* (3,6%), apagamento do filtro nasal (3,6%) e úvula bífida (3,6%).

A análise das famílias estudadas permite observar que quadros clínicos mais graves estão associados a genótipos de mutações "nonsense" (11,15,35) e nos casos de mutações em heterozigose composta (11), enquanto pacientes heterozigotos simples para mutações "missense", na maioria das vezes, apresentaram formas clínicas mais leves, de difícil identificação. Essa grande variabilidade quanto a gravidade de retardo de crescimento pré- e pós-natal e à presença de características dismórficas e do comprometimento cognitivo dos indivíduos das sete famílias com a mutação do *IGF1R* pode refletir um espectro da atividade remanescente da sinalização do IGF-1 (12,32). Pode-se concluir, dessa forma, que o quadro clínico é compatível com o número de alelos funcionantes do *IGF1R*, corroborando a condição de herança autossômica dominante com fenótipo ou expressividade variável.

Laboratorialmente esses pacientes apresentam grande variabilidade nas concentrações de IGF-1, que va-

riaram de valores normais a discretamente elevados, enquanto os valores de IGFBP-3 encontram-se dentro dos limites da normalidade em praticamente todos os pacientes avaliados (Tabela 2). A secreção de GH, avaliada por testes de estímulo, permite afastar deficiência de GH, porém poucos pacientes apresentam valores nitidamente elevados desse hormônio (11,16,32).

Diferente do observado em pacientes com defeitos no *IGF1*, que apresentam resistência à insulina evidente (9,39), poucos pacientes com mutações no *IGF1R* exibiram diferentes graus de alteração no metabolismo de carboidrato: uma paciente de 35 anos com discreta resistência à insulina (9) e quatro familiares, em que três apresentavam intolerância oral à glicose e um com histórico de diabetes gestacional (35). Permanece obscuro o mecanismo pelo qual as mutações no *IGF1R* levam à interferência no metabolismo dos carboidratos, entretanto existem evidências que sugerem a associação entre ter nascido pequeno para a idade gestacional e apresentar reduzida função de células β pancreáticas (40,41). Por outro lado, estudos *in vitro* que avaliaram a resposta à insulina de fibroblasto de um paciente com mutação no *IGF1R* demonstraram que a sua haploinsuficiência leva ao aumento da sensibilidade à insulina. O provável mecanismo desse fenômeno origina-se da diminuição dos receptores híbridos IGF-1R/INSR, os quais não são sensíveis à insulina, em favor do aumento dos halorreceptores de insulina (INSR). Entretanto, essa melhora da sensibilidade insulínica observada

in vitro não foi refletida nos testes de tolerância oral à glicose realizada nesses pacientes (15).

RESPOSTA AO TRATAMENTO COM rhGH

O uso do rhGH para tratamento de crianças nascidas pequenas para a idade gestacional sem recuperação espontânea do crescimento é aprovado pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), na dose de 0,48 mg/kg/semana, e pela EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medical Products*), que preconiza a dose de 0,22 mg/kg/semana. O tratamento com rhGH em crianças nascidas SGAs é menos efetivo comparado com os pacientes com deficiência de GH, mesmo com doses de rhGH mais altas e início da terapia com a média da idade mais baixa (3,4).

Das sete crianças com haploinsuficiência do *IGF1R*, tratadas com o hormônio do crescimento recombinante humano (rhGH), duas apresentaram resposta satisfatória ao tratamento a curto prazo com ganho em Z de altura de 0,55 e 0,8 após 6 a 12 meses de tratamento (9,11). Cinco outras crianças não obtiveram resposta adequada ao tratamento após um ano de avaliação apesar de altas doses de rhGH utilizada (70 μ g/kg/dia) (Tabela 3). Todos os relatos restringem-se a descrições de tratamento por um pequeno período, não havendo dados quanto à altura final desses pacientes. Dessa forma, não se pode estabelecer um consenso em relação à eficácia do tratamento com rhGH em crianças nascidas SGAs com mutações no *IGF1R*.

Tabela 3. Revisão da literatura de dados laboratoriais e clínicos dos pacientes nascidos pequenos para a idade gestacional e com mutação no *IGF1R* que foram tratados com hormônio do crescimento

Mutação do IGF1R/ referência	p.R138Q/K146N (11)	p.R89X (11, 16)	p.E1060K (16)	p.R611Q (13)	p.V629E (33)	c.3348_3368 dup19 (34)	p.Y387X (36)
Ao nascimento							
IG (semanas)	38	38	39	41	40	40	40
Comprimento (Z)	N.D.	-5,9	-4,2	-4,9	-1,9	-2,2	-3,0
Peso (Z)	-4,3	-3,5	-3,3	-3,1	-2,2	-0,6	-2,0
No início da terapia com rhGH							
Idade (anos)	4,5	6,4	1,6	13,6	7,4	9,6	8
Altura (Z)	-4,0*	-2,5	-2,3	-5,0	-2,0*	-3,6	-4,5*
IGF-1 (Z)	normal*	+1,2	+2,1	elevado*	+2,2	normal	+2,1
Dose de rhGH (μ g/kg/dia)	53	30	47	70	31-36	46	37
Após um ano de terapia com rhGH							
Altura (Z)	-4,0*	-1,9	-1,5*	-5,0*	-2,1	-3,2*	-4,4*
IGF-1 (Z)	elevado*	+1,7	+3,6	elevado*	+2,4	elevado*	n.d.

N.D.: não disponível. *: estimado pelo gráfico de crescimento. *: dados do Z dos valores séricos não foram informados. *: dados avaliados seis meses após o início do tratamento.

CONCLUSÃO

Como muitos pacientes apresentam dados clínicos e laboratoriais pouco alterados, defeitos do *IGFIR* devem ser suspeitados em casos de crianças nascidas PIGs sem recuperação do crescimento na vida pós-natal, principalmente quando associados a microcefalia, atraso leve no DNPM, valores elevados de IGF-1 e/ou história familiar semelhante sugerindo herança autossômica dominante. Deve-se inicialmente descartar causas conhecidas de RCIU e baixa estatura. Em um futuro próximo, a disponibilidade de estudos de genética molecular deverá auxiliar o reconhecimento desses pacientes na prática clínica. Estudos futuros avaliando maior número de pacientes com defeitos no *IGFIR* poderão melhor caracterizar o fenótipo desses pacientes e determinar os benefícios da intervenção terapêutica com rhGH nesse subgrupo especial de crianças nascidas PIGs, apontando, dessa forma, opções para evitar possíveis comorbidades ou diminuir esses efeitos.

Agradecimentos: Este trabalho obteve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp): (05/50144-2 para Luciana Ribeiro Montenegro e 08/57915-2 para Andréa de Castro Leal) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): nº 301477/2009 para Alexander Augusto de Lima Jorge e nº 300982/2009-7 para Alexander Augusto de Lima Jorge).

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

REFERÊNCIAS

- Holken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, DenHartog H, De MuinckKeizer-Schrama SM, Drop SL. Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res*. 1996;39(2):267-71.
- Lee PA, Chermak SD, Holken-Koelega AC, Czernichow P. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics*. 2003;111(6 Pt 1):1253-61.
- Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):804-10.
- Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO. Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocrine reviews*. 2007;28(2):219-51.
- Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*. 1996;335(18):1363-7.
- Gluckman PD. Clinical review 68: the endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(4):1047-50.

- Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P. A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J Med Genet*. 2003;40(12):913-7.
- Coutinho DC, Coletta RR, Costa EM, Pachi PR, Boguszewski MC, Damiani D, et al. Polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal of IGF1 gene exon 6 do not cause pre- and postnatal growth impairment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4889-92.
- Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, et al. Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2955-64.
- Netchine I, Azzi S, Houang M, Seurin D, Perin L, Ricort JM, et al. Partial primary deficiency of insulin-like growth factor (IGF)-I activity associated with IGF1 mutation demonstrates its critical role in growth and brain development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;94(10):3913-21.
- Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, et al. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med*. 2003;349(23):2211-22.
- Ester WA, van Duyvenvoorde HA, de Wit CC, Broekman AJ, Ruivenkamp CA, Govaerts LC, et al. Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4717-27.
- Inagaki K, Tulpakov A, Rubtsov P, Sverdlova P, Peterkova V, Yakar S, et al. A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(4):1542-8.
- Kawashima Y, Kanaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi J, et al. Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4679-87.
- Raile K, Klammt J, Schneider A, Keller A, Laue S, Smith R, et al. Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2264-71.
- Walenkamp MJ, van der Kamp HJ, Pereira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, et al. A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3062-70.
- Kruis T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlikke M, Muller E, et al. Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1137-42.
- Wallborn T, Wüller S, Klammt J, Kruis T, Kratzsch J, Schmidt G, et al. A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2316-24.
- Ward CW, Garrett TP, McKern NM, Lou M, Cosgrove LJ, Sparrow LG, et al. The three dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor. *Mol Pathol*. 2001;54(3):125-32.
- Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(7):1060-93.
- Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocrine Rev*. 2001;22(6):818-35.
- Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME. Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocrine Rev*. 1998;19(5):625-48.

23. Dupont J. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *J Horm Res.* 2001;55:22-6.
24. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993;75(1):59-72.
25. Butler AA, LeRoith D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology.* 2001;142(5):1685-9.
26. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet.* 1996;12(1):108-9.
27. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 1990;345(6270):78-80.
28. Duvillie B, Cordonnier N, Deltour L, Dandoy-Dron F, Itier JM, Monthieux E, et al. Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5137-40.
29. Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, et al. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *Embo J.* 1996;15(7):1542-7.
30. Ueki K, Yamauchi T, Tamemoto H, Tobe K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, et al. Restored insulin-sensitivity in IRS-1-deficient mice treated by adenovirus-mediated gene therapy. *J Clin Invest.* 2000;105(10):1437-45.
31. Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski M, Sun L, Bartke A. Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced IGF-1/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology.* 2005;148(2):851-60. Epub 2004 Oct 21.
32. Kruis T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlicke M, Muller E, et al. Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1137-42.
33. Wallborn T, Wuller S, Klammt J, Kruis T, Kratzsch J, Schmidt G, et al. A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2316-24.
34. Fang P, Schwartz ID, Johnson BD, Derr MA, Roberts CT Jr, Hwa V, et al. Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor I receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1740-7.
35. Mohn A, Marcovecchio ML, de Giorgis T, Pfäeffle R, Chiarelli F, Kiess W. An insulin-like growth factor-I receptor defect associated with short stature and impaired carbohydrate homeostasis in an Italian pedigree. *Horm Res Paediatr.* 2011;76(2):136-43.
36. Inagaki K. A Familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(4):1542-8.
37. Domene HM, Martinez AS, Frystyk J, Bengoles SV, Ropelato MG, Scaglia PA, et al. Normal growth spurt and final height despite low levels of all forms of circulating insulin-like growth factor-I in a patient with acid-labile subunit deficiency. *Horm Res.* 2007;67(5):243-9.
38. van Nieuwpoort IC, Drent ML. Cognition in the adult with childhood-onset GH deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(Suppl 1):S53-7.
39. Woods KA, Camacho-Hubner C, Bergman RN, Barter D, Clark AJ, Savage MO. Effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) therapy on body composition and insulin resistance in IGF-I gene deletion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(4):1407-11.
40. Ong KK, Petry CJ, Emmett PM, Sandhu MS, Kiess W, Hales CN, et al. Insulin sensitivity and secretion in normal children related to size at birth, postnatal growth, and plasma insulin-like growth factor-I levels. *Diabetologia.* 2004;47(6):1064-70.
41. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med.* 2008;359(1):61-73.