DÉBORA CABRAL COUTINHO

**Estudo do gene do fator de crescimento insulina-símile 1
(*IGF1*) e de seu receptor (*IGF1R*) em crianças nascidas
pequenas para a idade gestacional**

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

Co orientador: Prof. Dr. Durval Damiani

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Coutinho, Débora Cabral

Estudo do gene do fator de crescimento insulina-símile 1 (*IGF1*) e de seu receptor (*IGF1R*) em crianças nascidas pequenas para a idade gestacional / Débora Cabral Coutinho. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Co-orientador: Durval Damiani

Descritores: 1.Fator de crescimento insulin-like I/genética 2.Receptor *IGF* tipo 1/genética 3.Mutação/genética 4.Retardo do crescimento fetal/genética 5.Transtornos do crescimento/etiologia 6.Transtornos do crescimento/genética 7.Polimorfismo genético/genética 8.Insuficiência de crescimento/genética

USP/FM/SBD-020/09

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 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CnPQ): Bolsa de doutorado número 142064/2006-5.

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais. Por
todo amor, ensinamentos e apoio
incondicional! Amo muito vocês!

Agradecimientos

A conclusão desta tese representa uma grande conquista, um momento de realização pessoal e profissional. Agradeço a todos que me ajudaram tornando esta caminhada mais fácil e alegre.

A Deus pela vida e por ter me proporcionado serenidade e força nos momentos difíceis desta caminhada.

Aos meus pais, Lisieux e Marden, por todo incentivo, pelo apoio incondicional a todas as minhas escolhas, pelo esforço para me proporcionar uma boa educação e por sempre comemorarem cada conquista por menor que ela fosse. Vocês são os grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui!

Aos meus irmãos, Carlos Marden e Marley, por todo estímulo, apoio, compreensão e pelo excelente convívio do dia a dia, tornando a vida mais leve e tranquila. Agradeço também ao Marley pela correção do português dessa tese!

A minha vovó Lena, por ser o meu anjo da guarda. Suas orações sempre solucionavam problemas mais complicados e indicavam o melhor caminho a seguir.

Aos demais familiares, pela admiração, torcida e momentos de união que fazem compensar qualquer esforço.

Ao meu orientador, Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, por toda atenção dedicada, estímulo, presença constante e pelos ensinamentos

preciosos. O seu conhecimento clínico e científico, sua postura ética e sua dedicação e modo de tratar o paciente foram fundamentais para o meu crescimento profissional. Suas opiniões e conselhos durante estes anos fizeram de você mais do que um orientador, ou chefe, mas um verdadeiro amigo!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Durval Damiani, por ter me apresentado o LIM 42 e ao Alex, abrindo as portas para que este projeto fosse realizado.

Aos assistentes da unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança, Dra. Nuvarte, Dra. Thais, Dr. Vaê, Dr. Hilton, Dr. Hamilton e Dra. Leandra por todos os ensinamentos durante a residência e pelo apoio e incentivo a continuar minha formação acadêmica realizando este doutorado.

A Dra. Berenice, por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte do LIM 42 e por todos os ensinamentos clínicos e científicos que foram fundamentais para o meu crescimento profissional.

Ao Dr. Ivo, pelos comentários e sugestões sempre pertinentes e pelas correções dos textos em inglês.

As doutoras Ana Cláudia e Tânia, pelo constante incentivo, pelos ensinamentos no ambulatório e por suas sugestões sempre valiosas.

As minhas “irmãs” da pós, Luciana Montenegro, Everlayny, Alexsandra, Patrícia, Andréia e Marcela, pelo agradável convívio, pelas conversas e risadas e por me emprestarem o chefe de vez em quando. Agradeço ainda a Lu, pelos ensinamentos de biologia e pela ajuda na bancada.

A Dra. Elaine e a Rocio, por cederem seus pacientes PIG para completar a casuística deste estudo.

Ao Madson, pelos ensinamentos e ajuda com o PCR “Real Time”.

A Tamaya, pela realização do MLPA e pelo estudo da região promotora do *IGF1R* que complementaram este trabalho.

A Letícia, pela amizade e pela ajuda na tradução do resumo desta tese para inglês.

As amigas Camila e Lindiane, pelo companheirismo durante a época da residência, pelos estudos para a prova de título, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo incentivo durante esta caminhada.

As secretárias Nilda, Cris e Ana por sempre estarem disponíveis, facilitando sempre nossa vida no meio de tanta papelada e burocracias.

A Fran, pela sua eficiência na organização dos materiais usados na bancada e por providenciar o famoso cafezinho sempre animando a hora do lanche.

A Cidinha, pelos ensinamentos nas aulas de pipetagem, pelo auxílio na técnica de extração de mononucleares e por prontamente providenciar a compra de “primers”, enzimas, etc... para que este trabalho pudesse ser realizado.

A dona Alzira, pela ajuda na confecção dos géis de agarose.

A Cris Rossi, por sempre se prontificar a aliquotar as amostras de DNA o mais rápido possível e pela companhia agradável durante a extração de mononucleares.

As biólogas, Mirian Nishi e Ana Elisa, pelos ensinamentos de biologia na bancada, sempre dando soluções aos problemas encontrados.

A Emília e Mariana, pela amizade e pelos seqüenciamentos das amostras.

As amigas, Alessandra, Flávia e Ana Carolina, por todos os momentos de descontração, risadas e pelo “ombro amigo” que tornaram estes anos muito mais agradáveis e divertidos.

Aos demais amigos do LIM 42, Ana Paula, Antônio, Beatriz, Carolina, Catarina, Ericka, Frederico, Karina, Larissa, Luciana Brito, Luciani, Maria Estela, Maíra, Milena , Priscila, Regina, Vinícius e os já anteriormente citados pelo clima de amizade, descontração, ajuda mútua, que fazem do LIM 42, um local de trabalho agradável e prazeroso.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	Os fatores de crescimento insulina-símiles (IGFs).....	4
1.2	Genes <i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i> humanos	8
1.3	Mecanismos de ação das IGFs e seus receptores	10
1.4	Modelos animais de retardo de crescimento intra-uterino (RCIU).....	13
1.5	Defeitos nos genes <i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i> em humanos	15
2	Objetivos	18
3	Métodos.....	20
3.1	Considerações éticas.....	21
3.2	Casuística	21
3.2.1	Pacientes	21
3.2.2	Controles	23
3.3	Avaliação hormonal.....	24
3.4	Estudo Molecular	25
3.4.1	Preparação das amostras.....	25
3.4.1.1	Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos.....	25
3.4.1.2	Separação de mononucleares	26
3.4.1.3	Extração de RNA total.....	27

3.4.2	PCR e seqüenciamento do <i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i>	28
3.4.3	Estudo da expressão do <i>IGF1R</i> por PCR em tempo real	32
3.4.4	Detecção das variantes alélicas	34
3.4.4.1	Detecção de variante alélica por digestão enzimática	34
3.4.4.2	Detecção de variantes alélicas por PCR e seqüenciamento.....	34
3.5	Análise Estatística.....	35
3.6	Resumo da Estratégia do Estudo.....	35
4	Resultados	37
4.1	Caracterização dos pacientes	38
4.2	Análise do gene <i>IGF1</i>	40
4.2.1	Variantes alélicas.....	40
4.2.2	Análise do Efeito das Variantes Alélicas sobre o Crescimento.....	42
4.3	Análise do gene <i>IGF1R</i>	46
4.3.1	Análise das Variantes Alélicas.....	46
4.3.1.1	Descrição dos polimorfismos	46
4.3.1.2	Descrição das variantes alélicas encontradas	47
4.3.1.3	Descrição dos pacientes com novas variantes alélicas	48
4.3.2	Análise da expressão do <i>IGF1R</i>	53
4.3.2.1	Características dos pacientes com redução da expressão do <i>IGF1R</i> em leucócitos periféricos	56
5	Discussão.....	62
6	Conclusões.....	71
7	Anexos	74
8	Referências	83

Lista de Abreviaturas

AIG	adequado para idade gestacional
ALS	subunidade ácido lábil
aGnRH	análogo do hormônio liberador de gonadotrofina
AKT	serina/tirosina quinase
C1	controle 1
C2	controle 2
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPM	desenvolvimento neuropsicomotor
DP	desvio padrão
ERK	quinases extracelulares sinalizadoras
F	feminino
GHR	receptor de hormônio de crescimento
H2O MiliQ	água destilada e deionizada
hGH	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
IGF-2R	receptor do fator de crescimento insulina-símile tipo 2
IGFBPs	proteínas ligadoras de IGFs (IGF “binding proteins”)
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
KO	nocaute
M	masculino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PBS	“phosphate buffer saline”
PI3K	fosfatidilinositol 3 quinase
PIG	pequeno para a idade gestacional
pY	tirosina fosforilada
RCIU	retardo de crescimento intra-uterino
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SNC	sistema nervoso central
Stat5a/b	“signal transducers and activator of transcription” a e b
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> enzima polimerase
TORSCH	toxoplasma, vírus da rubéola, sífilis , citomegalovírus e herpes vírus

Lista de Símbolos

cm/ano	centímetros por ano
cm ²	centímetros quadrados
cm	centímetros
g	gramas
Kb	kilobase
KDa	kilodalton
mg/L	miligramas por litro
nm	nanômetros
ng/mL	nanogramas por mililitros
Nm	nano molar
rpm	rotações por minuto
<	menor
>	maior que
=	igual
≤	menor igual
≥	maior igual
µg/kg/dia	microgramas por kilo por dia

Lista de Figuras

Figura 1:	Representação esquemática do gene <i>IGF1</i>	8
Figura 2:	Vias de sinalização para IGF-1 e Insulina.....	12
Figura 3:	Fluxograma esquematizando a estratégia de estudo utilizada.....	36
Figura 4:	Representação esquemática das variantes alélicas encontradas na região 3' não traduzida do exon 6 do gene <i>IGF1</i>	41
Figura 5:	Freqüência das variantes alélicas do exon 6 do <i>IGF1</i> em crianças nascidas PIG x indivíduos-controle nascidos AIG.	43
Figura 6:	Freqüência das variantes alélicas do exon 6 do <i>IGF1</i> em crianças PIG com e sem “catch-up”	43
Figura 7:	Altura adulta de controles normais nascidos adequados para idade gestacional homozigotos para o alelo selvagem (WT) ou carreadores de uma ou duas cópias das variantes alélicas A, B ou C do exon 6 do <i>IGF1</i>	45
Figura 8:	Heredograma da família com a variante p.G6R.....	50
Figura 9:	Heredograma da família com a mutação p.R511W	52
Figura 10:	Análise da expressão do <i>IGF1R</i> em leucócitos periféricos	54
Figura 11:	Representação esquemática da região amino-terminal do pré-pró-IGF-1R	67
Figura 12:	Alinhamento do <i>IGF1R</i> de diversas espécies mostrando que o aminoácido glicina na posição 6 é bem conservado.	67
Figura 13:	Alinhamento do <i>IGF1R</i> de diversas espécies, mostrando que o aminoácido arginina na posição 511 é bem conservado entre estas.....	68

Lista de Tabelas

Tabela 1: Fenótipo em relação ao crescimento intra-uterino de diversos modelos animais com nocaute de diversos genes	14
Tabela 2: “Primers” utilizados para amplificação e seqüenciamento do DNA genômico do <i>IGF1</i>	30
Tabela 3: “Primers” utilizados para amplificação e seqüenciamento do cDNA do <i>IGF1R</i>	31
Tabela 4: “Primers” utilizados para PCR e Seqüenciamento dos Exons 1 e 7 do DNA genômico do <i>IGF1R</i>	32
Tabela 5: Características clínicas das crianças PIG estudadas correlacionando com o gene estudado	39
Tabela 6: Fenótipo das crianças PIG carreadoras dos quatro mais freqüentes genótipos do exon 6 do <i>IGF1</i>	44
Tabela 7: Frequência de polimorfismos encontrados no gene <i>IGF1R</i>	47
Tabela 8: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes PIG selecionados para o estudo do <i>IGF1R</i> comparando as crianças com expressão normal e diminuída deste gene	55

Lista de Anexos

Anexo 1: Características clínicas dos pacientes selecionados	75
Anexo 2: Análise laboratorial dos pacientes selecionados	77
Anexo 3: Artigo publicado no JCEM, dezembro, 2007.....	79

Resumo

Coutinho DC. *Estudo do gene do fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF1) e de seu receptor (IGF1R) em crianças nascidas pequenas para idade gestacional* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 90p.

Crianças nascidas pequenas para a idade gestacional (PIG) apresentam maior risco de permanecerem com baixa estatura na vida adulta. Os fatores de crescimento insulina-símile 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) são os principais fatores endócrinos determinantes do crescimento fetal. Na vida pós-natal o GH, principal hormônio promotor de crescimento, exerce a maior parte de seus efeitos por meio do IGF-1. A grande maioria das ações conhecidas do IGF-1 e IGF-2 são mediadas via receptor tirosina quinase conhecido como receptor tipo 1 de IGFs (IGF-1R). Os objetivos deste trabalho foram estudar os genes *IGF1* e *IGF1R* em crianças nascidas pequenas para a idade gestacional que não recuperaram o crescimento na vida pós-natal. Foram selecionados 145 pacientes nascidos PIG, 72 sem “catch up” e 73 com “catch up”. Em 54 PIG sem “catch up” foi estudado toda a sequência codificadora do gene *IGF1* por meio de PCR e seqüenciamento direto, nos demais PIG sem catch up e nos 73 PIG com “catch up” foi estudado apenas o exon 6 do IGF-1 por PCR e seqüenciamento direto para avaliação de um polimorfismo encontrado nesta região. Nos pacientes que apresentavam concentração sérica de IGF-1 e IGFBP-3 acima da média para idade e sexo e sequência do *IGF1* normal (n=23) foi realizada coleta de sangue periférico com posterior separação de leucócitos mononucleares pelo gradiente de ficoll seguido por extração de RNA pelo método de Trizol[®]. Posteriormente, a partir do RNA, sintetizamos o cDNA (DNA complementar) utilizando primers randômicos. Foi realizado PCR e seqüenciamento direto do cDNA, além de análise da expressão do *IGF1R* por PCR em tempo real. Nenhuma mutação foi encontrada no gene *IGF1*. Entretanto um *locus* altamente polimórfico foi encontrada na região 3' não traduzida do exon 6 deste gene, região esta envolvida no processo de poliadenilação. A frequência das variantes alélicas foi semelhante em PIG com e sem “catch-up” e em controles nascidos AIG. Analisando o fenótipo de pacientes PIG que apresentavam a variante alélica “wild type” ou uma das três variantes alélicas mais frequentemente encontradas, não observamos diferenças significativas entre peso e comprimento ao nascimento, níveis de IGF-1 e crescimento na vida pós-natal. No gene *IGF1R* encontramos duas variantes alélicas nunca descritas previamente. A primeira variante encontrada está localizada no exon 1, em uma região de peptídeo sinal do pro IGF-1R e consiste na troca do nucleotídeo guanina pelo nucleotídeo adenina na posição 16 da região codificadora (c.16G>A), levando a troca do aminoácido glicina por arginina na posição 6 da proteína (p.G6R). A outra mutação encontrada está localizada no exon 7 onde observamos uma troca do nucleotídeo citosina por timina na posição 1531 do cDNA (c.1531 C>T), levando a uma troca de arginina por triptofano na posição 511 do IGF1R (p.R511W). Adicionalmente, foi observada uma expressão do *IGF1R* diminuída em 5 pacientes estudados. Concluimos que as variantes alélicas encontradas na região de poliadenilação do *IGF1* não influenciam significativamente as características ao nascimento e pós-natais

de crianças nascidas PIG ou a altura adulta de indivíduos normais nascidos AIG. O estudo do *IGF1R* identificou duas novas variantes alélicas em heterozigose no gene *IGF1R* e, em cinco pacientes, observamos uma expressão reduzida deste gene. 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.

Descritores: 1.Fator de Crescimento Insulin-Like I 2.Receptor IGF Tipo 1 3.Mutação 4.Retardo do Crescimento Fetal 5.Transtornos do Crescimento 6.Transtornos do Crescimento 7.Polimorfismo Genético 8.Insuficiência de Crescimento.

Summary

Coutinho DC. *Study of insuline-like growth factor gene (IGF1) and its receptor in children Born small for gestational age* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 90p.

Children born small for gestational age (SGA) have a higher risk of remaining short in adulthood. The insulin-like growth factors 1 and 2 (IGF-1 and IGF-2) are the main factors determining endocrine fetal growth. GH is the main promoter of linear growth in the postnatal life, exerting its effects mostly through the IGF-1. The vast majority of known actions of IGF-1 and IGF-2 are mediated by the insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R), a member of the tyrosine kinase receptors family. The aim of this study was to investigate *IGF1* and *IGF1R* genes mutations in children born small for gestational age without catch up growth in postnatal life. We selected 145 patients born SGA, 72 without catch-up and 73 with catch up. The whole coding region of the *IGF1* gene was sequenced in 54 patients without catch-up. In the other SGA children without catch-up and in 73 SGA with catch-up, only the exon 6 of *IGF1* was sequenced to assess the influence of allelic variants present in this region. In patients with normal *IGF1* sequence and IGF-1 and IGFBP-3 serum levels above the mean for age and sex (n = 23) total RNA was extracted from peripheral blood lymphocytes followed by cDNA synthesis with random primers. The *IGF1R* cDNA was amplified using specific primers followed by direct sequencing. *IGF1R* expression was analyzed by real-time PCR. No mutations were found in the *IGF1* gene. However a highly polymorphic sequence was identified in the upstream core polyadenylation signal (UCPAS) located in *IGF1* 3' UTR at exon 6. The frequency of the identified allelic variants was similar in SGA children with and without catch-up and in controls. Furthermore, children homozygous for the wild-type allele and those carrying the allelic variants in homozygous or heterozygous state presented similar weight and length at birth, as well as serum IGF-1 levels and postnatal growth features. Two novel nonconservative allelic variants were identified in *IGF1R* in 23 SGA children (8.7%) in the heterozygous state. The first variant (c.16G>A) was located in the exon one, leading to a substitution of glycine by arginine in the pro-IGF-1R signaling peptide (p.G6R). The second variant was located in exon 7 (c.1531 C>T), leading to a substitution of arginine by tryptophan in the amino acid 511 of the IGF1-R (p.R511W). Moreover, a decreased *IGF1R* expression was observed in 5 of the 23 patients with elevated serum IGF-1 concentrations. We conclude that the UCPAS allelic variants did not significantly influence the birth and postnatal characteristics of children born SGA, neither the adult height of normal individuals born adequate for gestational age. The *IGF1R* study identified two novel allelic variants in two patients and a reduced expression of the *IGF1R* was observed in five patients. Patients with alterations in *IGF1R* did not have a distinctive phenotype when compared with other children born SGA without changes in this gene, indicating the importance of molecular studies.

Descriptors: 1. Insulin-Like Growth Factor I 2. Receptor, IGF Type 1 3. Mutation 4. Fetal Growth Retardation 5. Growth Disorders 6. Polymorphism 7. Failure to Thrive

1 Introdução

O termo PIG (pequeno para a idade gestacional) é utilizado para classificar neonatos que nasceram com peso e/ou comprimento 2 desvios padrão (DP) abaixo da média para a idade gestacional e sexo da população. O termo não se refere ao crescimento fetal, mas sim ao tamanho ao nascimento. O termo “retardo de crescimento uterino” (RCIU) define diminuição na velocidade de crescimento e desenvolvimento fetal. Esse crescimento atenuado freqüentemente, mas não obrigatoriamente, pode resultar no nascimento de uma criança PIG. Aproximadamente 20% das crianças com baixa estatura ao nascimento eram pequenas para idade gestacional (1). 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, quer nascidas prematuras ou a termo (1). Entretanto, 10% a 15% de crianças nascidas PIG permanecem baixas, apresentando Z da altura < -2 (1, 2). As causas desse déficit de crescimento pré-natal e a sua manutenção após o nascimento ainda não são completamente conhecidas

A fisiologia do crescimento pré-natal difere consideravelmente do crescimento pós-natal, sendo que no período pré-natal ocorre uma complexa interação de 3 sistemas distintos que se encontram em íntima interação: mãe, placenta e feto. O crescimento e diferenciação observados no conceito pré-implantação e no período embrionário inicial são relativamente

independentes dos fatores ambientais (ou seja, da mãe e da placenta) dependendo principalmente de fatores genéticos inerentes ao próprio embrião (3). Em contraste, no último trimestre de gestação quando a maior parte da organogênese já se completou, o feto experimenta um crescimento mais acelerado e o ambiente intra-uterino passa a ser de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento normal (3). A habilidade da unidade uteroplacentária em fornecer adequada quantidade de substratos (principalmente glicose, aminoácidos, lactato/corpos cetônicos e oxigênio) é determinante para que o feto expresse o seu potencial genético de crescimento. Durante todas as fases de crescimento fetal, o GH apresenta pequeno efeito sobre o crescimento. O fator endócrino determinante para o crescimento fetal é o sistema IGFs (4). A insulina é também reconhecida como um fator de crescimento importante na determinação do crescimento fetal. Seus efeitos são diretos pelo estímulo da adipogênese e indiretos através de estimular a síntese de IGF-1 (3).

No período pós Natal, o IGF-1 e o IGF-1R continuam a ter um papel fundamental na determinação do crescimento normal, estando o IGF-1 sob a regulação do hormônio de crescimento (“Growth hormone” – GH).

Mutações nos genes *IGF1* (5) e *IGF1R* (6) foram implicadas como causa de retardo de crescimento de início pré-natal e manutenção na vida pós-natal. Defeitos no sistema IGF-1/IGF-1R encontram-se em fase de caracterização e avaliação quanto a sua importância clínica e epidemiológica.

1.1 Os fatores de crescimento insulina-símiles (IGFs)

Os IGFs compreendem uma família de peptídeos importantes no crescimento e desenvolvimento de mamíferos. A sua existência foi pela primeira vez postulada em 1957 por Salmon e Daughaday (7) ao observarem que o GH não exercia seu efeito diretamente no tecido, mas sim por meio de um fator intermediário, presente no soro, inicialmente chamado fator de sulfatação e mais tarde denominado somatomedina. Paralelamente, foram identificados fatores séricos que apresentavam estrutura semelhante à pro insulina e que apresentavam efeitos semelhantes ao da insulina. Subseqüentemente, foi mostrado que estes fatores estimulavam o crescimento e apresentavam propriedades mitogênicas sendo denominados como IGFs. Finalmente em 1983 foi demonstrado que as somatomedinas A e C possuíam a mesma seqüência de aminoácidos que o IGF-2 e IGF-1 respectivamente (8).

O IGF-1 e o IGF-2 apresentam uma expressão ubíqua nos tecidos humanos durante a vida pré e pós-natal, estando envolvidos em diversos mecanismos fisiológicos. As principais ações biológicas dos IGFs podem ser sumarizadas como: ações metabólicas insulina-símile, estímulo à proliferação e diferenciação celular, além de modular a apoptose e a adesão de células (9).

O IGF-2 é expresso de forma constitutiva no início da gestação e possui um papel predominante no crescimento embrionário inicial, enquanto que as concentrações de IGF-1 são baixas no início da vida intra-útero.

Durante este período, o IGF-2 produzido é originado principalmente do alelo paterno do gene *IGF2*, sendo o alelo materno silenciado. O fenômeno da diferença na expressão de genes autossômicos, dependendo da sua origem parental, é conhecido como “imprinting”.

Quando a gestação está mais avançada e a função placentária passa a ser determinante para o crescimento fetal, o IGF-1 assume o papel de principal regulador do crescimento (10). As concentrações de IGF-1 fetal são diretamente influenciados pelo estado nutricional do feto (4). Assim sendo, a regulação da secreção de IGF-1 e a regulação do crescimento é feita pelo eixo glicose-insulina-IGF-1: a placenta transfere glicose para o feto, que estimula a secreção de insulina fetal que, por sua vez, determina a secreção de IGF-1 (3).

Enquanto que, no período pré-natal, o homônimo de crescimento (GH) possui relativamente pouca influência no crescimento fetal, na vida pós-natal, o GH passa a ser o principal regulador da expressão de IGF-1 e o sistema GH/IGF-1, o principal determinante do crescimento linear. O fígado é o principal órgão responsável pela síntese de IGF-1, encontrado na circulação sanguínea. Mas, pela sua produção local nos diversos tecidos, o IGF-1 apresenta também ações autócrina e parácrina.

O IGF-1 presente na circulação e no fluido extracelular encontra-se ligado a uma família de proteínas transportadoras de alta afinidade, as IGFBPs (“IGF-binding proteins”). Atualmente, estão bem caracterizadas do ponto de vista molecular e bioquímico seis IGFBPs, denominadas IGFBP-1 a IGFBP-6. Todas possuem uma homologia significativa em sua seqüência de

nucleotídeos. As IGFBPs regulam a disponibilidade das IGFs para seus sítios de ação no receptor IGF-1R, além de terem funções independentes, modulando as diferentes ações das IGFs a nível autócrino, parácrino e endócrino (11). Em humanos, aproximadamente 80% do IGF-1 circulante está associado a IGFBP-3 na forma de um complexo ternário de 150 KDa, composto por uma molécula de IGF-1, uma molécula de IGFBP-3 e uma molécula da subunidade ácido lábil (ALS). Aproximadamente 20% encontram-se ligados a outras IGFBPs e menos de 5% são encontrados na forma livre (12). O IGF-1 presente no complexo ternário (IGF-1/IGFBP-3/ALS) é incapaz de passar para o compartimento extravascular e desta forma exercer a sua ação nos tecidos alvos. Por este mecanismo, o complexo ternário prolonga a meia vida do IGF-1 circulante livre de 6 horas para 20 horas e modula a sua atividade biológica (12).

A ação endócrina e parácrina do IGF-1 sobre o crescimento é alvo de discussão. Por muitos anos, acreditou-se que o GH regulava o crescimento por estimular a síntese de IGF-1 hepático e este, por sua vez, atuando na cartilagem de crescimento, promovia o crescimento linear, em um típico sistema endócrino. Em 1999, um estudo modificou este paradigma ao demonstrar que camundongos com expressão do *IGF1* silenciada apenas no fígado (nocaute tecido específico) apresentavam crescimento normal a despeito de uma redução em 75% nas concentrações séricas de IGF-1. O crescimento praticamente normal destes animais era garantido apenas pelo IGF-1, produzido localmente, estimulado pela secreção aumentada de GH (13). Este primeiro estudo colocou em dúvida a importância do IGF-1

produzido no fígado e demonstrou que o IGF-1 produzido localmente e agindo de maneira parácrina e autócrina era suficiente para garantir o crescimento normal. Pesquisas subseqüentes mostraram que animais com nocaute combinado do *IGF1* e da subunidade ácido lábil (ALS) hepáticos, ocasionando uma redução de 90% nas concentrações séricas de IGF-1, apresentavam um prejuízo significativo no crescimento pós-natal (12). Este dado sugere que uma redução nas concentrações circulantes de IGF-1, abaixo de determinado limite, tem um impacto sobre o crescimento. Recentemente, um estudo analisou o impacto do nocaute tecido específico do gene das *Stat5a* e *Stat5b* em camundongos. Estes animais apresentam a principal via de sinalização do GH, responsável pela síntese de IGF-1, bloqueada seletivamente no fígado ou no músculo esquelético. Os animais sem a *Stat5* hepática apresentavam concentrações séricas de IGF-1 diminuídas, mas o crescimento era indistinguível dos animais controles. Por outro lado, os animais sem a *Stat5* no tecido muscular, apresentavam um crescimento significativamente menor ao de animais controles, apesar das concentrações séricas de IGF-1 estarem apenas modestamente reduzidos (14). Estes resultados não reduzem a importância do IGF-1 circulante que apresenta ações metabólicas e na regulação da secreção de GH (“feedback” negativo) bem definidos, mas fortalecem muito a idéia de que o IGF-1 produzido localmente sob estímulo do GH, provavelmente em tecido muscular, seja o fator principal para determinar o crescimento linear pós-natal .

1.2 Genes *IGF1* e *IGF1R* humanos

O gene *IGF1* está localizado no braço longo do cromossomo 12, posição 22-23 (12q 22-23) e possui 6 exons. Os exons 1 e 2 são sítios distintos iniciadores da transcrição, e codificam parte do peptídeo sinal. Os exons 3 e 4 são constantes, portanto sempre transcritos e presentes no peptídeo maduro. A presença de “splice” alternativo produz RNAm distintos quanto ao último exon. Portanto teremos 2 RNAs mensageiros principais (Exon 1 ou 2 + Exons 3/4 + Exon 5) e (Exon 1 ou 2 + Exons 3 /4 + Exon 6) e 2 proteínas serão formadas: IGF-1A, que utiliza o exon 5 (10% dos casos e mais presente na vida intra-uterina) e IGF-1B, que utiliza o exon 6 (quase 90% dos IGF-1 transcritos). A escolha do “splicing” com o exon 5 depende principalmente do tipo de tecido e do ambiente hormonal (15).

Figura 1: Representação esquemática do gene *IGF1*. As linhas tracejadas indicam local de “splicing”. O “A” indica o local para ligação da cauda poli “A”.

O IGF-1R humano é codificado por um único gene (*IGF1R*, NM_147370) com 100 kb organizados em 21 exons, localizado na região distal do braço longo do cromossomo 15, posição 25-26 (15q25-26) (16). Possui um único sítio de início de transcrição. 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 subunidade β do *IGF1R* (17, 18). O exon 14 codifica a porção transmembranica do receptor, enquanto que os exos 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 (Arg – Lys – Arg – Arg) está localizado no exon 11 e vai clivar o pro-IGF-1R em subunidades α e β . (18). O *IGF1R* possui 2 transcritos resultantes de um “splice” alternativo no exon 14 (região codificadora da porção extracelular da subunidade β) que corresponde à perda de 3 nucleotídeos (CAG) a partir da posição 2829 do cDNA. (18)

O IGF-1R apresenta estrutura semelhante ao receptor de insulina (“insulin receptor” - IR) com quase 50% de homologia na sequência de aminoácidos, sendo membro da família de receptores de membrana com atividade tirosino quinase (19, 20). Apesar dessas similaridades, esses dois receptores diferem quanto a afinidade pelo ligante e sua distribuição nos tecidos e funções biológicas. O IGF-1R apresenta uma afinidade maior ao IGF-1, seguido pelo IGF-2 e pela insulina; enquanto o IR apresenta afinidade maior a insulina, seguido pelos IGF-2 e IGF-1. (18) A região de maior semelhança de aminoácidos (80 a 95%) entre IGF-1R e IR consiste nos 5 exons que codificam o domínio tirosinoquinase na subunidade β . (18).

O receptor do tipo 2 (IGF-2R) não apresenta homologia com os IGF-1R ou IR. Trata-se de uma proteína monomérica com um grande domínio extracelular, sem atividade tirosino quinase e que contém sítios de ligação para IGF-2 e para manose-6-fosfato. Os mecanismos de sinalização deste receptor ainda não foram elucidados (20).

O IGF-1R está presente na superfície celular como uma glicoproteína transmembranica heterotetramétrica, composto por dois monômeros idênticos de IGF-1R, cada um contendo uma subunidade α e β conectadas por pontes dissulfídicas. As subunidades α são extracelulares e contêm o domínio de ligação ao hormônio. Já as subunidades β são transmembrânicas e intracelulares e contêm os domínios tirosinoquinasas responsável pela ativação de diversas vias de sinalização que caracterizam a sua ação. (9)

1.3 Mecanismos de ação das IGFs e seus receptores

A ligação do IGF-1 à subunidade α do IGF-1R promove a ativação da sua propriedade tirosinaquinase intrínseca, resultando na fosforilação em sítios de tirosina (pY) na porção intracelular da subunidade β . Estas pY atuam como sítios acopladores (“docking sites”) para diversas proteínas intracitoplasmáticas que contêm domínios de reconhecimento conhecidos como domínios SH2 (Figura 2).

Duas principais vias de sinalização são ativadas pela fosforilação em tirosina do IGF-1R: via fosfatidilinositol 3 quinase (PI-3K), cujo efetor final é o ERK (quinases extracelulares sinalizadoras) responsável principalmente pelas ações insulina similar dos IGFs, e via MAPK (“mitogen activated protein kinase”), cujo efetor final é o AKT (serina/treonina quinase), principal modulador dos efeitos proliferativos dos IGFs.

Uma importante proteína recrutada e ativada pelo IGF-1R é o IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina), uma fosfoproteína hidrofílica que pode recrutar e regular a atividade de outras proteínas intracelulares. O IRS-1 funciona como uma molécula adaptadora ativando a cascata de sinalização da via da PI-3K. A PI-3K é composta por 2 subunidades: a p110, considerada como a subunidade catalítica, e a p85, que inibe a atividade catalítica da subunidade p110 e contém dois domínios SH2 que permitem a ligação desta proteína ao IRS-1. A ligação entre a IRS-1 com a subunidade p85 libera a subunidade p110 a exercer sua atividade catalítica de converter fosfolípidos de membrana, como 3,4 inositol fosfato, para inositol trifosfato e outras moléculas lipídicas sinalizadoras. Esses lipídios se combinam com fosfoinosítídeo dependente de quinase para ativar AKT (serina/treonina quinase). AKT, por sua vez, promove síntese de glicogênio e captação de glicose via GLUT4, efeito semelhante ao da insulina (21)

Outra via de sinalização IGF-1R ocorre por ativação do complexo RAS (“Rat sarcoma viral oncogene homolog”) - MAPK (20). Proteínas como a Shc e Grb2 (“Growth Factor Receptor-Bound Protein 2”) são recrutadas pelo IGF-1R ativado. A Grb2 está associada à SOS1 (“Son of sevenless

homolog 1”), proteína que catalisa a conversão de RAS inativo (associado a guanosina difosfato, RAS-GDP) para RAS ativo (associado a uma guanosina trifosfato RAS-GTP). Uma vez ativado, o RAS ativa RAF que, por sua vez ativa MEK e que, por fim, ativa quinases extracelulares sinalizadoras conhecidas como ERK1/2. Estas últimas proteínas atuam como fatores de transcrição e promovem atividades mitóticas e controle de apoptose. (20)

Figura 2: Vias de sinalização para IGF-1 e Insulina (21)

1.4 Modelos animais de retardo de crescimento intra-uterino (RCIU)

Os modelos animais mostram a importância das ações do IGF-1 no crescimento intra-uterino (Tabela 1). Tanto o nocaute em homozigose para *Igf1* como para o *Igf2* determinaram um importante retardo de crescimento intra-uterino (redução de 40% do peso em relação ao controle), mostrando a importância destes dois hormônios no crescimento fetal. O nocaute duplo do *Igf1+Igf2* ocasionou déficit de crescimento um pouco mais grave e semelhante ao nocaute em homozigose do *Igf1r*. (redução de 70% do peso ao nascimento). Porém, os animais nocautes homozigotos para o *Igf1r* morreram alguns minutos após o nascimento por falência respiratória. Por sua vez, os animais nocautes heterozigotos para o *Igf1r* são fenotipicamente normais ao nascimento.

Já o nocaute do *Igf1* ou do *Igf2* associado ao nocaute do *Igf1r* não se diferenciou do nocaute isolado do *Igf1r* sugerindo a ação predominante destes hormônios sobre o IGF-1R na determinação do crescimento fetal. Os animais apresentavam, além do RCIU, alta mortalidade perinatal por problemas respiratórios e hipoplasia de diversos órgãos (SNC, pele, músculo e esqueleto).

Tabela 1: Fenótipo em relação ao crescimento intra-uterino de diversos modelos animais com nocaute de diversos genes

Gene Deletado	% do Peso ao nascimento em relação ao controle	Referência
<i>Igf1</i>	60	(22),(23)
<i>Igf2</i>	60	(24)
<i>Igf1/Igf2</i>	30	(22)
<i>Igf1r</i>	45	(25)
<i>Igf1/gf1r</i>	45	(22)
<i>Igf2/Igf1r</i>	45	(22)
<i>ghr</i>	83	(26)
<i>Insulina</i>	78	(27)
<i>Ir</i>	78	(25),(28), (29)

1.5 Defeitos nos genes *IGF1* e *IGF1R* em humanos

Estudos iniciados em 1996 implicaram defeitos nos genes *IGF1* e *IGF1R* na gênese do déficit de crescimento de crianças nascidas com IUGR. Em 1996, Woods e cols. descreveram o primeiro paciente com defeito no gene *IGF1*, que apresentava deleção em homozigose dos exons 4 e 5 deste gene(30). 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). (31) Mais recentemente, Walekamp e cols. identificaram uma mutação que causa a troca do aminoácido valina por metionina na posição 44 da proteína do IGF-1 (V44M), levando à formação de uma molécula biologicamente inativa (32). Todos esses pacientes 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). Laboratorialmente, apresentavam valores normais ou elevados de GH basal e após estímulo 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.

As primeiras mutações no gene *IGF1R* foram descritas em 2003 por Abuzzahab e cols. O primeiro paciente descrito apresentava uma mutação em heterozigose composta no exon 2, troca de arginina por glutamina no aminoácido 108 (R108Q) e troca de lisina por asparagina no aminoácido 115 (K115N). Em conjunto, estas alterações levavam a uma menor afinidade de

ligação do IGF-1 pelo IGF-1R, causando uma menor ativação do receptor. O segundo paciente descrito por este autor apresentava uma mutação em heterozigose simples no exon 2, troca de arginina por um stop códon no aminoácido 59 (R59X), ocasionando uma proteína truncada sem função. (6)

Em 2005, Kawashima e cols descreveram mais uma mutação em heterozigose no exon 11 do *IGF1R*: uma troca de arginina por glutamina no aminoácido 709 (R709Q). Essa alteração leva a uma diminuição do processamento do pro IGF-1R para IGF-1R (devido à alteração no sítio de clivagem). Os estudos funcionais demonstraram acúmulo de pró-IGF-1R e diminuição da fosforilação da subunidade β do receptor. (33)

Em 2006, Walekamp e cols. descreveram uma mutação no exon 16 do gene *IGF1R*, levando a troca de G $\rightarrow$ A na posição 3148, trocando ácido glutâmico por lisina na posição 1050 da proteína (E1050K). Essa mutação ocorre num resíduo de aminoácido altamente conservado, localizado no domínio tirosina quinase intracelular, o que ocasiona uma menor autofosforilação do receptor mutado levando uma menor ativação de ERK e AKT (34).

A mais recente mutação encontrada foi descrita em 2007 por Inagaki e cols., trata-se de uma troca de G $\rightarrow$ A na posição 1577 no exon 7 do *IGF1R*, resultando na troca de uma arginina por uma glutamina no códon 481 da proteína (R481Q). A arginina na posição 481 é altamente conservada filogeneticamente. Esse resíduo corresponde ao domínio N-terminal fibronectina tipo III do IGF-1R e está localizado próximo à primeira ponte dissulfídica entre as 2 subunidades α . Os estudos funcionais desta mutação

demonstraram que não havia alteração na afinidade do receptor pelo IGF-1, mas foi evidenciada uma diminuição da auto-fosforilação do IGF-1R mutado, provavelmente por uma inabilidade do receptor de mudar sua conformação após a ligação do IGF-1 (35).

No total, foram descritos 12 casos de indivíduos portadores de mutações no IGF-1R em 5 famílias: nove apresentavam mutações “misense”, sendo um paciente heterozigoto composto para 2 mutações; e três apresentavam mutação “nonsense”. Todos os pacientes apresentavam peso de nascimento abaixo do normal ou no limite inferior da normalidade ($Z = -3,5$ a $-1,5$), assim como o comprimento de nascimento ($Z = -5,8$ a $-0,34$). A estatura na infância e na idade adulta também apresentou uma grande variabilidade entre os diversos casos descritos ($Z = -5,7$ a $-1,6$). Microcefalia foi descrita em 2 pacientes (16%) e 5 casos (42%) apresentaram leve atraso de DNPM ou diminuição do coeficiente de inteligência (QI). 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*. Laboratorialmente, esses pacientes apresentam uma grande variabilidade nas concentrações de IGF-1 que variaram de valores normais a elevados ($Z = -1$ a $+2,9$), assim como os valores de IGFBP-3 ($Z = -1$ a $+1,8$) e o pico de GH após estímulo (5,7 a 74 ng/mL).

Por estas razões, propomos estudar o papel dos genes *IGF1* e *IGF1R* na gênese das alterações de crescimento pré e pós-natal, investigando a presença de mutações nas suas regiões codificadoras e alterações na expressão do *IGF1R*.

2 Objetivos

Identificar mutações nos genes *IGF1* e *IGF1R* de crianças nascidas pequenas para a idade gestacional (PIG) que não apresentaram recuperação espontânea do crescimento até o segundo ano de vida.

Analisar a expressão do *IGF1R* em leucócitos mononucleares destas crianças e comparar com a expressão observada deste gene em crianças-controle nascidas adequadas para idade gestacional (AIG) e com um paciente com monossomia do *IGF1R*.

3 *Métodos*

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes, pais ou tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados. O protocolo de estudo foi submetido ao comitê de ética da instituição e aprovado.

3.2 Casuística

3.2.1 Pacientes

De um grupo de 145 pacientes nascidas PIG, sendo 72 sem recuperação espontânea do crescimento pós-natal e 73 com recuperação espontânea, selecionamos 54 crianças sem recuperação, acompanhadas na unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da FMUSP, para o estudo molecular principal. Foram utilizados os seguintes critérios de seleção:

Critérios de Inclusão:

1. Crianças nascidas PIG sem causa aparente, ou seja, Z do peso e/ou comprimento ao nascer abaixo de -2 (36).
2. Ausência de recuperação espontânea do crescimento após o nascimento comprovado por Z da altura < -2,5 em idade superior ou igual a 2 anos de idade (37).

Critérios de Exclusão:

1. Causas materno-placentárias de retardo de crescimento intra-uterino como: hipertensão arterial, diabetes, descolamento prematuro de placenta, tabagismo e TORSCH (toxoplasma, vírus da rubéola, sífilis, citomegalovírus e herpes vírus).
2. Causas conhecidas de baixa estatura após o nascimento como presença de distúrbios genéticos e cromossômicos, desnutrição, doenças hepáticas, doenças sistêmicas, ósseas ou endocrinológicas.

As características clínicas e laboratoriais dos 54 pacientes selecionados para o estudo molecular principal encontram-se nos Anexos 1 e 2, respectivamente.

3.2.2 Controles

Para rastreamento de variantes alélicas identificadas no gene *IGF1*, foram estudados 180 controles, ou seja, indivíduos adultos nascidos adequados para idade gestacional (AIG) e com estatura normal (Z altura = $0,2 \pm 1,1$). Para rastreamento das alterações encontradas no gene *IGF1R* foram estudados 150 controles deste mesmo grupo.

Para análise comparativa da expressão do *IGF1R* em leucócitos dos pacientes nascidos PIG por PCR real time, utilizamos como padrão normal de expressão um pool de cDNA (pool controle), elaborado com amostras obtidas de 3 crianças nascidas AIG com altura normal pra idade e sexo. Ainda usamos 2 amostras como controles adicionais obtidas de 2 crianças nascidas AIG com baixa estatura de início pós-natal (C1 e C2).

Como controle positivo de diminuição da expressão do *IGF1R*, foi obtida amostra de cDNA de uma paciente com hemizigose deste gene. Essa paciente possui uma deleção parcial do braço longo do cromossomo 15 em heterozigose (15q 26.2 – 26.3), compreendendo o locus do *IGF1R*. Aos 17,4 anos apresenta uma altura de 119 cm (Z de altura = -6,8), com baixo peso (Z IMC = -4,8) e microcefalia (Z do perímetro cefálico = -7,2). A análise laboratorial do eixo GH – IGF-1 demonstrou um GH basal de 22,9 $\mu\text{g/L}$ e concentrações diminuídas de IGF-1 e do IGFBP-3 (Z de ambos = -1,6).

3.3 Avaliação hormonal

A dosagem do GH foi determinada por meio de fluoroimunoensaio com anticorpos monoclonais (AutoDELFIA, Wallac, Turku, Finland). Os ensaios foram padronizados com o padrão internacional 80/505 da Organização Mundial de Saúde, e concentrações de 0,1 a 38 ng/ml apresentaram coeficiente de variação interensaio menor do que 10%. O teste da clonidina foi utilizado para avaliar a liberação de GH e concentrações de GH acima de 3,3 ng/ml excluía deficiência de GH, baseado em estudo de crianças normais realizado em nosso laboratório (38).

As concentrações de IGF-I e IGFBP-3 foram determinados por radioimunoensaio (DSL. Webster, TX, USA) ou ensaio de quimioluminescência (IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA).

Os valores de IGF-1 e IGFBP-3 foram expressos como escore de desvio-padrão (Z) em relação ao padrão de normalidade para sexo e idade fornecidos pelos respectivos “kits”.

3.4 Estudo Molecular

3.4.1 Preparação das amostras

3.4.1.1 Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos indivíduos arrolados na pesquisa. Dez mililitros de sangue venoso foram colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se um volume de solução de lise (NH_4Cl a 114 mM, NH_4HCO_3 a 1 mM) duas vezes maior que o volume de sangue, incubado a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 4000 g (Sorvall, RT7, Germany), sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido uma vez.

O botão de células brancas foi suspenso em nove ml de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 180 μL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 μL de proteinase K na concentração de 10 mg/ml (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), e incubado a 37°C por 18 horas. Após este período, 3,6 ml de solução saturada de NaCl a 6 M foi adicionada, seguido de agitação do conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 4000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente

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

3.4.1.2 Separação de mononucleares

Foi obtida uma amostra de sangue periférico (10 mL) de cada paciente selecionado e dos controles. O sangue foi colhido em tubo plástico com vácuo pré-definido para a aspiração exata do volume, revestido com heparina sódica (vacuette®). Em um tubo estéril com fundo cônico de propileno de 50 mL (tipo Falcon) colocamos 10 mL de Ficoll-Paque® (Ficoll-Paque Plus – testado para endotoxinas e utilizado para isolamento de linfócitos – GE Healthcare). Posteriormente colocamos 10 mL de sangue de cada paciente lentamente, sem misturar, utilizando uma pipeta pasteur. Após o preparo dos tubos, foi realizada a primeira centrifugação nas seguintes condições: 1.800 g em temperatura ambiente (20° C) por 30 minutos. Após o término desta centrifugação, já se visualizava uma nítida “nuvem” de linfócitos, que foi aspirada cuidadosamente, utilizando-se uma pipeta pasteur e transferida para um novo tubo estéril com fundo cônico de propileno de 50 mL (tipo Falcon). Adicionamos, então, 10 mL de PBS (“phosphate buffer saline”), e realizamos a segunda centrifugação para remover o excesso de Ficoll-Paque®, plaquetas e proteínas plasmáticas que eventualmente

estivessem na “nuvem” de linfócitos. Essa centrifugação foi realizada nas seguintes condições: 500 g, a 20° C durante 10 minutos. Após esta centrifugação, o “pellet” de linfócitos foi facilmente visualizado, o sobrenadante foi então desprezado com re-suspensão do *pellet* em 5 mL de PBS. Nova centrifugação foi realizada sob as mesmas condições descritas anteriormente. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Após a terceira centrifugação com PBS, desprezamos o sobrenadante e adicionamos 1 mL de trizol® ao *pellet* de linfócitos para proceder à extração do RNA total.

3.4.1.3 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada pelo método do pelo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol®). Após adicionar Trizol® ao “pellet” de linfócitos, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIZOL®, sendo a solução vigorosamente agitada e deixada em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. Após esta centrifugação observou-se a formação de 3 fases da solução: um sobrenadante translúcido contendo o RNA total, uma fase intermediária leitosa (DNA) e uma fase inferior rosada (proteínas).

O sobrenadante foi transferido para novos tubos e acrescentados 500 µL de isopropanolol para precipitação do RNA total. As amostras foram deixadas 10 minutos em temperatura ambiente e depois centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi

desprezado e o “pellet” de RNA foi lavado uma vez com etanol 75% a -20 °C, seguido por centrifugação a 7.500 g por 5 minutos.

Após remoção do etanol por inversão, deixamos o tubo contendo o “pellet” de RNA invertido em temperatura ambiente por 30 minutos para secar. Após este período, o “pellet” de RNA foi suspenso novamente em 50 µL de água livre de RNase e incubamos a 65° por 20 minutos. Duas alíquotas de 5 µL foram obtidas, sendo que uma foi utilizada para quantificação e avaliação da pureza do RNA total extraído em espectrofotômetro, e a outra foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1% com posterior visualização em transiluminador ultravioleta e fotografadas com sistema digital de captura de imagem ou filme Polaroid® para avaliação da integridade do RNA extraído.

O RNA extraído foi então submetido à transcrição reversa (RT – “reverse transcription step”) no qual o DNA complementar (cDNA) é produzido através do uso de “primers” randômicos provenientes do “kit” High Capacity cDNA Archive Kit ® (Applied Biosystems). Uma quantidade semelhante de RNA (16 µg) foi utilizada para RT de todas as amostras.

3.4.2 PCR e seqüenciamento do *IGF1* e *IGF1R*

Pares de “primers” foram desenhados para amplificar toda a região codificadora do *IGF1* e do *IGF1R*. As condições de amplificação foram padronizadas e as seqüências dos pares de “primers” utilizados na amplificação dos genes *IGF1* e *IGF1R*, assim como os tamanhos dos

respectivos produtos de amplificação e a temperatura de “annealing”, estão representados nas tabelas 2 e 3.

Os seis exons do gene do *IGF1* foram amplificados e seqüenciados a partir do DNA genômico utilizando pares de “primers” intrônicos flanqueando cada exons. Já o gene do *IGF1R*, devido ao grande número de exons, foi estudado a partir do DNA complementar (cDNA), sendo toda a sua seqüência codificadora amplificada em 6 fragmentos. Para o seqüenciamento deste gene usamos os mesmos “primers” utilizados para a amplificação do cDNA, além de “primers” internos para os fragmentos 1 e 3 (tabela 3). As variantes alélicas encontradas no cDNA do *IGF1R*, nas regiões correspondentes aos exons 1 e 7, foram confirmadas por meio de amplificação do DNA genômico e seqüenciamento direto usando “primers” específicos (Tabela 4).

Os fragmentos inicialmente foram amplificados por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se 100ng de DNA genômico ou cDNA, 200 μ M de cada trifosfato de nucleotídeo (dNTP), 20 pmol/ μ l de cada “primer” específico, além do tampão (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50mM KCl), e Taq DNA polimerase 2,5 U (Pharmacia, Upsala, Sweden), para um volume final de 25 μ l.

A concentração dos produtos gerados pela PCR foi estimada através da comparação com fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida (Low DNA mass) em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2

U/μl) e exonuclease I (10 U/μl) (PCR product pre-sequencing “kit”, Amersham Life Science™, Cleveland, OH, USA) com incubação a 37°C por 15 minutos, seguido de 80°C por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o “kit” ABI Prism™ BigDye Terminator® (Perkin Elmer™) e quantidades variáveis de produto de PCR (10 a 100 ng) foram utilizadas de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer® (Perkin Elmer™, Foster City, CA).

Tabela 2: “Primers” utilizados para amplificação e seqüenciamento do DNA genômico do *IGF1*

Exon	Seqüência	Tamanho Fragmento	Temperatura de “annealing”
1	1F: AAATGTTCCCCCAGCTGTTT 1R: GGCAGAAGCAAACAGTACACA	390 pb	58° C
2	2F: ATCCCAGCTGTGCAATTTGT 2R: CCACAATGAAAATGCCCTGT	286 pb	58° C
3	3F: GGATCAAGGAGGAAACCTGA 3R: AGCTGTACACTTTAGACTTGAGCA	250 pb	57° C
4	4F: GCTGGGTGGAAGACTGAAGA 4R: CAAGAGAGAGACCACTTGAGGA	299 pb	60° C
5	5F: GGGCATTCTGAGCTCATTCA 5R: GCTGAGCATTTGGGGCTAAT	694 pb	60° C
6	6F: AAGGCGTAAGACATGGAAGG 6R: AAACCACTTAGACAAGGTTGCTG	558 pb	64° C

Tabela 3: “Primers” utilizados para amplificação e seqüenciamento do cDNA do *IGF1R*

Fragmento	Seqüência	Tamanho Fragmento	Temperatura de “annealing”
1	17F: CAAAGGGAATTTTCATCCCAAA 1271R: AGGATGAGGCGAAGGTTTTT	1254 pb	54° C
2A	1098F: AGGATGCACCATCTTCAAGG 1777R: CGTACTGAGTCCAGGGCTTC	697 pb	54° C
2B	1585F: CCCCTGACTACAGGGATCT 2272R: TGACATCTCTCCGCTTCCTT	687 pb	54° C
3	2091F: GGTCACAGAGAACCCCAAGA 3344R: TTCTCCATTTCTGGCCTCAG	1253 pb	54° C
4A	3236F: GATTGCTGGGTGTGGTGTC 3906R: CAGCTTGTTCTCCTCGCTGT	670 pb	60° C
4B	3753F: CTGTCCTGACATGCTGTTTGA 4436R: GGTTCTCAAGTGCTCTGTTGC	683 pb	60° C
“Primers” internos utilizados apenas para sequenciamento do cDNA do <i>IGF1R</i>			
1	605 F: AGGAGAAGCCGATGTGAG 665R: GTCCAGCAGCGGTAGTTGTA		
3	2775R: GAGAGATGTGGCCTGAATCC		

Tabela 4: “Primers” utilizados para PCR e Seqüenciamento dos Exons 1 e 7 do DNA genômico do *IGF1R*

Exon	Seqüência	Tamanho Fragmento	Temperatura de “annealing”
1	1F: AAGGGGAATTTTCATCCCAAA	167 pb	62° C
	1R: AGGAAAAGTTCCCGCAGTG		
7	7F: CCAAGCAAGACAGGTGCTTT	246 pb	54° C
	7R: CCATTCGTAGCCCTGTCAAC		

3.4.3 Estudo da expressão do *IGF1R* por PCR em tempo real

Após extração do RNA total e síntese de cDNA total, o cDNA obtido foi submetido a reações de PCR em tempo real pelo método TaqMan, para a avaliação do nível de expressão do RNA do gene *IGF1R*.

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas pelo método TaqMan, utilizando-se ABI 7000 Sequence Detection Systems. O “kit” TaqManR Gene Expression Assay é composto por um par de primers e a sonda FAMTM. Os “primers” foram localizados nos exons 6 e 7 do *IGF1R* com o objetivo de serem específicos para a amplificação do cDNA e não sofrerem interferência da presença de DNA genômico. Como controle endógeno, foi utilizada a β actina. A sonda do gene *IGF1R* foi marcada com uma fluorescência- FAM, enquanto a da β -actina (gene endógeno) foi marcada com VIC. Estas sondas marcadas geram comprimentos de ondas bem distintos, que emitem sinais captados pela câmera CCD do aparelho.

A quantificação relativa do *IGF1R* foi realizada utilizando-se como calibrador um pool de cDNA obtido de 3 crianças-controle. O cálculo da quantificação, de forma a permitir uma comparação expressa em número de vezes em relação à expressão em leucócitos de crianças-controle, foi realizado utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme descrito por Livak (39). ΔCT é a diferença de expressão entre o gene alvo e endógeno de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT da amostra de cada paciente e o ΔCT do calibrador, ou seja, do pool de crianças-controle.

As reações foram preparadas em triplicata, em um volume final de 25µl, contando 12,5µl de Taqman Universal mastermix 2X, 1,25µl de cada “Assay” (“primers” e sonda) 20X, 3µl de cDNA (obtidos a partir de 150ng de RNA total) e H₂O MiliQ a completar. Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas triplicatas foi de 2%. As condições termociclagem compreendem uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguida pela ativação da Taq Gold a 95°C por 15 segundos, intercalados com hibridação e extensão a 60°C por minuto. Todos os resultados que indicavam uma redução na expressão do *IGF1R* foram repetidos em um segundo ensaio.

3.4.4 Detecção das variantes alélicas

3.4.4.1 Detecção de variante alélica por digestão enzimática

A variante alélica encontradas no exon 7 do *IGF1R* cria sítios de clivagem para enzima específica . Por este motivo foi utilizada a técnica de digestão enzimática, utilizando-se a enzima Agel para determinar a frequência deste achado no grupo controle de adultos com altura normal (n=150), conforme o seguinte protocolo: 5 µL do produto de amplificação do exon em questão foi submetido a digestão com 1 UI da enzima de restrição específica para cada região a 37° por 3 horas. Um controle de reação, ao qual não foi adicionado enzima, foi incluído no experimento. Um segundo controle mutante para a variante alélica descrita também foi utilizado. Os produtos da digestão foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão TAE e os fragmentos de DNA foram visualizados em luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. A sequência mutada apresentava um fragmento de 247 pb enquanto que a sequência normal apresentava fragmentos de 110 e 137 pb.

3.4.4.2 Detecção de variantes alélicas por PCR e seqüenciamento.

A variante alélica encontrada no exon 6 do *IGF1* foi analisado por seqüenciamento de 180 controles com altura normal, utilizando a mesma metodologia anteriormente descrita. Para a variante alélica encontrada no exon 1 do *IGF1R* não havia enzima de restrição disponível de forma que foi realizado PCR e seqüenciamento de 150 controles com altura normal.

3.5 Análise Estatística

Peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento foram expressos em desvios-padrão para idade gestacional e sexo, assim como a altura foi expressa em desvio-padrão para idade e sexo.

O tipo de distribuição das variáveis contínuas foi analisado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A diferença entre os grupos para variáveis numéricas com distribuição normal foi analisada por teste T, enquanto variáveis com distribuição não paramétrica foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Para variantes nominais, foi utilizado χ^2 ou Fisher, quando apropriado. Foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SIGMAstat (Windows version 2.03; SPSS Inc, San Rafael, CA).

3.6 Resumo da Estratégia do Estudo

Cinqüenta e quatro crianças nascidas PIG foram inicialmente selecionadas. DNA genômico foi obtido de todas estas crianças para o estudo do *IGF1*. Variantes alélicas observadas no *IGF1* foram investigadas em mais 91 crianças nascidas PIG e 180 controles.

Vinte e três destas crianças que apresentavam concentrações séricas de IGF-1 acima da média para idade e sexo, durante o acompanhamento, foram selecionadas para o estudo do *IGF1R*. RNA total de leucócitos

mononucleares foi obtido para síntese de cDNA. Todos os 23 pacientes tiveram a região codificadora do *IGF1R* seqüenciada e sua expressão analisada por PCR em tempo real. Variantes alélicas encontradas no *IGF1R* foram pesquisadas em 150 controles.

Figura 3: Fluxograma esquematizando a estratégia de estudo utilizada.

4 Resultados

4.1 Caracterização dos pacientes

Foram estudados 54 pacientes nascidos pequenos para idade gestacional (23 F/ 31M), 43 deles nascidos termo. 42% apresentaram apenas baixo peso ao nascer, 26% apresentaram apenas comprimento diminuído e 32% destes pacientes apresentaram peso e comprimento de nascimento reduzidos.

Na primeira avaliação em nosso serviço, estes pacientes apresentavam idade cronológica média de $7,9 \pm 4,4$ anos, baixa estatura com Z da altura média de $-3,1 \pm 0,9$ e Z de IMC $-1,3 \pm 1,3$. Microcefalia estava presente em 33% dos pacientes e 17 % apresentavam atraso de DNPM.

Analizando a estatura familiar em nossa casuística, observamos que 9% dos pacientes apresentavam mãe e pai baixos; em 15% apenas o pai era baixo e em 24% apenas a mãe era baixa. Um pouco menos que a metade dos pacientes (46%) apresentava ambos os pais com altura normal. Em 6% dos pacientes não foi possível obter a estatura alvo.

Laboratorialmente todos os pacientes responderam ao teste de estímulo de GH (pico= $16 \pm 8,7$ ng/mL) e apresentaram valores variáveis de IGF-1 e IGFBP-3. Vinte e três pacientes que apresentavam concentrações de IGF-1 normais ou elevados para idade e sexo (Z de IGF-1 ≥ 0 DP) foram selecionados para estudo do *IGF1R*. As características dos pacientes em

que foi estudado apenas o gene *IGF1* e dos pacientes em que estudamos ambos os genes encontra-se na tabela 5.

Tabela 5: Características clínicas das crianças PIG estudadas correlacionando com o gene estudado

Gene estudado	Apenas <i>IGF1</i>	<i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i>	<i>p</i>
N	31	23	N.S.
Sexo (F/M)	(10F/21M)	(13F/10M)	N.S.
Idade gestacional	37,8 ± 2,9	37,5 ± 3,0	N.S.
Z Peso de nascimento	-2,4 ± 0,8	-2,1 ± 1,0	N.S.
Z comprimento nascimento	-2,9 ± 2,0	-3,3 ± 1,2	N.S.
Z altura alvo	-1,4 ± 0,8	-1,3 ± 1,2	N.S.
Idade Cronológica	9,3 ± 4,7	6,0 ± 3,2	N.S.
Z Altura	-3,1 ± 0,6	-3,2 ± 1,2	N.S.
Z IMC	-1,3 ± 1,1	1,3 ± 1,4	N.S.
Microcefalia	25,8%	43%	N.S.
Atraso DNPM	12,9%	21,7%	N.S.
Pico de GH	16,1 ± 7,6	16 ± 10,2	N.S.
Z de IGF-1	-1,2 ± 1,1	1,0 ± 0,6	N.S.
Z de IGFBP-3	-0,5 ± 1,2	0,7 ± 0,9	N.S.

Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. N.S.: Não significante

4.2 Análise do gene *IGF1*

4.2.1 Variantes alélicas

Nenhuma mutação foi encontrada na região codificadora do gene *IGF1* dos 54 pacientes nascidos pequenos para idade gestacional sem recuperação espontânea do crescimento na vida pós-natal.

Entretanto observamos a presença de diversas variantes alélicas na região 3' não traduzida do exon 6 deste gene. Estas variantes alélicas estão localizadas 260 pares de base “downstream” do códon terminal TAG do gene *IGF1*, numa região envolvida no processo de poliadenilação denominada “upstream core poliadenilation signal” (UCPAS). Esta região é constituída por um hexâmero composto dos nucleotídeos AATATA e é importante para a correta identificação do sítio de clivagem no pré-RNA mensageiro para subsequente adição da cauda poli (A). A adição da cauda poli (A) confere estabilidade ao RNA mensageiro e é importante no processo de tradução.

Ao todo foram encontradas 6 variantes alélicas, que foram classificadas de A a F de acordo com a ordem de freqüência. Na variante alélica A, ocorre uma substituição de A>T no primeiro nucleotídeo do sinal de poliadenilação AATATA; na variante alélica B, ocorre uma substituição de T>A no terceiro nucleotídeo deste hexâmero; na variante alélica C, ocorre uma deleção do segundo nucleotídeo desta seqüência; na variante alélica D, ocorre uma substituição de A>T no nucleotídeo localizado imediatamente

antes da sequência AATATA; na variante alélica E, há uma deleção do terceiro nucleotídeo deste hexâmero; e, na variante alélica F, ocorre uma troca de A>T no nucleotídeo localizado 2 pares de base “upstream “ ao sinal de poliadenilação AATATA. Todas essas novas seqüências geradas levam a um deslocamento do UCPAS “downstream” ou “upstream”. A seqüência UCPAS “wild type” e as variantes alélicas observadas estão representada na figura 4.

Figura 4: Representação esquemática das variantes alélicas encontradas na região 3' não traduzida do exon 6 do gene IGF1 (40).

4.2.2 Análise do Efeito das Variantes Alélicas sobre o Crescimento

Como as variantes alélicas encontradas estão localizadas numa região reguladora do processo de poliadenilação e doenças como as talassemias são causadas por mutações desta região de seus respectivos genes, decidimos avaliar se essas variantes apresentam influência no crescimento pré e pós-natal.

Para tanto utilizamos 72 pacientes PIG sem recuperação espontânea do crescimento (em 54 deles, estudamos todo o gene *IGF1*; nos 18 restantes, estudamos apenas o exon 6), 73 pacientes PIG com “catch-up” e 180 controles de altura normal nascidos AIG.

A frequência das variantes alélicas encontradas foi semelhante em controles AIG e pacientes PIG, sugerindo que este polimorfismo não apresenta influência significativa no crescimento pré-natal (Figura 5). O mesmo foi observado quando comparamos pacientes PIG com ou sem “catch-up”, levando-nos a concluir que este polimorfismo também não influencia o crescimento na vida pós-natal. (Figura 6)

Figura 5: Frequência das variantes alélicas do exon 6 do *IGF1* em crianças nascidas PIG x indivíduos-controle nascidos AIG.

Figura 6: Frequência das variantes alélicas do exon 6 do *IGF1* em crianças PIG com e sem "catch-up".

Analisando o fenótipo dos pacientes PIG que apresentava a variante alélica “wild type” ou uma das 3 variantes alélicas mais freqüentemente encontradas (1,2 e 3), não observamos diferenças significativas entre peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento, bem como altura, índice de massa corpórea e concentrações de IGF-1 em torno de 7 anos de idade (Tabela 6). Também não foi observado nenhum efeito destas variantes alélicas na altura de controles normais (Figura 7).

Tabela 6: Fenótipo das crianças PIG carreadoras dos quatro mais freqüentes genótipos do exon 6 do *IGF1*

Variante alélica	Homozigoto para “wild type”	Uma ou duas cópias do alelo			p
		A	B	C	
IG (sem)	36 ± 3,8	36 ± 3,2	34 ± 3,1	36 ± 3,2	N.S
Z do CN	-3,7 ± 1,5	-3,5 ± 1,2	-3,3 ± 1,1	-2,5 ± 0,7	N.S
Z do PN	-2,6 ± 0,9	-2,5 ± 0,7	-2,5 ± 0,9	-2,4 ± 0,5	N.S.
Z do PC	-1,9 ± 1,5	-1,8 ± 1,4	-2,4 ± 0,8	-1,8 ± 1,7	N.S.
IC na avaliação (a)	7,2 ± 4,5	8,4 ± 4,7	7,7 ± 3,1	5,1 ± 2,5	N.S.
Z da altura	-1,9 ± 2,1	-1,6 ± 1,6	-1,3 ± 1,6	-1,3 ± 1,0	N.S.
Z do IMC	-0,8 ± 1,9	-0,6 ± 1,9	-0,4 ± 1,1	0,1 ± 2,6	N.S.
Z do IGF-1	-0,5 ± 1,4	-0,6 ± 1,2	-0,4 ± 1,3	-0,4 ± 1,1	N.S.

IG = Idade gestacional; (sem) = semanas; CN = comprimento ao nascimento; PN = peso ao nascimento; PC = perímetro cefálico; IC = idade cronológica; (a) = anos; IMC = índice de massa corpórea; N.S. = não significante.

Figura 7: Altura adulta de controles normais nascidos adequados para idade gestacional homozigotos para o alelo selvagem (WT) ou carreadores de uma ou duas cópias das variantes alélicas A, B ou C do exon 6 do *IGF1*. Os resultados são demonstrados com análise de “Box-plot” (mediana, percentil 25 e 75, valores máximo e mínimos) mais valores individuais de cada paciente.

4.3 Análise do gene *IGF1R*

4.3.1 Análise das Variantes Alélicas

O gene *IGF1R* foi estudado em 23 crianças pequenas para idade gestacional que apresentavam concentrações normais ou elevadas de IGF-1 ($Z \geq 0$). Encontramos 5 polimorfismos sinônimos, 4 em heterozigose e 1 deles em hetero e homozigose, todos previamente descritos. Em dois pacientes foram encontradas 2 novas variantes alélicas, missense em heterozigose (frequência de 8,7%).

4.3.1.1 Descrição dos polimorfismos

Os polimorfismos encontrados foram os seguintes: troca de G $\rightarrow$ A na base 447 em heterozigose sem troca de aminoácido (c.447G>A; p.R133R); substituição de C $\rightarrow$ T em heterozigose na base 909 permanecendo o aminoácido alanina na posição 278 (c.909C>T; p.A287A); troca de C $\rightarrow$ T em heterozigose na base 2343, sem troca de aminoácido (c.2343C>T; p.T765T); troca de G $\rightarrow$ A em homo ou heterozigose na base 3174 sem troca de aminoácido, permanecendo ácido glutâmico na posição 1042 (c.3174G>A; p.E1042E); e, por último, ocorre uma troca de C $\rightarrow$ T na base 4083 em heterozigose também sem troca de aminoácido, permanecendo o aminoácido tirosina na posição 1345 (c.4083C>T; p.Y1345Y). A frequência de cada um dos polimorfismos encontrados em nossa casuística e a

freqüência destes descrita no NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) encontra-se na tabela 7.

Tabela 7: Freqüência de polimorfismos encontrados no gene *IGF1R* no presente estudo comparando com a freqüência descrita em banco de dado internacional

SNP ID	Polimorfismo	Freqüência do alelo menos comum	
		Presente estudo	NCBI
rs35385418	p.R133R	4,3%	0,6 a 3,9%
rs34430460	p.A287A	4,3%	0 a 5,4%
rs3743262	p.T765T	13%	1,3 a 41%
rs2229765	p.E1042E	48%	43 a 83%
rs17847203	p.Y1345Y	17,3%	1 a 16%

SNP ID: número que identifica o polimorfismo de um único par de base no banco de base do NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)

4.3.1.2 Descrição das variantes alélicas encontradas

Encontramos no exon 1 do *IGF1R* do paciente 1 a troca do nucleotídeo guanina por adenina na posição 16 do cDNA (c.16G>A), levando à substituição do aminoácido glicina por arginina no códon 6 (p.G6R). Esta mutação está localizada em uma região de peptídeo sinal, altamente conservada entre diferentes espécies, e leva à troca de glicina,

um aminoácido alifático, não polar, por arginina, um aminoácido básico, polar, alterando as propriedades físico-químicas deste resíduo.

Uma segunda variante alélica foi encontrada no exon 7 do *IGF1R* do paciente 2 e leva à substituição de citosina por timina no nucleotídeo 1531 do cDNA (c.1531C>T), causando a troca do aminoácido arginina pelo aminoácido triptofano na posição 511 da proteína (p.R511W). Arginina na posição 511 é conservada entre as diversas espécies 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.

A variante alélica p.G6R foi encontrada em dois de 153 indivíduos adultos nascidos AIG com estatura normal (frequência alélica de 0,7%), enquanto a mutação p.R511W não foi observada no mesmo número de controles.

4.3.1.3 Descrição dos pacientes com novas variantes alélicas

Paciente 1

O paciente com a mutação p.G6R é uma criança do sexo masculino, filho único de pais não consangüíneos. A mãe tem baixa estatura (Altura: 148,5 cm), sem história de doenças pregressas; o pai, também com baixa estatura (altura referida de 150 cm) e saudável. Tem 2 meio-irmãos maternos com estatura normal.

Criança nascida a termos (39 semanas) após gestação sem intercorrências, parto cesárea, com peso de 2480g (Z = -2) e comprimento

ao nascimento 47 cm ($Z = -1,9$). Apresentou DNPM normal, mas apresenta 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 entre 0,1 a 0,4 ng/ml, com pico de GH após clonidina de 5,8 ng/mL. Com 10 anos, o paciente apresentava valores normais de IGF-1 (272 ng/ml, $Z = +0,5$) e IGFBP-3 (5,0 mg/L, $Z = +1,3$). A idade óssea era atrasada 4 anos em relação à idade cronológica. Foi descartada alteração no gene *IGF1*

Iniciou tratamento com hGH aos 9,1 anos, na dose de 0,15 U/Kg/dia (50 µg/kg/dia). Apresentou moderada resposta ao tratamento com GH (VC = 6,8 cm/ano no primeiro ano, 5,1 cm/ano no segundo ano e 7,22 cm/ano no terceiro ano, sendo que este último ano coincidiu com o aparecimento de puberdade). Antes do tratamento o paciente apresentava velocidade de crescimento de 4,2 cm/ano. Durante o tratamento com hGH 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, que evoluiu sem anormalidades. Atualmente está com 12,3 anos, altura de 134 cm (DP= $-2,2$), ainda em uso de hGH 0,15 UI/Kg/dia.

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. O outro irmão, também AIG e de estatura normal, era “wild type” para esta variante e o pai não pode ser avaliado.

Figura 8: Heredograma da família com a variante p.G6R. Os indivíduos com a alteração 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.

Paciente 2

A paciente com a mutação p.R511W é uma criança do sexo feminino, filha de pais não consangüíneos, mãe com baixa estatura (altura=144 cm) sem história de doenças pregressas; pai com altura normal (175 cm), também saudável. Tem 2 irmãos com estatura normal e um meio irmão por parte de mãe que não foi avaliado. Pré-natal sem intercorrências. Criança nascida a termo (39 semanas), com peso de 2.275g (Z= -2,5), comprimento de nascimento desconhecido.

Apresentou DNPM normal; está com aproveitamento escolar adequado. Apresenta alguns estigmas discretos que não permitem o seu enquadramento em nenhuma síndrome conhecida: perímetro cefálico no limite inferior da normalidade (-2 DP), 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).

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 entre 0,3 a 3,8 ng/mL e pico de GH após clonidina de 12,1 ng/mL. Na mesma época, a paciente apresentava valores normais a elevados de IGF-1 (301 ng/ml, Z = + 1,25) e IGFBP-3 (4,5 mg/L, Z = +1). A idade óssea era atrasada 2 anos em relação a idade cronológica. Foi descartada qualquer alteração no gene *IGF1*.

O tratamento com hGH foi iniciado aos 8,3 anos na dose de 0,15 U/Kg/dia (50 µg/kg/dia). Apresentou boa resposta ao tratamento com

hGH (VC = 8,2 cm/ano no primeiro ano), sendo que a velocidade de crescimento pré-tratamento era de 4,65 cm/ano. Durante o tratamento com hGH, a 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 9,3 anos, altura de 121,4 cm (DP=-1,8) e estadiamento puberal M3P1, ainda em uso de hGH 0,15 UI/Kg/dia.

Realizamos segregação familiar e observamos que a mãe da paciente, que também apresentava baixa estatura e havia nascido PIG, tinha a mesma mutação da criança, enquanto que o pai e os irmãos de estatura normal apresentavam a sequência selvagem.

Figura 9: Heredograma da família com a mutação p.R511W. 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.

4.3.2 Análise da expressão do *IGF1R*

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

A paciente com hemizigose do *IGF1R* apresentava uma 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. Enquanto 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. Três pacientes foram excluídos da análise por falta de amostra suficiente para realização do ensaio em triplicata (pacientes 8, 13 e 17).

A expressão relativa de *IGF1R* observada nos pacientes não apresentou correlação com a idade cronológica, estadió puberal, valores de GH, IGF-1 e IGFBP-3 no momento da coleta de amostra para o estudo molecular.

Identificamos 5 pacientes (25%) com expressão reduzida do *IGF1R* em leucócitos, expressão relativa entre 0,41 a 0,56 em relação ao pool controle (Figura 8). Até esse momento, este resultado foi confirmado com uma segunda amostra de sangue em uma paciente (paciente 4). Nenhum destes pacientes apresentou mutação na região codificadora do *IGF1* ou do *IGF1R*

Figura 10: Análise da expressão do *IGF1R* em leucócitos periféricos. Os valores são expressos em quantidade de expressão relativa do *IGF1R* em relação ao observado no pool controle (mediana resultante do ensaio em triplicata). 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.

A comparação dos dados clínicos e laboratoriais entre os pacientes com expressão normal e diminuída do *IGF1R* (Tabela 8) demonstrou um pico de GH nos testes de estímulo significativamente maior no grupo de pacientes com redução da expressão deste gene. Houve uma tendência destes pacientes apresentarem menor frequência de microcefalia. As características clínicas, antropométricas e laboratoriais de cada um destes pacientes encontram-se descritas abaixo.

Tabela 8: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes PIG selecionados para o estudo do *IGF1R* comparando as crianças com expressão normal e diminuída deste gene

	Expressão do IGF1R		p
	Normal	Diminuída	
Feminino : Masculino	8:7	3:2	N.S.
Idade gestacional	37,3 ± 3,5	37,2 ± 2,0	N.S.
Z do peso ao nascimento	-2,2 ± 0,9	-1,6 ± 0,8	N.S.
Z do comprimento ao nascimento	- 3,3 ± 1,3	-2,8 ± 1,2	N.S.
Z da altura alvo	-1,6 ± 1,3	-1,0 ± 0,7	N.S.
Idade Cronológica	6,4 ± 3,0	5,9 ± 3,4	N.S.
Z da altura	-3,4 ± 1,4	-2,9 ± 0,8	N.S.
Z do IMC	-1,6 ± 1,7	-0,9 ± 0,6	N.S.
Microcefalia	53%	0%	0,055
Atraso DNPM	20%	20%	N.S.
Pico de GH	13,2 ± 9,9	25 ± 6,2	0,023
Z de IGF-1	1,1 ± 0,7	0,9 ± 0,6	N.S.
Z de IGFBP-3	0,6 ± 1,0	1,1 ± 0,5	N.S.

N.S. – Não significante.

4.3.2.1 Características dos pacientes com redução da expressão do *IGF1R* em leucócitos periféricos

Paciente 3

Criança do sexo masculino, filho de pais não consangüíneos, mãe com 153 cm e pai 176,5 cm de altura (Z altura alvo = -0,5), ambos saudáveis. 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 2440g (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 e está com aproveitamento escolar adequado. Apresenta 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 16kg de peso (Z do IMC = -0,5). Os exames laboratoriais de rotina, realizados para investigação da baixa estatura, foram normais. O paciente apresentava concentrações de GH basal entre 0,1 a 0,9 ng/mL, pico de GH após clonidina de 20,3 ng/mL e valores normais de IGF-1 (126 ng/mL, Z = 0) e IGFBP-3 (3,6 mg/L, Z = +0,5). A idade óssea era atrasada 3 anos em relação a idade cronológica.

Como o paciente não apresentava critérios para uso de hGH, foi acompanhado apenas clinicamente. Iniciou puberdade com 12 anos. Na última avaliação apresentava idade cronológica de 13,1 anos, altura = 137,5 cm (Z = -2,15) e velocidade de crescimento 5,6 cm/ano.

Paciente 4

Criança do sexo feminino, filha de pais não consangüíneos, mãe com altura = 158,7 cm e pai com altura 160 cm, (Z do alvo = -1,6), 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 está com 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 e apresentava 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, foram normais, assim como o cariótipo (46,XX). A paciente apresentava concentrações de GH basal entre 0,4 a 5,1 ng/mL e pico de GH após clonidina de 26,5 ng/mL. Na mesma época, a paciente apresentava valores normais a elevados de IGF-1 (281 ng/ml, Z = + 1,5) e IGFBP-3 (4,9 mg/L, Z = +1,5). A idade óssea era atrasada 2 anos em relação à idade cronológica. O tratamento com hGH foi iniciado aos 5,5 anos na dose de 0,15 U/Kg/dia (50 µg/kg/dia). Apresentou boa resposta ao tratamento com hGH (VC = 7,2 cm/ano no primeiro ano, 7,6 cm/ano no segundo ano e 9

cm/ano no terceiro ano), sendo que a velocidade de crescimento pré-tratamento era de 4,8 cm/ano. Durante o tratamento com hGH, a paciente manteve valores elevados de IGF-1 ($Z = +1,25$ a $+2,5$) e IGFBP-3 ($Z = +1$ a $+2,25$).

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. Atualmente está com 10 anos, altura de 123,8 cm ($DP=-2,0$) e estadiamento puberal M2P3, ainda em uso de hGH 0,15 UI/Kg/dia e análogo de GnRH.

Paciente 5

Criança do sexo masculino, filho de pais não consangüíneos, mãe com 163 cm e pai 175 cm de altura (Z da altura alvo = $0,1$), ambos saudáveis. Tem 1 irmão saudável de estatura normal. No pré-natal apresentou oligodrâmnio desde 32 semanas de gravidez, sem outras intercorrências. Nasceu de parto cesáreo com 35 semanas de idade gestacional. Apresentou peso de nascimento de 2070g ($Z = -0,9$), comprimento de nascimento de 41,5 cm ($Z=-2,5$) e perímetro cefálico de nascimento = 31 cm ($Z = -1$).

Apresentou DNPM normal e está com aproveitamento escolar adequado. Apresenta alguns estigmas discretos que não permitem o seu enquadramento em nenhuma síndrome conhecida: fronte olímpica, nariz em sela e clinodactilia de quinto dedo de ambas as mãos. O paciente foi

avaliado inicialmente em nosso serviço com 1,7 ano e apresentava altura de 72,5 cm ($Z = -3,6$) e 7,2 kg de peso (Z do IMC = $-1,3$).

Os exames laboratoriais de rotina, realizados para investigação da baixa estatura, foram normais, assim como o cariótipo (46,XY). O paciente apresentava concentrações de GH basal entre 2,2 a 19,9 ng/mL e pico de GH após clonidina de 9,4 ng/mL. Aos 3 anos o paciente apresentava valores normais a elevados de IGF-1 (156 ng/mL, $Z = +1,5$) e IGFBP-3 (3,7 mg/L, $Z = +1,5$). Aos 4 anos a idade óssea era atrasada 1,6 anos em relação a idade cronológica. Como paciente, apresentava boa velocidade de crescimento (8 cm/ano no primeiro ano de avaliação), foi optado por não tratar-se com hGH. Evoluiu com melhora progressiva do desvio padrão. Na última avaliação estava com 7 anos, peso= 24,1 Kg, altura= 107,5 cm ($Z = -2,4$), pré-púbere e apresentando uma velocidade de crescimento de 5,5 cm/ano.

Paciente 6

Criança do sexo feminino, filha de pais não consangüíneos, mãe com baixa estatura (Altura = 150 cm), sem história de doenças pregressas; pai com altura normal (169 cm), também saudável. Tem 1 irmão com estatura normal.

Pré-natal sem intercorrências, nasceu a termo (39 semanas) de parto cesáreo por desproporção materno-fetal com peso de nascimento de 2280g ($Z = -2,5$) e comprimento de nascimento de 48 cm ($Z = -1,4$). Apresentou DNPM normal, está com aproveitamento escolar adequado. Apresenta

alguns estigmas discretos que não permitem o seu enquadramento em nenhuma síndrome conhecida: fosseta sacral e clinodactilia do quinto dedo de ambas as mãos . Ausência de microcefalia.

A paciente foi avaliada inicialmente, em nosso serviço, com 5,9 anos e apresentava altura de 101,5 cm ($Z = -2,3$) e peso = 14,5 (Z do IMC = $-1,0$). 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 entre 1,0 a 3,6 ng/mL e pico de GH após clonidina de 23,2 ng/mL. Apresentava valores normais a elevados de IGF-1 (375 ng/ml, $Z = +1,0$) e IGFBP-3 (4,8 mg/L, $Z = +1,25$). A idade óssea era atrasada 1 ano em relação a idade cronológica.

O tratamento com hGH foi iniciado aos 6,9 anos na dose de 0,15 U/Kg/dia (50 µg/kg/dia) que, após 6 meses, foi aumentada para 0,2 UI/Kg/dia (66 µg/kg/dia). Apresentou boa resposta ao tratamento com hGH em doses altas (VC = 8,4 cm/ano no primeiro ano e 6,1 cm/ano no segundo ano), sendo que a velocidade de crescimento pré-tratamento era de 4,2 cm/ano. Iniciou puberdade com 9,3 anos e foi introduzido análogo de GnRH para bloqueio da puberdade. Durante o tratamento com hGH a paciente manteve valores normais de IGF-1 ($Z = +1$) e IGFBP-3 ($Z = +1$ a $+1,5$) .

Atualmente está com 10,1 anos, altura de 128,7cm (DP= $-1,2$), estadiamento puberal M2P1, ainda em uso de hGH 0,2 UI/Kg/dia e análogo de GnRH.

Paciente 7

Criança do sexo feminino, filha de pais não consangüíneos, mãe e pai com altura normal, mãe = 155 cm e pai = 166 cm (Z altura alvo = -1,4), ambos saudáveis. Tem um meio irmão por parte de mãe que não foi avaliado. Pré natal sem intercorrências, parto cesáreo com idade gestacional de 35 semanas, peso ao nascimento de 2100g (Z = -0,8) e comprimento ao nascimento de 42 cm (Z = -2,3). Apresentou atraso de DNPM normal (andou e falou com 2 anos) e apresenta baixo rendimento escolar.

A paciente foi avaliada inicialmente, em nosso serviço, com 10 anos e apresentava altura de 118,8 cm (Z = -2,8) e peso de 24 Kg (Z do IMC = 0) e com puberdade iniciada (estádio M2P1 de Tanner). 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 entre 0,3 a 4,5 ng/mL e pico de GH após clonidina de 35 ng/mL. Na mesma época a paciente apresentava valores normais de IGF-1 (447 ng/mL, Z = + 0,75) e IGFBP-3 (4,7 mg/L, Z = +0,75). A idade óssea era atrasada 1 ano em relação a idade cronológica.

Optou-se inicialmente pelo uso isolado de análogo de GnRH que foi iniciado aos 10,6 anos. Aos 13 anos, como a paciente apresentava velocidade de crescimento reduzida (1,9 cm no último ano) e piora do desvio padrão (Z = -3,2), optou-se por fazer teste terapêutico com hGH na dose de 0,15 UI/kg/dia. O análogo de GnRH foi suspenso aos 14 anos e o hGH aos 15,6 anos. A paciente apresentou menarca aos 15,2 anos. Na última avaliação a paciente apresentava 16 anos, altura = 143 cm (Z = -3,2), sendo a última velocidade de crescimento = 0,8 cm/ano.

5 Discussão

É bem reconhecida a contribuição genética para a variação interindividual dos valores circulantes de IGF-1(41), assim como concentrações baixas de IGF-1 são observadas nas crianças nascidas pequenas para idade gestacional (42). Entretanto existem poucos relatos de mutações no gene *IGF1* para explicar este retardo de crescimento pré e pós-natal (30, 31), (32). No presente estudo, a região codificadora do *IGF1* foi sistematicamente analisada em um grupo de crianças nascidas pequenas para idade gestacional sem recuperação espontânea do crescimento.

Nenhuma das crianças avaliadas apresentou mutações ou polimorfismos na região codificadora do gene *IGF1*. Entretanto, um *locus* altamente polimórfico na região 3' não traduzida do exon 6 do *IGF1* foi identificada. Esta região, denominada “upstream core poliadenilation signal” (UCPAS), está localizada “upstream” do sítio de poliadenilação e é importante para a correta identificação do sítio de clivagem do pré-RNA mensageiro e posterior adição da cauda poli(A) (43).

A cauda poli(A) confere estabilidade ao RNA mensageiro e é de extrema importância no processo de tradução (44). Um dos sinais de poliadenilação altamente conservado é o hexâmero AAUAAA, que se localiza 10 a 30 nucleotídeos “upstream” do sítio de clivagem (45). No caso do *IGF1* este hexâmero é composto pelos nucleotídeos AATATA, uma

variante do hexâmero consenso. As talassemias α e β são exemplos de doenças humanas causadas por mutações na região UCPAS (43).

Em 2003, Bonapace e cols. (31) analisaram o gene *IGF1* em uma criança nascida pequena para idade gestacional que apresentava quadro clínico e laboratorial compatível com deficiência de IGF-1 isolada. A análise molecular deste paciente demonstrou uma substituição em homozigose de um único nucleotídeo do hexâmero UCPAS localizado no exon 6 do *IGF1* (AATATA > AAAATA). O fato de não terem achado nenhuma outra alteração na região codificadora do *IGF1* e não terem encontrado esta variação em 100 controles saudáveis de altura normal levou os autores a concluir que esta alteração era responsável pelo fenótipo do paciente (31), (43).

Entretanto, nosso estudo molecular de 145 crianças PIG e 180 controles normais demonstrou vários polimorfismos na região UCPAS do *IGF1*, incluindo a mesma variante alélica descrita por Bonapace e cols. que foi observada em homozigose em 4 e em heterozigose em 6 controles da nossa amostra. A substituição AATATA > AAAATA (variante alélica B) leva a um deslocamento da UCPAS “downstream” em relação a posição fisiológica do hexâmero (Figura 4), o mesmo sendo observado com as demais variantes alélicas que foram deslocadas “upstream” ou “downstream” em relação a posição original (Figura 4) (40).

O fato de crianças nascidas pequenas para idade gestacional e adultos-controle normais portadores das diversas variantes alélicas não apresentarem fenótipo distinto em comparação com aqueles homozigotos para a variante “wild type” sugere que estas variantes alélicas não

apresentam influência significativa nas características ao nascimento ou na recuperação de crescimento na vida pós-natal de crianças nascidas PIG. Também não foi observada influência sobre a estatura adulta de indivíduos-controle com altura normal. Este achado sugere que a substituição AATATA > AAAATA não é responsável pela deficiência de IGF-1 do paciente descrito por Bonapace e cols. Uma mutação intrônica ou na região promotora poderia ser responsável pela deficiência isolada de IGF-1 descrita neste paciente.

Quanto ao IGF-1R, desde 2003 foram identificadas várias mutações no seu gene como causa de retardo de crescimento pré e pós-natal. A maioria dos casos descritos apresenta mutações missense em heterozigose no gene do *IGF1R*. O quadro clínico apresentado por crianças e adultos afetados pode variar de um retardo de crescimento pré e pós-natal discreto a muito importante, freqüentemente o desenvolvimento neuropsicomotor é normal ou pouco comprometido, microcefalia pode ou não estar presente e concentrações séricas de GH, IGF-1 e IGFBP-3 tendem a ser elevados, mas muitas vezes encontram-se dentro da faixa de normalidade (6, 33-35).

Observamos que os quadros clínicos mais graves estavam associados a genótipos de mutações “nonsense”, deleções completas do *IGF1R* em heterozigose e nos casos de mutações em heterozigose composta, enquanto que pacientes heterozigotos simples para mutações “missense”, na maioria das vezes, apresentaram formas clínicas mais leves, de difícil identificação e demonstrando que o quadro clínico é compatível com o número de alelos funcionantes do *IGF1R* (46). Além do fenômeno de haploinsuficiência, algumas mutações do *IGF1R* podem apresentar efeito

dominante negativo, apesar de que este mecanismo ainda não foi bem caracterizado em estudos prévios (35).

No presente estudo, nós identificamos 2 pacientes PIG sem recuperação espontânea do crescimento (8,7%) com variantes alélicas em heterozigose no gene do *IGF1R*.

A primeira variante alélica encontrada, c.16 G>A - p.G6R, está localizada no exon 1, numa 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 11)(47). 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 (48)

Figura 11: Representação esquemática da região amino-terminal do pré-pró-IGF-1R, ilustrando o peptídeo sinal e o sítio de clivagem.

A glicina na posição seis é bem conservada entre as espécies (Figura 12) e a variante p.G6R modifica as propriedades físico-químicas do aminoácido neste resíduo. Esta alteração pode interferir na localização celular do IGF-1R ou no processamento pós-traducional deste receptor. Interessante observar que o paciente carreador da variante p.G6R apresentou uma expressão relativa de *IGF1R* no limite inferior da normalidade (0,657 em relação ao “pool” controle, Figura 10, Paciente 1).

		↓	
Humano	1	MKSGSGGGSP TSLWGLLFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRIENCTVIEGYLIH	60
Chimpanzé	1	MKSGSGGGSP TSLWGLLFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRIENCTVIEGYLIH	60
Macaco Rhesus	1	MKSGSGGGSP TSLWGLLFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRIENCTVIEGYLIH	60
Cão	1	MKSGSGGGSP TSLWGLVFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRIENCTVIEGYLIH	60
Camundongo	1	MKSGSGGGSP TSLWGLVFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRIENCTVIEGYLIH	60
Rato	1	MKSGSGGGSP TSLWGLVFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRIENCTVIEGYLIH	60
Porco	1	MKSGSGGGSP TSLWGLLFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRIENCTVIEGYLIH	60
Galo	1	MKSGAGGGT LAVFCGLLLAF AALCLCP TNGEICGPNVDIRNDIHEIKRIENCTVVEGYLIQ	60

Figura 12: Alinhamento do *IGF1R* de diversas espécies mostrando que o aminoácido glicina na posição 6 é bem conservado.

Porém, observamos esta mesma alteração no irmão do paciente e em dois controles (frequência alélica de 0,7%) que nasceram adequados para idade gestacional e que apresentavam altura normal. Estudos funcionais são necessários para determinar se a variante p.G6R apresenta um efeito causal no crescimento pré- e pós-natal com penetrância incompleta ou é apenas uma variante alélica rara que isoladamente não é responsável pelo fenótipo observado no paciente 1.

A segunda mutação encontrada em nossa casuística, p.R511W, está localizada no exon 7 numa região bem conservada entre as diversas espécies (Figura 13) e também ocasiona mudança nas propriedades físico-químicas do aminoácido. O estudo da família mostrou a mesma mutação na mãe da paciente que também havia nascido PIG e apresentava baixa estatura e esta não foi observada nos familiares com crescimento normal e nem em 306 alelos de indivíduos controle.

Figura 13: Alinhamento do *IGF1R* de diversas espécies, mostrando que o aminoácido arginina na posição 511 é bem conservado entre estas.

Em 2007, Inagaki e cols. (35) descreveram uma paciente com retardo de crescimento pré e pós-natal que apresentava uma substituição no nucleotídeo subsequente ao encontrado no presente estudo (c.1532 G>A), resultando na troca de arginina por glutamina no mesmo códon (p.R511Q). Os estudos funcionais demonstraram que a mutação p.R511Q não alterava a ligação do IGF-1 ao receptor, porém causava uma diminuição na fosforilação na subunidade β do receptor mutante quando estimulado, assim como uma diminuição da fosforilação de Akt e MAPK (35). 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. Mutações no resíduo R511 podem prejudicar a dimerização do receptor, levando a alterações conformacionais e conseqüentemente uma diminuição na ativação do receptor pelo seu ligante.

Adicionalmente em nosso estudo demonstramos uma diminuição importante da expressão do *IGF1R* em 5 de 20 pacientes (25%) nascidos PIG que apresentavam valores séricos de IGF-1 normais altos. O estudo da região codificadora do *IGF1R* destes pacientes foi normal, porém a expressão relativa deste gene em leucócitos foi comparável a observada em uma paciente com monossomia do *IGF1R*. Deleções do IGF1R foram afastadas por estudo em paralelo utilizando a técnica de MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification). Este achado inédito poderia ser justificado pela presença de mutações na região promotora do *IGF1R* ou por

mutações intrônicas que alterem o processo de “splicing”, uma vez que estas regiões não foram avaliadas no presente estudo.

A análise do fenótipo dos pacientes com mutação ou redução da expressão do IGF1R não identificou nenhuma característica peculiar. Foi observada em todos os pacientes com redução da expressão do *IGF1R* uma liberação de GH exacerbada no teste de estímulo farmacológico (Clonidina). 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*.

Estudos funcionais para as variantes alélicas p.G6R e p.R511W, assim como uma melhor caracterização da redução da expressão do *IGF1R* em pacientes nascidos PIG, estão sendo planejados como parte de outra tese de doutorado a ser iniciada em 2009.

6 *Conclusões*

Não foi identificada nenhuma mutação no gene *IGF1* em crianças nascidas PIG sem recuperação espontânea do crescimento.

Uma região altamente polimórfica localizada no sinal de poliadenilação do exon 6 do *IGF1* foi identificada pela primeira vez neste estudo.

Nossas avaliações clínicas e laboratoriais demonstraram que esses polimorfismos não causam deficiência severa de IGF-1, em contraste com o que foi descrito anteriormente por Bonapace e Cols.

Estas variantes alélicas não influenciam significativamente as características ao nascimento e pós-natais de crianças nascidas PIG ou a altura adulta de indivíduos normais nascidos AIG.

Mutações no gene *IGF1R* estão associadas a retardo de crescimento de início pré-natal e persistência na vida adulta.

Identificamos, pela primeira vez, redução da expressão do gene *IGF1R* em leucócitos mononucleares de pacientes nascidos pequenos para idade gestacional sem recuperação espontânea do crescimento na vida pós-

natal e com ausência de mutação ou deleção deste gene, podendo estar associado como causa da deficiência de crescimento pré e pós-natal.

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.

7 Anexos

Anexo 1: Características clínicas dos pacientes selecionados

Nº	Sexo	IG (sem)	Z PN	Z CN	Pai (cm)	Mãe (cm)	Z alt alvo	IC (anos)	Z altura	Z IMC	Puberdade	Microcefalia	Atraso DNPM
1	M	39	-2,0	-1,9	150	150	-2,7	7,2	-3,3	-0,8	G1P1	Não	Não
2	F	39	-2,5	?	166	144	-2,3	5,8	-2,2	-1,5	M1P1	Sim	Não
3	M	38	-1,7	-3,2	176,5	153	-0,5	6,0	-2,1	-0,5	G1P1	Não	Não
4	F	39	-2,2	-4,6	160	158,7	-1,6	4,9	-4,0	-1,5	M1P1	Não	Não
5	M	35	-0,9	-2,6	175	163	0,1	2,0	-3,6	-1,3	G1P1	Não	Não
6	F	39	-2,5	-1,4	169	150	-1,5	5,9	-2,3	-1,0	M1P1	Não	Não
7	F	35	-0,8	-2,3	166	155	-1,4	11,2	-2,6	0,0	M3P2	Não	Leve
8	M	38	-2,3	-3,2	170	162	-0,3	5,9	-2,6	0,5	G1P1	Sim	Não
9	M	39	-2,2	-3,0	160	138	-4,8	7,7	-4,3	-1,1	G1P1	Sim	Não
10	F	40	-2,1	-3,3	165	153	-1,6	6,3	-2,3	1,2	G1P1	Não	Leve
11	M	35	-2,7	-5,1	177	163	0,3	12,3	-3,6	-0,1	G1P3	Sim	Não
12	F	39	-2,7	-3,5	168	146,5	-1,9	7,0	-3,0	0,3	M1P1	Não	Não
13	F	39	-3,8	-4,6	174	167	0,3	8,2	-2,8	-1,3	M1P1	Não	Não
14	M	39	-1,9	-3,0	168	156,8	-0,9	10,1	-2,3	-1,5	G1P1	Sim	Não
15	F	39	-2,6	-1,4	160	158	-1,6	7,1	-3,1	-3,0	M1P1	Não	Leve
16	F	39	-4,7	?	166	160	-0,9	10,3	-2,2	-2,8	M4P4	Sim	Sim
17	M	39	-0,2	-4,1	161	154,5	-1,6	3,5	-2,57	-2,0	G1P1	Sim	Sim
18	F	26	-0,8	-2,7	170	162	-0,4	2,17	-6,1	-4,1	M1P1	Sim	Não
19	M	36	-1,2	-2,4	152	152	-2,4	2,34	-2,8	-1,4	G1P1	Não	Não
20	F	39	-1,5	-3,0	160	155	-2,0	4,2	-2,0	-0,9	M1P1	Sim	Não
21	F	37	-2,4	-4,8	172	166	0,1	2,7	-6,4	-4,0	M1P1	Sim	Não
22	M	39	-1,1	-2,7	163	159	-1,1	3,36	-2,5	0,1	G1P1	Não	Não
23	M	35	-3,1	-5,9	163	150	-1,8	6,9	-5,1	-4	G1P1	Não	Não
24	F	39	-2,0	-1,4	172	153	-1,0	4,5	-3,7	-1,4	M1P1	Não	Não
25	M	39	-2,0	-6,2	160	149,9	-2,0	15,3	-3,5	-1,9	G3P2	Sim	Não
26	F	39	-2,0	?	166	149	-1,9	8,35	-2,7	+0,3	M1P1	Não	Não
27	M	39	-3,0	-1,9	170	138	-2,1	8,4	-3,3	-1,4	G1P1	Não	Não
28	M	39	-2,1	?	160	146,6	-2,2	14,3	-3,49	-2,5	G1P1	Não	Não

Anexo 1 (conclusão): Características clínicas dos pacientes selecionados

Nº	Sexo	IG (sem)	Z PN	Z CN	Pai (cm)	Mãe (cm)	Z alt alvo	IC (anos)	Z altura	Z IMC	Puberdade	Microcefalia	Atraso DNPM
29	F	39	-2,5	?	156	150	-2,6	11,4	-3,6	-0,8	M1P1	?	Não
30	M	39	-3,3	?	170	154,5	-0,9	2,69	-3,2	-1,2	G1P1	Sim	Não
31	M	39	-1,6	-3,5	165	148	-1,8	12,3	-3	0,5	G1P1	?	Não
32	F	39	-2,1	-1,9	174	157	-0,5	4,9	-2,9	-1,3	M1P1	Sim	Não
33	M	35	-0,9	-2,0	164	145,7	-2,0	8,5	-2,9	-0,6	G1P1	Não	Não
34	F	39	-2,7	-4,6	165	150	-1,9	9,64	-2,5	-1,8	M2P1	?	Não
35	F	39	-2,4	-4,1	160	158	-1,6	7,07	-2	-1,9	M1P1	Sim	Não
36	M	32	-1,1	-2,0	163	164,7	-0,7	3,5	-2,17	1,3	G1P1	Não	Não
37	M	38	-4,8	?	164	158	-1,1	16,8	-3,65	-0,5	G4P3	?	Não
38	M	39	-2,0	?	180	145	-0,9	15,39	-3,3	-1,9	G4P4	?	Não
39	M	39	-1,6	-3,5	179	168,5	0,8	4,11	-2,8	0,0	G1P1	Sim	Leve
40	F	38	-2,2	-3,5	?	?	?	3,8	-2,7	-1,4	M1P1	Sim	Não
41	M	39	-2,0	-3,0	168	156	-0,9	8,5	-3,1	-0,4	G1P1	?	leve
42	M	39	-3,0	-1,9	(A)	(A)	(A)	7,5	-3,3	-1,1	G1P1	?	leve
43	M	39	-2,5	0,7	162	156	-1,4	13,56	-2,7	-1,0	G2P2	?	Não
44	M	39	-3,3	?	156	152	-2,1	13,9	-3,4	-2,9	G2P2	Sim	Não
45	M	30,5	-4,6	?	(A)	(A)	(A)	5	-3,73	-1,5	G1P1	Não	Não
46	M	39	-2,7	?	165	135	-2,7	8,6	-2,9	-0,7	G1P1	Não	Sim
47	M	38	-3,1	-5,2	166,8	167	-0,2	2,9	-2,0	-3,4	G1P1	Não	Não
48	M	39	-2,0	-1,9	170	145	-1,6	9,9	-2,3	-1,2	G1P1	Não	Não
49	F	39	-2,5	?	170	150	-1,5	8,7	-3,9	-0,5	M1P1	Não	Não
50	M	39	-3,1	-4,3	155	155	-2,0	5,63	-4	-2,2	G1P1	Sim	Não
51	F	35	-1,7	-7,3	174	152,5	-0,9	22,8	-4,5	1,3	M5P5	Sim	Sim
52	M	27,5	-2,6	-3,4	163	155	-1,4	7,3	-3	-2,1	G1P1	Não	Não
53	F	39	-2,0	-0,9	165	160	-1,0	9,25	-2,5	-2,7	M1P1	Não	Não
54	F	39	-2,0	0,2	170	157	-0,9	12,4	-2,4	-2,6	M1P1	Não	Não

IG = Idade gestacional; PN = peso ao nascimento; CN = comprimento ao nascimento; IC = idade cronológica; IMC = índice de massa corpórea.

Anexo 2: Análise laboratorial dos pacientes selecionados

Nº	Sexo	IC (anos)	Pico GH (ng/mL)	Z IGF-1	Z IGFBP3	Puberdade
1	M	10,1	5,8	+0,5	+1,25	G1P1
2	F	5,8	12,1	+1,75	+1,0	M1P1
3	M	6,0	20,3	0	+0,5	G1P1
4	F	4,9	26,5	+1,25	+1,5	M1P1
5	M	2,0	19,9	+1,5	+1,5	G1P1
6	F	7,1	23,2	+1,0	+1,25	M1P1
7	F	11,2	35	+0,75	+0,75	M3P2
8	M	5,9	NR	+1,5	+0,5	G1P1
9	M	13,4	6	0	-0,5	G2P1
10	F	6,3	10,2	+1,5	-1,5	M1P1
11	M	13,1	5,4	+1,0	+0,5	G1P3
12	F	7,0	12,8	0	+1,0	M1P1
13	F	8,2	10,4	+0,5	+0,5	M1P1
14	M	10,1	NR	+0,5	0	G1P1
15	F	7,1	13,7	+1,0	+1,25	M1P1
16	F	10,3	38,4	+1,0	0	M4P4
17	M	3,5	NR	0	+1,0	G1P1
18	F	4,5	12,4	+1,5	0	M1P1
19	M	5,0	6,2	+2,5	+2,25	G1P1
20	F	8,5	14,8	+1,5	+0,25	M1P1
21	F	7,2	8,5	+0,75	-0,5	M1P1
22	M	3,8	7,2	+1,0	+1,5	G1P1
23	M	6,9	31,9	+1,5	+2,0	G1P1
24	F	4,5	8,6	-1,5	-3,5	M1P1
25	M	15,3	29,6	0	0	G3P2
26	F	8,35	16,8	+0,5	NR	M1P1
27	M	8,4	28,1	-2,0	-1,25	G1P1
28	M	14,3	11,7	-3,5	-2,0	G1P1
29	F	11,4	17,7	-1,0	0	M1P1
30	M	2,69	27	-2,0	-0,5	G1P1
31	M	12,3	12,6	-2,0	0	G1P1
32	F	4,9	13,2	-2,0	0	M1P1
33	M	8,5	4,8	-1,0	-1,5	G1P1
34	F	9,64	17,7	-0,5	0,5	M2P1
35	F	7,07	NR	-1,5	-1,25	M1P1
36	M	3,5	12,8	-1,5	-1,0	G1P1
37	M	16,8	NR	-1,5	-1,25	G4P3

Anexo 2 (conclusão): Análise laboratorial dos pacientes selecionados

Nº	Sexo	IC (anos)	Pico GH	Z IGF-1	Z IGFBP3	Puberdade
38	M	15,39	18	+0,5	+1,5	G4P4
39	M	4,11	8,8	-3,0	-2,5	G1P1
40	F	3,8				M1P1
41	M	8,5	25,7	0	0	G1P1
42	M	7,5	16	-0,5	-0,5	G1P1
43	M	14	5,2	-1,0	-0,75	G2P2
44	M	13,9	5,0	-2,0	+0,5	G2P2
45	M	5	22	-2,25	-1,5	G1P1
46	M	8,6	20	-2,25	-1,0	G1P1
47	M	4,1	NR	+2,0	+2,0	G1P1
48	M	9,9	15,9	-1,5	0	G1P1
49	F	8,7	17,9	-1,0	+0,5	M1P1
50	M	5,63	25,2	-1,25	+0,5	G1P1
51	F	22,8	NR	0	0	M5P5
52	M	7,3	NR	0	+0,75	G1P1
53	F	9,25	5,6	-2,0	-2,5	M1P1
54	F	12,4	NR	-1,75	-0,25	M1P1

NR – Não realizado

Anexo 3: Artigo publicado no JCEM, dezembro, 2007

0021-972X/07/\$15.00/0
Printed in U.S.A.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 92(12):4889–4892
Copyright © 2007 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/jc.2007-1661

BRIEF REPORT

Polymorphisms Identified in the Upstream Core Polyadenylation Signal of *IGF1* Gene Exon 6 Do Not Cause Pre- and Postnatal Growth Impairment

Debora C. Coutinho, Rocio R. D. Coletta, Elaine M. F. Costa, Paulo R. Pachi, Margaret C. S. Boguszewski, Durval Damiani, Berenice B. Mendonca, Ivo J. P. Arnhold, and Alexander A. L. Jorge

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (D.C.C., R.R.D.C., E.M.F.C., B.B.M., I.J.P.A., A.A.L.J.), Laboratorio de Hormonios e Genetica Molecular LIM/42, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina, and Unidade de Endocrinologia Pediatrica (D.D.), Instituto da Crianca, Hospital das Clinicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, 05403-900 Sao Paulo, Brazil; Ambulatorio de Seguimento de Prematuros da Santa Casa de Sao Paulo (P.R.P.), 01221-020 Sao Paulo, Brazil; and Unidade de Endocrinologia Pediatrica (M.C.S.B.), Departamento de Pediatria, Hospital de Clinicas da Universidade Federal do Parana, 01221-020 Curitiba, Brazil

Background: Few children born small for gestational age (SGA) with *IGF1* mutations have been reported. One of these patients presented a mutation at 3' untranslated region (UTR) at exon 6, probably affecting the polyadenylation process.

Objective: The objective of the study was to sequence the *IGF1* gene of children born SGA.

Patients and Methods: *IGF1* (exons 1–6) was directly sequenced in 53 SGA children without catch-up growth. Allelic variant frequency of the identified *IGF1* polymorphisms was assessed in a total of 145 SGA children and in 180 controls born with adequate weight and length and adult height SD score greater than –2.

Results: No mutations were identified in the *IGF1* coding regions in SGA children. In contrast, six allelic variants were identified in the

upstream core polyadenylation signal located in *IGF1* 3' UTR at exon 6. The frequency of the different allelic variants was similar in SGA children and controls. It is noteworthy that the same allelic variant, previously described as causing severe *IGF1* deficiency, was also observed in homozygous ($n = 4$) and heterozygous state ($n = 6$) in normal height controls, corresponding to 4% of studied alleles. The three most frequently identified allelic variants of *IGF1* 3' UTR showed no effect on height SD score of adult controls as well as on birth characteristics in SGA children.

Conclusion: The polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal at *IGF1* exon 6 do not cause *IGF1* deficiency as well as pre- and postnatal growth impairment, in contrast to previously reported data. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 4889–4892, 2007)

IGF1, OMIM 147440, IS A CRITICAL factor for pre- and postnatal growth (1, 2). The major source of circulating IGF1 is the liver, but it is also ubiquitously produced in the body, with endocrine and paracrine action models (3). It is encoded by a single gene, the *IGF1* (NM_000618.2), which comprises six exons, distributed along 84,647 bp in the long arm of chromosome 12 (12 q22–q23). There are two different classes of *IGF1* mRNA, originated from different transcription start sites present in either exon 1 or 2, which also codify part of the signal peptide (4). Additionally, *IGF1* presents alternative splice sites that generate three major mRNA sizes of 1.1, 1.3, and 7.6 kb (5). The 1.1- and 7.6-kb *IGF1* mRNAs comprise exons 1 or 2 plus exons 3, 4, and 6, which share the same coding sequence and differ in terms of their 3' un-

translated region (UTR) due to alternative polyadenylation signal sequences at exon 6 (6). These two mRNAs produce IGF1A peptide (153 amino acids), the most abundant *IGF1* isoform (5). On the other hand, the 1.3-kb *IGF1* mRNA comprises exons 1 or 2 plus exons 3, 4, and 5, which generate IGF1B peptide (195 amino acids), a less abundant *IGF1* isoform.

Three *IGF1* mutations in homozygous state have been described to date: Woods *et al.* (7) described the deletion of *IGF1* exons 4–5, whereas Bonapace *et al.* (8) reported a mutation located at the polyadenylation site at the 3'UTR in exon 6 of the *IGF1* gene in patients with *IGF1* deficiency. Moreover, Walenkanp *et al.* (9) described an *IGF1* missense mutation (V44M) that originates a biologically inactive *IGF1* peptide. These patients share similar clinical features: intra-uterine growth retardation followed by extremely short stature, mental retardation, microcephaly, and sensorineural deafness. These patients present high levels of basal and/or stimulated GH. Low or undetectable levels of *IGF1* were observed in patients who carried disruptive *IGF1* mutations, in contrast with high levels of *IGF1* in those with the biologically inactive peptide.

First Published Online September 25, 2007

Abbreviations: SDS, sd score; SGA, small for gestational age; UCPAS, upstream core polyadenylation signal; UTR, untranslated region.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

4889

Downloaded from jcem.endojournals.org by Alexander Jorge on December 4, 2007

In 1990 Lajara *et al.* (10) screened for alterations in the *IGF1* gene; however, their negative results were not conclusive due to technique limitation. Two subsequent studies systematically analyzed the coding region of the *IGF1* gene in children with short stature: one analyzed exons 3 and 4 of the *IGF1* gene in small for gestational age (SGA) children (11), whereas the other analyzed exons 1–5 in short children, regardless of birth weight and length (12). Both studies used the single strand conformation polymorphism mutation screening method and identified no mutations (11, 12). Single strand conformation polymorphism can present false-negative results (13), which could have influenced the observed negative outcome. In the present study, we analyzed the *IGF1* coding region by direct sequencing in children born SGA who did not present spontaneous catch-up growth. A highly polymorphic region in the exon 6 of *IGF1* at 3'UTR was identified in patients and controls, including one allelic variant previously described in an IGF1-deficient child; the relevance of these allelic variants on prenatal growth was investigated.

Patients and Methods

One hundred forty-five children born SGA that presented birth weight and/or length below -2 SD for gestational age (14) and uncomplicated neonatal period were selected. None of these children presented endocrine disorders, chronic diseases, skeletal alterations, or any syndrome except Silver-Russell syndrome (five cases). Fifty-three of the 145 SGA children that did not present catch-up growth, demonstrated by height SD score (SDS) less than -2 after 2 yr of age (15), were selected for the sequencing of *IGF1* exon 1–6. The remaining 92 SGA children were included to assess the influence of allelic variants present in the exon 6 of *IGF1* at 3'UTR on prenatal growth.

One hundred eighty healthy adults born at term with adequate birth weight and length and height SDS greater than -2 comprised the control group.

Molecular studies

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes. Exons 1–6 of the *IGF1* gene were amplified using intronic primers in the 53 SGA children (primer sequences and amplification protocols will be provided on request). In the remaining 92 SGA children and the adult controls,

only exon 6 was amplified to assess the influence of allelic variants present in the 3'UTR of *IGF1* on prenatal growth. PCR products were directly sequenced with the dideoxy chain-termination method using a dye terminator kit and analyzed in an ABI Prism 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis

Weight, length, and head circumference at birth were expressed as SDS for gestational age and sex (14), whereas height was expressed as SDS for age and sex (15). Differences between groups were analyzed by *t* test or Mann-Whitney rank sum test for numerical variables and χ^2 or Fisher exact test for nominal variables, as appropriate. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Statistical analyses were performed using the SIGMAstat statistical software package (Windows version 2.03; SPSS Inc., San Rafael, CA).

Results

No mutations in the coding region of *IGF1* gene were identified in the 53 SGA children without spontaneous catch-up growth. It is notable that several allelic variants were identified in the exon 6 of *IGF1* at 3'UTR in SGA children. These allelic variants are located 260 bp downstream of TAG termination codon of *IGF1* gene, in a region that is involved in the polyadenylation process, which is called the upstream core polyadenylation signal (UCPAS) (Fig. 1).

IGF1 exon 6 was sequenced in all remaining children born SGA as well as in controls. The six distinct allelic variants, numbered 1–6, in *IGF1* UCPAS region were identified in comparison with the wild-type sequence (Fig. 1): variant 1, an A>T substitution in the first nucleotide comprising the AATATA polyadenylation signal motif; variant 2, a T>A substitution in the third nucleotide of AATATA motif; variant 3, a deletion of the second nucleotide in AATATA motif; variant 4, a substitution of A > T in the nucleotide 1 bp upstream of AATATA motif; variant 5, deletion of the third nucleotide in AATATA motif; and variant 6, a substitution of A > T in the nucleotide 2 bp upstream of AATATA motif together with allelic variant 1.

The wild-type sequence was the most frequently observed allele in children born SGA as well as in controls (Table 1):

FIG. 1. Nucleotide sequence of the UCPAS located in exon 6 of the *IGF1* at 3'UTR. Wild-type and six allelic variant sequences (numbered 1–6) are depicted. The natural and alternative polyadenylation signal motifs are underlined. Solid arrows indicate the nucleotide change(s) in each variant.

Allelic variants	Translated region	3' untranslated region
WT:	AGG ATG TAG	gaagac...245bp...gaaaaaaa <u>aataata</u> tatatatatatctta <u>gtccctg</u>
1:	AGG ATG TAG	gaagac...245bp...gaaaaaaa <u>tataata</u> tatatatatatctta <u>gtccctg</u>
2:	AGG ATG TAG	gaagac...245bp...gaaaaaaa <u>aaataa</u> <u>tata</u> tatatatatctta <u>gtccctg</u>
3:	AGG ATG TAG	gaagac...245bp...gaaaaaaa <u>a-tata</u> tatatatatatctta <u>gtccctg</u>
4:	AGG ATG TAG	gaagac...245bp...gaaaaaaat <u>aataata</u> tatatatatatctta <u>gtccctg</u>
5:	AGG ATG TAG	gaagac...245bp...gaaaaaaa <u>aa-ata</u> <u>tata</u> tatatatatctta <u>gtccctg</u>
6:	AGG ATG TAG	gaagac...245bp...gaaaaaata <u>aataata</u> tatatatatatctta <u>gtccctg</u>

Termination codon

Cleavage site for poly(A) addition

TABLE 1. Frequency of allelic variants observed in the UCPAS located in the exon 6 of *IGF1* at 3'UTR

Alleles	Controls, n (%) ^a	Children born SGA, n (%)
Wild-type variant	278 (77.2)	226 (77.9)
Allelic variant 1	51 (14.2)	42 (14.5)
Allelic variant 2	14 (3.9)	6 (2.1)
Allelic variant 3	11 (3.1)	11 (3.8)
Allelic variant 4	5 (1.4)	2 (0.7)
Allelic variant 5	0 (0.0)	2 (0.7)
Allelic variant 6	1 (0.3)	1 (0.3)

Data are shown as absolute numbers of alleles and percent.

^a Controls were born adequate for gestational age and presented normal height at adult age.

it was found in homozygous state in 60% of SGA children and 63% of the control group. The frequencies of identified allelic variants were similar in the controls and in children born SGA (Table 1).

It is noteworthy that the allelic variant 2, previously described by Bonapace *et al.* (8) as the cause of *IGF1* deficiency in one SGA child, was also observed in homozygous ($n = 4$) and heterozygous state ($n = 6$) in controls, corresponding to 3.9% of studied alleles. The heights SDS of the four adults homozygous for allelic variant 2 ranged from -0.1 to $+2.4$.

The influence of the most frequent allelic variants on birth characteristics in children born SGA and on adult height in controls was investigated. Children homozygous for the wild-type allele or those carrying one or two copies of allelic variant 1, 2, or 3 presented similar gestational age, birth weight, length, and head circumference SDS (Table 2). Similarly, no effect of these allelic variants on adult height was observed: height SDS of 0.2 ± 1.1 for wild type ($n = 112$), 0.2 ± 1.2 for allelic variant 1 carriers ($n = 48$), 0.3 ± 1.1 for allelic variant 2 carriers ($n = 10$), 0.2 ± 1.2 for allelic variant 3 carriers ($n = 11$); $P = 0.9$.

Discussion

The substantial genetic contribution to interindividual variation of circulating IGF1 levels is well recognized (16). In addition, low circulating IGF1 levels were observed in children born SGA (1). However, there have been few reports of mutations in *IGF1* gene explaining pre- and postnatal growth retardation (7–9), and few studies have investigated the association between growth and a limited number of polymorphisms in *IGF1* noncoding region (17). In the present study, the *IGF1* coding region was analyzed in a group of children born SGA without catch-up growth. None of these children had mutations or polymorphisms in the *IGF1* coding region. Conversely, a very polymorphic region in the 3'

UTR sequence in *IGF1* exon 6 was characterized. This region, located upstream of the polyadenylation addition site, comprehends an important region for the correct identification of the endonucleolytic cleavage of pre-mRNA and subsequent addition of poly(A) tail to the newly formed 3' end (18).

The poly(A) tail is critical for the regulation of mRNA stability and translation (19). One of the polyadenylation signals is the highly conserved AAUAAA hexamer or a close variant thereof (termed UCPAS) located 10–30 nucleotides upstream of the cleavage site (20). The α - and β -thalassemia are examples of human diseases caused by mutations in UCPAS regions (18).

In 2003 Bonapace *et al.* (8) analyzed the *IGF1* gene in one child born SGA presenting clinical and laboratory findings compatible with isolated IGF1 deficiency. The molecular study of the *IGF1* gene in this patient disclosed a homozygous nucleotide substitution (AATATA > AAAATA) in the UCPAS located in *IGF1* exon 6. The fact that this was the only allelic variant found in *IGF1*, and its absence in 100 unrelated healthy controls, led the authors to conclude that this mutation was responsible for the patient's phenotype (8, 18).

However, our molecular study of 145 SGA children and 180 adult controls identified several polymorphisms in *IGF1* UCPAS, including the same allelic variant described by Bonapace *et al.* (8) identified in homozygous state in four controls from our cohort. It is noteworthy the AATATA > AAAATA change (allelic variant 2) yields an alternative AATATA motif 2 bp downstream from the physiological UCPAS hexamer (Fig. 1). Similar upstream or downstream dislocation of the UCPAS hexamer occurs in the other described allelic variants. The fact that children and adults harboring these allelic variants do not present a distinct phenotype in comparison with those homozygous for the wild-type allele (Table 2) proposes that *IGF1* UCPAS variants do not have a major influence on birth characteristics in children born SGA or on adult height of healthy individuals born adequate for gestational age. This finding suggests that AATATA > AAAATA change is not responsible for isolated IGF1 deficiency observed in the patient described by Bonapace *et al.* It is likely that a nonscreened mutation in the intronic or in the promoter region of *IGF1* gene could be responsible for the phenotype observed in their patient.

In conclusion, *IGF1* is a well-conserved gene, and mutations in *IGF1* are rare in children born SGA. However, a highly polymorphic region located in the upstream core polyadenylation signal at *IGF1* exon 6 has been identified for the first time in the present study. Our clinical and laboratory data demonstrate that these polymorphisms do not cause

TABLE 2. Clinical features at birth of children born SGA regarding the four most frequent genotypes in the UCPAS located in *IGF1* exon 6

Allelic variant	Homozygous for wild type	One or two alleles of allelic variants		
		1	2	3
No. of individuals	87	40	6	11
Gestational age, wk	36 ± 3.7	36 ± 3.2	36 ± 3.2	34 ± 3.5
Length at birth SDS	-3.3 ± 1.3	-3.3 ± 1.3	-2.5 ± 0.7	-3.2 ± 1.1
Weight at birth SD	-2.5 ± 1.0	-2.3 ± 0.6	-2.4 ± 0.5	-2.0 ± 1.8
Head circumference SDS	-2.0 ± 1.5	-1.6 ± 1.4	-1.8 ± 1.7	-2.3 ± 0.8

Data are shown as mean $\pm$ SD.

IGF1 deficiency as well as pre- and postnatal growth impairment (8).

Acknowledgments

We thank Ms. Sonia Strong for helping with the English language.

Received July 25, 2007. Accepted September 19, 2007.

Address all correspondence and requests for reprints to: Alexander A. L. Jorge, Hospital das Clinicas, Laboratorio de Hormonios, Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar 155 PAMB, 2 andar Bloco 6, 05403-900 São Paulo, Brazil. E-mail: alexj@usp.br.

This work was supported by grants from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (05/04726-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (142062/06-5, to D.C.C.; 301246/95-5, to B.B.M.; 300938/06-3, to I.J.P.A.; 306000/04-0, to M.C.S.B., and 307951/06-5, to A.A.L.J.).

Disclosure Statement: The authors declare that they have no competing financial interests.

References

- Murphy VE, Smith R, Giles WB, Clifton VL 2006 Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev* 27:141–169
- Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME 1998 Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocr Rev* 19:625–646
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D 1999 Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7324–7329
- Yang H, Adamo ML, Koval AP, McGuinness MC, Ben-Hur H, Yang Y, LeRoith D, Roberts Jr CT 1995 Alternative leader sequences in insulin-like growth factor I mRNAs modulate translational efficiency and encode multiple signal peptides. *Mol Endocrinol* 9:1380–1395
- Sussenbach JS, Steenbergh PH, Holthuisen P 1992 Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regul* 2:1–9
- Jansen E, Steenbergh PH, van Schaik FM, Sussenbach JS 1992 The human IGF-I gene contains two cell type-specifically regulated promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1219–1226
- Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ 1996 Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335:1363–1367
- Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P 2003 A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor I (IGF1) deficiency. *J Med Genet* 40:913–917
- Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, Mohan S, Denley A, Forbes B, van Duyvenvoorde HA, van Thiel SW, Sluimers CA, Bax JJ, de Laat JA, Breuning MB, Romijn JA, Wit JM 2005 Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2855–2864
- Lajara R, Galgani Jr JP, Dempsher DP, Bier DM, Rotwein P 1990 Low prevalence of insulin-like growth factor-1 gene mutations in human growth disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 70:687–692
- Johnston LB, Leger J, Savage MO, Clark AJ, Czernichow P 1999 The insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene in individuals born small for gestational age (SGA). *Clin Endocrinol (Oxf)* 51:423–427
- Obrepalska-Stepiowska A, Kedzia A, Trojan J, Gozdicka-Jozefiak A 2003 Analysis of coding and promoter sequences of the IGF-I gene in children with growth disorders presenting with normal level of growth hormone. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16:1267–1275
- Hestekin CN, Barron AE 2006 The potential of electrophoretic mobility shift assays for clinical mutation detection. *Electrophoresis* 27:3805–3815
- Usher R, McLean F 1969 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* 74:901–910
- Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M 1966 Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. *L Arch Dis Child* 41:454–471
- Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P, Koistinen R, Seppala M 1996 Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J Clin Invest* 98:2612–2615
- Johnston LB, Dahlgren J, Leger J, Glander L, Savage MO, Czernichow P, Wikland KA, Clark AJ 2003 Association between insulin-like growth factor I (IGF-I) polymorphisms, circulating IGF-I, and pre- and postnatal growth in two European small for gestational age populations. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4805–4810
- Chen JM, Ferec C, Cooper DN 2006 A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet* 120:1–21
- Anderson JT 2005 RNA turnover: unexpected consequences of being tailed. *Curr Biol* 15:R635–R638
- Zarudnaya MI, Kolomiets IM, Potyahaylo AL, Hovorun DM 2003 Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures. *Nucleic Acids Res* 31:1375–1386

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

8 *Referências*

1. Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL 1995 Children born small for gestational age: do they catch-up? *Pediatr Res* 38:267-271
2. Karlberg J, Albertsson-Wikland K 1995 Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res* 38:733-739
3. Gluckman PD 1997 Endocrine and nutritional regulation of prenatal growth. *Acta Paediatr Suppl* 423:153-157; discussion 158.
4. Gluckman PD 1995 Clinical review 68: The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1047-1050.
5. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ 1996 Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335:1363-1367.
6. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfaffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausk SD 2003 IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 349:2211-2222
7. Salmon W 1957 A hormonally controlled serum factor wich stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49:825-836

-
8. Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 112:2215-2217
 9. Nakae J, Kido Y, Accili D 2001 Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocrine reviews* 22:818-835
 10. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A 1993 Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82.
 11. Rosenzweig S 2004 What's new in the IGF-binding proteins? *Growth Horm IGF Res* 14:329-323
 12. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D 2002 Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110:771-781.
 13. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D 1999 Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7324-7329
 14. Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ, Davey HW 1997 Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7239-7244
 15. Philip J. Smith ELS, Jonh Coakley, Charles J. Hinds, Richard J.M. Ross, Adrian R. Krainer and Shern L. Chew 2002 An Exonic Splicing Enhancer in Human IGF-I Pre-mRNA Mediates Recognition of Alternative Exon5 by the Serine-Arginine Protein Splicing Factor-2/ Alternative Splicing Factor *Endocrinology* 143:8
-

-
16. Ullrich AGA, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Lebon T, Kathuria S, Chen F, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J, Fujita Y. 1986 Insuline like growth factor I receptor primary structure: comparision with insulin receptor suggests determinants that define funcyional specificity. *EMBO J*
 17. Werner H, Hernandez-Sanchez C, Karnieli E, Leroith D 1995 The regulation of IGF-I receptor gene expression. *The international journal of biochemistry & cell biology* 27:987-994
 18. Alice M. Abbot RB, Michael T. Pedrine, Janet M. Murray, Robert J. Smith 1992 Insuline-like Growth Factor I Receptor Gene Structure. *The Journal of Biological Chemistry* 267:5
 19. Laron Z 2001 Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol*
 20. Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME 1998 Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocrine reviews* 19:625-646
 21. Dupont J 2001 Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *J Horm Res* 55:22-26
 22. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A 1993 Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.
 23. Butler AA, LeRoith D 2001 Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142:1685-1688
-

-
24. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ 1990 A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345:78-80
 25. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H 1996 Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12:106-109
 26. Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski M, Sun L, Bartke A 2004 Long-lived Growth Hormone Receptor Knockout Mice: Interaction of Reduced IGF-1/insulin Signaling and Caloric Restriction. *Endocrinology*
 27. Duvillie B, Cordonnier N, Deltour L, Dandoy-Dron F, Itier JM, Monthieux E, Jami J, Joshi RL, Bucchini D 1997 Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5137-5140
 28. Ueki K, Yamauchi T, Tamemoto H, Tobe K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Akanuma Y, Yazaki Y, Aizawa S, Nagai R, Kadowaki T 2000 Restored insulin-sensitivity in IRS-1-deficient mice treated by adenovirus-mediated gene therapy. *J Clin Invest* 105:1437-1445
 29. Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Bucchini D 1996 Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *Embo J* 15:1542-1547
 30. Woods KA, Camacho-Hubner C, Barter D, Clark AJ, Savage MO 1997 Insulin-like growth factor I gene deletion causing intrauterine growth retardation and severe short stature. *Acta Paediatr Suppl* 423:39-45.
-

31. Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P 2003 A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J Med Genet* 40:913-917
 32. Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, Mohan S, Denley A, Forbes B, van Duyvenvoorde HA, van Thiel SW, Sluimers CA, Bax JJ, de Laat JA, Breuning MB, Romijn JA, Wit JM 2005 Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2855-2864
 33. Kawashima Y 2005 Mutation at Cleavage Site of Insulin-Like Growth Factor Receptor in a Short-Stature Child Born with Intrauterine Growth Retardation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90:4679-4687
 34. Walenkamp MJ, van der Kamp HJ, Pereira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, Breuning MH, Romijn JA, Karperien M, Wit JM 2006 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* 91:3062-3070
 35. Inagaki k 2007 A Familial Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Mutant Leads to Short Stature: Clinical and Biochemical Characterization. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92:1542-1548
 36. de Zegher F, Francois I, van Helvoirt M, Van den Berghe G 1997 Clinical review 89: Small as fetus and short as child: from endogenous to exogenous growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2021-2026.
-

-
37. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M 1966 Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child* 41:454-471.
 38. Silva EG, Shessarenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, Marui S, Mendonca BB 2003 GH Values after Clonidine Stimulation Measured by Immunofluorometric Assay in Normal Prepubertal Children and GH-Deficient Patients. *Horm Res* 59:229-233
 39. Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
 40. Coutinho DC, Coletta RR, Costa EM, Pachi PR, Boguszewski MC, Damiani D, Mendonca BB, Arnhold IJ, Jorge AA 2007 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* 92:4889-4892
 41. Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P, Koistinen R, Seppala M 1996 Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J Clin Invest* 98:2612-2615
 42. Murphy VE, Smith R, Giles WB, Clifton VL 2006 Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocrine reviews* 27:141-169
 43. Chen JM, Ferec C, Cooper DN 2006 A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet* 120:1-21
-

44. Anderson JT 2005 RNA turnover: unexpected consequences of being tailed. *Curr Biol* 15:R635-638
 45. Zarudnaya MI, Kolomiets IM, Potyahaylo AL, Hovorun DM 2003 Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures. *Nucleic Acids Res* 31:1375-1386
 46. Okubo Y, Siddle K, Firth H, O'Rahilly S, Wilson LC, Willatt L, Fukushima T, Takahashi S, Petry CJ, Saukkonen T, Stanhope R, Dunger DB 2003 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* 88:5981-5988
 47. Martoglio B, Dobberstein B 1998 Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in cell biology* 8:410-415
 48. Racchi M, Watzke HH, High KA, Lively MO 1993 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* 268:5735-5740
-