

RESUMO

César Luiz Boguszewski

O hormônio de crescimento (GH, *growth hormone*), o fator de crescimento insulina símile-1 (IGF1, *insulin-like growth factor-1*) e uma enorme variedade de moléculas afins formam um eixo regulador do crescimento pré e pós-natal. Os permanentes avanços nas técnicas de biologia molecular têm facilitado a identificação de defeitos genéticos nos diferentes componentes do eixo GH-IGF1 em crianças com baixa estatura. Por outro lado, a aplicação de novos métodos de dosagens hormonais tem revelado a existência de formas inativas de GH ou quantidades aumentadas de formas com menor atividade biológica, cuja presença na circulação poderia justificar o retardo de crescimento em certas crianças com baixa estatura. Clinicamente, os defeitos genéticos no eixo GH-IGF1 podem se manifestar tanto em síndromes de deficiência como de resistência hormonal, enfatizando a importância de se avaliar não apenas a secreção de GH numa criança com baixa estatura, mas também marcadores periféricos de uma possível resistência tecidual ao hormônio. Neste artigo, os principais defeitos genéticos descritos até o presente momento no eixo GH/IGF1 são revisados, com enfoque sobre as repercussões clínicas destes defeitos e a importância da avaliação genética no diagnóstico diferencial da baixa estatura idiopática e da baixa estatura familiar. Na parte final, alguns breves comentários são feitos sobre defeitos genéticos encontrados em dois importantes fatores de transcrição da hipófise, que provocam um quadro clínico de deficiência combinada de hormônios pituitários, incluindo a deficiência de GH. (Arq Bras Endocrinol Metab 2001;45/1:5-14)

Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (SEMPR), Curitiba, Paraná.

Unitermos: GH; IGF1; Crescimento; Baixa estatura; Genética molecular

ABSTRACT

Growth hormone (GH), insulin-like growth factor-1 (IGF1) and several related molecules are involved in the growth regulation axis at both pre and postnatal life. The advances in molecular biology techniques have improved the way of identifying genetic defects in different elements of the GH-IGF1 axis in children with short stature. On the other hand, the use of new GH assays have revealed the presence of GH with no biological activity or increased amounts of less active GH isoforms in the circulation, which could potentially be the cause of growth retardation in certain children with short stature. Clinically, the genetic defects might result in either hormone deficiency or resistance, showing the importance of evaluating both GH secretion and GH responsiveness in a short child. In the present article, the main genetic defects within the GH-IGF1 axis are reviewed with focus in their clinical repercussion and their importance in the differential diagnosis of idiopathic and familial short stature. In addition, a short review on the genetic abnormalities found in two of the most important pituitary transcription factors will be presented. (Arq Bras Endocrinol Metab 2001;45/1:5-14)

Keywords: GH; IGF1; Growth; Short stature; Molecular genetics

*Recebido em 20/10/00
Aceito em 10/01/01*

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O EIXO GH-IGF1

O HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (GH, *GROWTH HORMONE*) é o peptídeo produzido em maior quantidade pela hipófise anterior, exercendo um papel de destaque no crescimento ósseo e dos tecidos moles, particularmente no período pós-natal. Estes efeitos biológicos do GH são em grande parte mediados pela produção do fator de crescimento insulina símile-I (IGF1, *insulin-like growth factor-1*) no fígado e em tecidos periféricos. Nas últimas décadas, diferentes autores têm se envolvido em uma grande controvérsia a respeito de duas teorias sobre os efeitos do GH e do IGF1 no crescimento pós-natal. A teoria clássica defende que o IGF1 produzido no fígado sob estímulo do GH é que age na placa de crescimento através do seu receptor tecidual específico (IGF1R, *IGF1 receptor*) (1). Por outro lado, a chamada "teoria do efeito duplo" diz que o GH exerce, além do conhecido efeito hepático, um efeito direto no osso através do seu receptor (GHR, *growth hormone receptor*), provocando diferenciação dos pré-condrócitos em condrócitos jovens. Após esta etapa, os condrócitos jovens iniciam a produção de IGF1 que, através de efeitos parácrinos, estimula a expansão clonal e a maturação dos condrócitos na placa de crescimento (2,3). Mais recentemente, um estudo com camundongos transgênicos nos quais a produção hepática de IGF1 foi abolida, demonstrou que os animais cresceram normalmente, apesar de uma redução de 75% nos níveis séricos de IGF1, sugerindo que o IGF1 produzido pelo fígado não é essencial para o crescimento pós-natal (4). Ao contrário do observado no período pós-natal, a participação do GH no crescimento fetal intra-útero é bem menos relevante, com o IGF1 tendo um papel mais importante nesta fase (5). No sangue periférico, o IGF1 se associa a proteínas de ligação, sendo que até o presente momento seis diferentes IGFbps (*IGF1 binding proteins*) estão bem caracterizadas. A principal delas é a IGFbp-3, cuja produção, assim como aquela do IGF1, também é estimulada pelo GH (6).

Um dos estímulos para produção e secreção de GH pela hipófise resulta da ligação do hormônio liberador de GH (GHRH, *GH releasing hormone*), produzido no hipotálamo, ao seu receptor (GHRHR, *GHRH receptor*), presente na membrana celular do somatotrofo (7). O GHRHR é um receptor associado à proteína G, codificado por um gene de 13 éxons, que possui um domínio extracelular, sete domínios transmembrana e um domínio intracelular (8). A produção de GH inicia-se com a transcrição do gene

GH1, que possui cinco éxons na sua estrutura. O principal produto do gene GH1 (cerca de 90% do total) origina-se da remoção de todos os seus íntrons, formando um RNA mensageiro que codifica uma molécula de GH com 191 aminoácidos e peso molecular de 22 kilodaltons (kDa). Um processamento alternativo do gene GH1, em que ocorre uma perda de 45 nucleotídeos do éxon 3, leva à produção de uma molécula de GH com 176 aminoácidos e peso molecular de 20kDa (9,10). Além destes dois peptídeos, outras isoformas e fragmentos da molécula de GH estão presentes em quantidades variáveis na circulação em consequência de fenômenos como agregação e proteólise (9,10).

Na circulação sanguínea, cerca de metade do GH encontra-se ligado com alta afinidade à proteína de ligação GHBP (*GH binding protein*), cuja estrutura química é homóloga à porção extracelular do GHR. Em algumas espécies, como nos roedores, a GHBP tem origem de um processamento alternativo do RNA mensageiro do gene do GHR. Já na espécie humana, a porção extracelular do GHR ancorado na membrana celular sofre ação de uma protease e, a partir desta clivagem, surge a GHBP circulante (11). O GHR é codificado por 9 éxons do gene GHR numerados de 2 a 10, sendo que a parte extracelular do GHR (correspondente a GHBP) é proveniente dos éxons 3 a 7, a parte transmembrana do éxon 8 e a parte intracelular dos éxons 9 e 10 (12).

Para exercer os seus efeitos biológicos, o GH provoca dimerização do seu receptor. Para tanto, a molécula de GH possui dois sítios de ligação na sua estrutura, sendo que cada um deles vai se ligar de modo seqüencial a duas moléculas de GHR. Na fase inicial deste processo, o sítio 1 de ligação do GH se liga a uma molécula de GHR formando um complexo 1:1 inativo, isto é, incapaz de provocar dimerização do GHR. Em seguida, o sítio 2 de ligação do GH se liga a uma segunda molécula de GHR, constituindo assim o complexo ativo 2:1, que provoca dimerização do GHR e inicia uma cascata de eventos intracelulares envolvendo as proteínas das famílias JAK e STAT (13).

O funcionamento inadequado de algum dos genes que respondem pela produção dos diferentes componentes do eixo GH/IGF1 pode levar a diferentes quadros clínicos de retardo de crescimento. Neste artigo, procuramos revisar os principais defeitos genéticos descritos até o presente momento no eixo GH/IGF1, com enfoque nas repercussões clínicas destes defeitos nos estados de deficiência ou resistência hormonal e no diagnóstico da baixa estatura idiopática e da baixa estatura familiar.

DEFICIÊNCIA ISOLADA DE GH ("NANISMO HIPOFISÁRIO")

Alterações genéticas do GHRHR

As primeiras mutações no gene do GHRHR foram descritas em dois primos de primeiro grau, uma menina de 3,5 anos e um menino de 16 anos, de uma família consanguínea muçulmana residente em Bombaim, na Índia (14). Estas crianças apresentavam um quadro clínico indistinguível daquele da deficiência isolada de GH (DIGH) caracterizado por severo retardo de crescimento, bossa frontal e obesidade em tronco. Os níveis plasmáticos basais e estimulados de GH eram baixos, assim como os níveis basais de IGF1 e IGFBP-3. O exame molecular mostrou uma troca do nucleotídeo G para T na posição 265 do gene do GHRHR, que prediz a formação de uma proteína truncada sem os domínios transmembrana e sem o sítio de ligação à proteína G. Posteriormente, outras duas famílias com a mesma mutação foram descritas, uma em Sindh, no Paquistão (15) e a outra em Delf, no Sri Lanka (16).

Uma característica clínica interessante observada nestes indivíduos foi o aumento da secreção de GH após administração exógena de peptídeos liberadores de GH (GHRPs, *GH releasing peptides*) e de benzaminas não-peptídicas, que assim poderiam ser potencialmente usadas no tratamento da baixa estatura destas crianças (14). Entretanto, deve-se destacar que os indivíduos afetados com mutações no gene do GHRHR respondem bem ao tratamento com GH recombinante exógeno (14).

No Brasil, uma nova mutação autossômica recessiva inativadora no gene do GHRHR foi descrita em mais de uma centena de indivíduos residentes na cidade de Itabaianinha, estado de Sergipe. A mutação consiste numa troca de G para A na posição +1 do íntron 1 (IVS 1, *donor splice site*) do gene do GHRHR, ocasionando uma mudança na seqüência intrônica GT necessária para a remoção do IVS 1. Este defeito poderia resultar tanto na síntese de um GHRHR truncado, como poderia impedir a produção do GHRHR (17). O quadro clínico e laboratorial dos indivíduos homocigotos é o da deficiência isolada de GH, similar ao dos outros indivíduos com mutações no gene do GHRHR, com função tireoideana e níveis de cortisol normais e fertilidade preservada. Já os indivíduos heterocigotos da população de Itabaianinha apresentam estatura similar à dos indivíduos não portadores da mutação (18).

Alterações genéticas do GH

Uma significativa proporção de casos de DIGH tem origem genética. Existem pelo menos quatro desordens mendelianas que podem cursar com DIGH, in-

cluindo duas formas em que a herança é autossômica recessiva (DIGH IA e IB), uma em que ela é autossômica dominante (DIGH II) e outra em que ela é ligada ao cromossomo X (DIGH III) (19).

DIGH IA. É a forma mais severa de DIGH, com retardo de crescimento já aparente nos primeiros 6 meses de vida, por vezes associado com episódios de hipoglicemia. As crianças afetadas respondem bem inicialmente ao tratamento com GH exógeno, mas muitas delas desenvolvem anticorpos anti-GH que irão bloquear a ação do hormônio recombinante e a boa resposta terapêutica inicial. Os defeitos genéticos no gene GH1 são heterogêneos incluindo deleções e vários tipos de mutações (*frameshift* e *nonsense mutations*). Invariavelmente, estes defeitos genéticos levam à ausência total da produção hipofisária de GH (19,20).

DIGH IB. Pacientes com esta forma de DIGH têm baixa estatura, níveis plasmáticos baixos, porém detectáveis de GH, e uma boa resposta ao tratamento com GH exógeno, sem o desenvolvimento de anticorpos bloqueadores. A explicação mais provável para estas diferenças com a DIGH IA é que os defeitos genéticos na DIGH IB resultam na produção de moléculas mutantes de GH com uma seqüência de aminoácidos distinta do GH normal. Estes GH mutantes reagem pouco nos radioimunoensaios (RIA) de GH e não exercem qualquer atividade biológica, mas a presença deles no sangue periférico é capaz de criar tolerância imunológica evitando a formação de anticorpos anti-GH, como acontece na DIGH IA (19,20). Um dos defeitos genéticos descritos na DIGH IB inclui mutações do tipo *splicing* no íntron IV que resulta em perda dos aminoácidos 103 a 126 do éxon 4 e mudança de seqüência polipeptídica (*frameshift*) codificada pelo éxon 5 do gene GH1 (19). Em outro paciente com DIGH IB, dois defeitos genéticos foram encontrados no gene GH1: um alelo tinha uma deleção de 6,7kb na sua estrutura e o outro apresentava uma deleção de dois nucleotídeos no éxon 3, que causava uma mudança de seqüência de aminoácidos (*frameshift*) a partir do éxon 3, com um códon de parada (*stop codon*) na posição 132 do éxon 4. Este paciente teve uma resposta positiva ao tratamento com GH e não produziu anticorpos anti-GH, corroborando a idéia de que algum tipo de molécula GH símile estava sendo produzida, levando à tolerância imunológica (19).

DIGH II. Pacientes com esta forma de DIGH têm sempre um dos pais com o problema e a severidade das manifestações clínicas varia entre os parentes afetados. Os níveis séricos de GH são baixos, porém detectáveis, e geralmente há uma boa resposta ao tratamento com GH exógeno. Embora diferentes

mutações causando DIGH II tenham sido descritas no gene GH1, todas invariavelmente localizam-se no intron 3 e afetam a transcrição de todo éxon 3, responsável pela seqüência de aminoácidos 32-71 da molécula de GH. Os indivíduos afetados são heterozigotos e as mutações são “dominantes-negativas”, isto é, o alelo mutante prevalece sobre o alelo não afetado e consegue interferir na síntese e/ou liberação da molécula normal de GH. Entretanto, o mecanismo pelo qual o mutante suprime a secreção da molécula intacta de GH pelo alelo normal não é totalmente conhecido. A perda da seqüência 32-71, na qual está presente uma das quatro cisteínas da molécula intacta de GH, resulta na síntese de uma molécula de GH de 17,5kDa contendo uma cisteína não pareada. Postula-se que esta alteração na molécula de 17,5kDa facilitaria a formação de heterodímeros ou agregados com a molécula de GH normal de 22kDa, o que impediria a liberação desta última dos grânulos secretores da célula somatotrófica (20). Outra hipótese é que a presença da molécula mutante diminui a estabilidade intracelular da molécula normal de GH (21).

DIGH III. As manifestações clínicas costumam ser distintas nas diferentes famílias com esta forma de DIGH ligada ao cromossomo X. Alguns pacientes podem apresentar um quadro de agamaglobulinemia associada à deficiência de GH, sugerindo que nestes casos podem estar presentes defeitos em genes contíguos no Xq21.3→q22. Em outros casos tem sido encontrada uma deleção intersticial do Xp22.3 ou duplicação do Xq13.3→q21.2, sugerindo que múltiplos locus podem estar envolvidos com DIGH III (19).

GH BIOINATIVO, ISOFORMAS MOLECULARES DO GH E GH MUTANTES

Kowarski e cols. (22) foram os primeiros a sugerir que a produção de uma molécula de GH bioinativa poderia ser uma causa de retardo de crescimento em crianças com baixa estatura. Os achados clínicos sugestivos da presença de GH bioinativo (“Síndrome de Kowarski”) são baixa estatura com atraso da idade óssea, níveis séricos normais ou altos de GH, níveis baixos de IGF1 que aumentam após administração exógena de GH no teste de geração de IGF1, e boa resposta ao tratamento com GH, caracterizada por aumento significativo na velocidade de crescimento e normalização dos níveis de IGF1. Posteriormente, outros autores relataram casos clínicos sugestivos da presença de GH bioinativo, nos quais 60-90% do GH circulante era formado por dímeros e tetrâmeros, mas sem a confirmação de um defeito genético subjacente (23,24).

Em 1996, Takahashi e cols. (25) relataram o caso de um menino de 4 anos e 11 meses com 81,7cm (6,1 desvios padrões abaixo da média), proporções corporais normais, testa proeminente, nariz em forma de sela e idade óssea de 2 anos. Os níveis basais de GH eram altos (7 e 14ng/mL), com valores de picos após diferentes testes de estímulo variando entre 15 e 38ng/mL. O ensaio de bioatividade do GH mostrou valores abaixo da faixa normal e a análise isoelétrica do soro do paciente mostrou um pico anormal em adição ao pico normal de GH. O nível basal de IGF1 era baixo (34ng/mL; normal, 35-293) e não houve incremento no teste de geração. Em adição, os níveis séricos de IGFBP-3 e GHBP também eram baixos. A velocidade de crescimento e os níveis de IGF1 aumentaram na fase inicial do tratamento com GH recombinante, mas esta resposta não se manteve com o tratamento prolongado. O estudo molecular mostrou que o menino era heterozigoto para a mutação C→T no éxon 4 do gene GH1, levando à substituição de arginina por cisteína no códon 77. A molécula de GH resultante desta mutação tem uma afinidade de ligação a GHBP/GHR aproximadamente seis vezes maior do que a observada com a molécula normal de GH, mas é incapaz de dimerizar o GHR. Este potente efeito dominante e antagonista do GH mutante explica o não incremento dos níveis de IGF1 no teste de geração e a ineficácia do tratamento com GH recombinante. O intrigante neste caso clínico é que o pai do menino também era heterozigoto para a mutação descrita, mas sua estatura era normal e a análise isoelétrica do seu soro não revelou nenhum pico anormal que pudesse corresponder a do GH mutante, fatos que permanecem ainda sem uma explicação satisfatória.

Um ano após este primeiro relato de mutação no gene GH1, o mesmo grupo descreveu o caso de uma menina de 3 anos com 79,4cm (3,6 desvios padrões abaixo da média), proporções corporais normais, testa proeminente, nariz hipoplásico e idade óssea de 1,5 anos (26). Os níveis basais de GH variavam entre 3,7 e 19ng/mL, com valores de pico após diferentes estímulos variando entre 26 e 51ng/mL. A análise isoelétrica do soro confirmou a presença do GH mutante, numa quantidade 3,7 vezes maior do que o GH normal. O nível sérico basal de IGF1 era de 0,28U/mL (normal: 0,3-1,5), e aumentou para 1,21U/mL no teste de geração. Após 1 ano de tratamento com GH recombinante, a velocidade de crescimento aumentou de 4,5cm/ano para 11cm/ano, com aumento dos níveis de IGF1 para 3,2U/mL. O estudo molecular deste caso revelou uma mutação heterozigota (A→G) também no éxon 4 do gene GH1, mas desta vez provocando a substituição de glicina por

ácido aspártico no códon 112. Este defeito afeta o sítio 2 de ligação do GH e produz um GH bioinativo, que forma complexos 1:1 com o GHR através do sítio 1 de ligação que encontra-se íntegro, mas é incapaz de formar os complexos 2:1 necessários para a dimerização do GHR (26). Neste caso, o defeito pode ser sobrepujado com a administração de GH exógeno, como demonstrado pelo incremento na velocidade de crescimento após a instituição da terapia.

Nos últimos anos, em nosso estudo com o ensaio de exclusão da isoforma 22kDa do GH (*GHEA, 22kDa GH Exclusion Assay*) (27), pudemos demonstrar que algumas crianças com baixa estatura classificada como idiopática exibem uma proporção aumentada de isoformas moleculares do GH na circulação (28). Com base nestes achados, nós fomos os primeiros autores a especular que um aumento na fração circulante de isoformas de GH inativas (antagonistas do GHR) ou parcialmente ativas (com fraca ação agonista sobre o GHR) poderia ser a causa da baixa estatura em algumas destas crianças (28,29). Recentemente, esta hipótese foi fortalecida com o relato de três crianças com quadro clínico sugestivo de Síndrome de Kowarski, que apresentavam uma bioatividade reduzida do GH circulante, mas nas quais nenhum defeito no gene GH1 foi identificado (30).

SÍNDROMES DE INSENSIBILIDADE (RESISTÊNCIA) AO GH POR DEFEITOS GENÉTICOS NO GHR

Síndrome da insensibilidade ao GH ("Síndrome ou Nanismo de Laron")

Em 1966, Laron e cols. descreveram uma nova síndrome em que os aspectos clínicos eram similares aos encontrados na DIGH, mas que contrastava com esta pela presença de altos níveis de GH e baixos níveis de IGF1 no sangue periférico (31). A localização do defeito primário no gene do GHR por Eshet e cols. (32) ocorreu quase duas décadas depois do relato inicial da entidade atualmente conhecida como "Síndrome da insensibilidade total ou completa ao GH" ("SIGH") ou "Síndrome ou Nanismo de Laron". Os principais achados clínicos da SIGH incluem um intenso retardo de crescimento a partir do nascimento, desproporção craniofacial com testa proeminente e hipoplasia da parte central da face, cabelos ralos, alterações de arcada dentária, extremidades curtas, obesidade em tronco, atraso de idade óssea e da puberdade e episódios de hipoglicemia. Atraso no desenvolvimento motor e intelectual tem sido descrito em algumas populações (31), mas certamente não é um acha-

do universal na síndrome (33). Além da combinação de GH basal alto com IGF1 baixo, o quadro laboratorial inclui também baixos níveis séricos de IGFBP-3 e ausência de resposta do IGF1 e da IGFBP-3 após administração de GH exógeno no teste de geração de IGF1 (31,33-35). Nos casos clássicos da Síndrome de Laron, que correspondem a 80% dos pacientes, os níveis sanguíneos de GHBP são baixos ou indetectáveis ("GHBP negativos"). Entretanto, o achado de níveis normais ou até elevados de GHBP não deve excluir o diagnóstico, uma vez que esta situação ocorre em cerca de 20% das vezes ("GHBP positivos") (31,34). A experiência adquirida até o momento com o uso de IGF1 recombinante na SIGH mostra que este tratamento promove um aumento na velocidade de crescimento nos dois primeiros anos de uso da medicação, embora este aumento seja substancialmente menor do que o observado em crianças com nanismo hipofisário após tratamento com GH (31,33,35).

As primeiras deleções no gene do GHR em pacientes com nanismo de Laron foram descritas no final dos anos 80 (36,37), e de lá para cá os mais variados tipos de defeitos genéticos têm sido encontrados, geralmente nos éxons que codificam o domínio extracelular do GHR (38). A maioria dos pacientes é fruto de uniões consanguíneas, sendo homozigotos para a mutação, embora também existam casos de mutações heterozigotas cursando com SIGH (38). Uma das populações mais bem estudadas inclui a coorte de mais de 70 indivíduos com nanismo de Laron residentes nas províncias andinas de Loja e El Oro, no sul do Equador (33). A análise do gene do GHR das pessoas afetadas nesta população revelou uma substituição simples de nucleotídeo alterando o códon GAA para GAG, ambos codificando para ácido glutâmico na posição 180 da cadeia polipeptídica. Embora não ocasione mudança de aminoácido, esta mutação conhecida como E180 resulta em uma nova seqüência GAG/GTAAAT na junção do éxon 6 com o íntron 6, criando assim um novo sítio de processamento no RNA mensageiro. O uso deste sítio de processamento acarreta uma perda de 8 aminoácidos da porção extracelular do GHR, os quais estão normalmente localizados próximos ao sítio de dimerização do GHR. No interior da célula, é provável que este GHR mutante seja degradado devido às alterações na sua estrutura tridimensional, justificando que a maioria destes pacientes seja "GHBP negativo". Entretanto, em alguns casos a GHBP está presente na circulação, sugerindo que a mesma mutação pode interferir com diferentes eventos intracelulares. Na população equatoriana, todos os indivíduos afetados são homozigotos

para a mutação E180, com exceção de um paciente portador de uma mutação no éxon 4 (R43X, troca de arginina por um códon de parada), previamente descrita em casos isolados de outras populações (33).

Algumas mutações específicas têm sido descritas em pacientes "GHBP positivos" com SIGH. Em duas famílias asiáticas foi encontrada uma mutação *missense* no éxon 6 que causa uma mudança de aspartato para histidina na posição 152 do domínio extracelular do GHR. Esta mutação permite que a GHBP seja produzida, mas impede a homodimerização do GHR, mostrando a importância deste fenômeno para os efeitos biológicos do GH (34,38,39). Em outra família foi encontrada uma mutação que interfere com o processamento do éxon 8, resultando num GHR com a parte extracelular íntegra, mas com ausência do domínio transmembrana e de boa parte da porção intracelular. Como consequência, a proteína truncada sintetizada não consegue fixar-se à membrana celular, sendo liberada em grandes quantidades para a circulação, resultando em níveis séricos bastante elevados de GHBP (34,38,39). Em alguns outros casos, uma mudança heterozigota de um único nucleotídeo no éxon 9 gera um GHR ligado à membrana celular mas sem o domínio intracelular. Este GHR mutante é produzido em grandes quantidades, e além de não ser capaz de transmitir um sinal, ainda forma heterodímeros inativos com o GHR normal (38,39). Finalmente, há casos de SIGH em que a função do GHR é normal, e o problema aparentemente repousa em anormalidades nos mecanismos de sinalização pós-receptor (39,40).

Os vários estudos populacionais em pacientes com defeitos no GHR mostraram que as manifestações clínicas e laboratoriais são bastante variáveis entre os diferentes indivíduos afetados (41). Embora a baixa estatura seja um achado universal, as características fenotípicas dos pacientes variam desde a síndrome clássica descrita por Laron até formas clínicas atípicas, sendo que a severidade do quadro clínico não guarda relação com o tipo de defeito genético, nos casos em que eles são demonstrados pela análise molecular. Assim, outros fatores ainda não estabelecidos funcionam como um elo de ligação entre o genótipo e a severidade das manifestações clínicas. Estas observações motivaram a procura de defeitos do GHR em crianças com diagnóstico de baixa estatura idiopática, nas quais os achados laboratoriais fossem sugestivos de insensibilidade ao GH (34,38,41).

Síndrome da insensibilidade parcial ao GH (SIPGH) em crianças com baixa estatura idiopática

Uma nova entidade clínica começou a ser delineada pelas observações feitas em crianças acompanhadas por

baixa estatura idiopática no *Genentech National Cooperative Growth Study* (42). A dosagem sérica de GHBP nestas crianças mostrou que a maioria delas apresentava valores dentro da faixa normal do ensaio, mas quase sempre nos percentis inferiores, e que em 20% delas os níveis observados estavam abaixo do limite normal (43). Na investigação subsequente, foi visto que aquelas crianças com os níveis mais baixos de GHBP eram as que tinham os níveis mais baixos de IGF1 e os valores médios mais altos de secreção espontânea de 12 horas de GH. Esta associação de valores mais baixos de GHBP e IGF1 com valores mais altos de GH sugeria a presença de SIPGH, motivando a busca de possíveis defeitos no GHR. De fato, a análise genética realizada num subgrupo de 14 crianças revelou mutações heterozigotas em 4 casos. Estas mutações eram distintas umas das outras e todas elas modificavam um aminoácido no domínio extracelular do GHR, incluindo uma que tem sido associada com a forma completa de SIGH na forma homozigota (44). Estudos funcionais ainda não permitiram esclarecer os motivos pelos quais estas mutações causam SIPGH e retardo de crescimento. Clinicamente, algumas destas crianças responderam ao tratamento com GH, mostrando que os defeitos genéticos podem ser sobrepujados pela administração de GH exógeno (34).

Por outro lado, mutações heterozigotas que exercem efeito dominante negativo sobre o alelo normal foram descritas em duas famílias com SIPGH e baixa estatura familiar por herança autossômica dominante (34,38). Estudos funcionais em uma destas famílias confirmaram que o GHR anômalo se acumula na superfície da célula e forma heterodímeros com o GHR produzido pelo alelo normal, impedindo assim a sinalização através do GHR (45). Estes achados enfatizam a importância de se procurar anormalidades genéticas também em casos de baixa estatura familiar que curse com características laboratoriais da SIPGH.

Atualmente, estima-se que entre 1 a 5% das crianças com baixa estatura idiopática podem apresentar algum defeito no GHR causando SIPGH (42). O diagnóstico presuntivo de SIPGH tem frequentemente se baseado na presença de 5 ou mais dos seguintes fatores: 1) estatura inferior a dois ou três desvios padrões abaixo da média; 2) GH basal acima de 2,5ng/mL; 3) IGF-I basal menor ou igual a 50µg/L; 4) IGFBP-3 com valor inferior a dois desvios padrões abaixo da média; 5) incremento de IGF-I inferior a 15µg/L no teste de geração de IGF-I; 6) incremento de IGFBP-3 menor que 0,4mg/L no teste de geração de IGF-I e 7) ligação de GH à GHBP menor do que 10% ou níveis baixos de GHBP (41). Entre-

tanto, como mencionamos previamente, os estudos clínicos baseados nestes critérios têm demonstrado uma variabilidade muito grande nas manifestações clínicas e laboratoriais na SIPGH, bem como na análise genética do GHR (41). Particularmente importante tem sido a alta frequência de casos "GHBP-positivos", ressaltando que a dosagem de GHBP não deve ser utilizada como critério diagnóstico (46). Finalmente, a idéia de que mutações heterozigotas no domínio intracelular do GHR poderiam também ser uma causa de retardo de crescimento associado a SIPGH e níveis normais de GHBP em crianças com baixa estatura idiopática, não foi confirmada num estudo publicado recentemente (47).

DEFICIÊNCIA DE IGF1 POR DEFEITO NO GENE DO IGF1

Em 1996, Woods e colaboradores publicaram o caso de um menino de 15 anos portador de uma deleção parcial homozigota no gene do IGF1 (48). Os pais eram primos em segundo grau. O paciente nasceu com 37,8cm (-5,4 DP) e 1,36kg (-3,9 DP), e este acentuado déficit de crescimento pré-natal prosseguiu durante toda a infância e adolescência. Ao exame clínico observava-se micrognatia leve, prega palmar única do lado esquerdo, ptose palpebral, implantação baixa dos cabelos e clinodactilia bilateral. Concomitante com estes achados, o paciente apresentava retardo mental, retardo no desenvolvimento motor e surdez neurossensorial. Avaliação laboratorial mostrou GH basal normal com grande elevação (pico de 122mU/L) após estímulo com insulina, apesar da não ocorrência de hipoglicemia durante o teste. A secreção espontânea de GH apresentava o padrão pulsátil normal, porém com valores de pico extremamente altos (valor máximo de 342mU/L) e nenhum valor indetectável entre os picos, como normalmente se observa. Os níveis séricos de IGF1 eram indetectáveis (<20µg/L) e permaneceram assim após 3 dias de administração de GH exógeno no teste de geração de IGF1. Níveis basais de IGFBP-3 e GHBP eram normais, enquanto os níveis de IGF1I estavam um pouco elevados. Além disto, o paciente tinha níveis de insulina de jejum bastante elevados, indicando uma resistência insulínica possivelmente secundária aos altos níveis de GH circulante. Como era de se esperar, a velocidade de crescimento não se alterou durante tratamento com GH recombinante. O estudo molecular mostrou que o paciente tinha uma deleção homozigota dos éxons 4 e 5 do gene do IGF1. As informações obtidas com este caso clínico em conjunto com dados

obtidos de estudos em modelos animais mostram que: 1) a deficiência total de IGF1 é compatível com a vida na espécie humana; 2) o IGF1 desempenha um papel importante no crescimento fetal e pós-natal; e 3) o IGF1 exerce importantes efeitos biológicos sobre o sistema nervoso central (48,49).

RESISTÊNCIA AO IGF1 POR DEFEITO NO GENE DO IGF1R

O IGF1R tipo 1 é um receptor tirosina-quinase, transmembrana, existente numa enorme variedade de diferentes tecidos humanos, tanto no período pré como pós-natal (50). Esta ubiquidade faz com que a ausência total do IGF1R em animais transgênicos [IGF1R (-/-)] leve invariavelmente à morte destes animais ao nascimento por insuficiência respiratória. Os animais IGF1R (-/-) apresentam um intenso retardo de crescimento pré-natal, sendo 45% menor do que os animais controles, com hipoplasia generalizada dos órgãos internos (5,51). Na espécie humana, deleções em um dos alelos do gene do IGF1R têm sido descritas em pacientes com cromossomo 15 em anel, retardo mental e achados fenotípicos da síndrome de Silver-Russell (52-54). Nestes pacientes, um achado marcante é o intenso retardo de crescimento pré e pós-natal, sugerindo que a função plena do IGF1R e do IGF1 só ocorre na presença de ambos os alelos do gene do IGF1R. Esta hipótese foi recentemente fortalecida pelo estudo de Lacerda e cols., que demonstrou haver ocorrência de resistência *in vivo* ao IGF1 em uma menina com intenso retardo de crescimento, cromossomo 15 em anel e deleção de um alelo do gene do IGF1R (52).

DEFICIÊNCIA COMBINADA DE HORMÔNIOS HIPOFISÁRIOS (DCHH)

Alterações genéticas do gene do Pit-1

O fator de transcrição Pit-1 (ou POU1F1) é necessário para a diferenciação e proliferação dos somatotrófos, lactotrófos e tireotrófos. Assim, defeitos genéticos no gene do Pit-1 resultam numa deficiência combinada de GH, prolactina e TSH, sendo que pelo menos oito diferentes mutações já foram descritas até o presente momento neste gene (19,42). No Brasil, o primeiro relato de mutação no gene do Pit-1 foi feito pelo grupo da Universidade Federal do Paraná, numa mulher de 38 anos nascida de pais consanguíneos, que apresentava retardo de crescimento desde a infância e hipotireoidismo secundário. A análise laboratorial confirmou a deficiência de GH, TSH e prolactina, enquanto que a análise genética mostrou uma mutação

C para T no éxon 6 do gene do Pit-1, anteriormente descrita em outros pacientes, que resulta numa substituição de arginina por triptofano na posição 271 (55). Estudos funcionais têm revelado que as mutações podem afetar a capacidade do Pit-1 de se ligar ao DNA, interferir com a formação de homodímeros de Pit-1 ou inibir a ação do Pit-1 por algum mecanismo ainda não estabelecido (19).

Alterações genéticas do gene do Prop-1

A primeira mutação no gene do Prop-1 foi identificada nos camundongos Ames, que apresentam DCHH (19). Na espécie humana, pelo menos sete diferentes mutações no gene do Prop-1 já foram identificadas, resultando em deficiência combinada de GH, prolactina, TSH, LH e FSH (56). Com o avançar da idade, alguns pacientes com mutação no gene do Prop-1 podem acabar desenvolvendo uma deficiência parcial de ACTH com conseqüente hipocortisolismo de origem central (56,57). Entre as mutações encontradas, a mais comum é uma deleção de dois nucleotídeos AG no códon 101, que provoca uma modificação na seqüência de aminoácidos da cadeia peptídica e uma parada prematura da leitura no códon 109. Mais recentemente, Osório e cols. (56) descreveram uma nova mutação que resulta na substituição de fenilalanina por serina no códon 88 (F88S), sendo que entre todas as mutações no gene do Prop-1 descritas até o momento, esta é a que mais se assemelha com aquela presente nos camundongos Ames. Num estudo recente em pacientes com DCHH, defeitos no gene do Prop-1 foram freqüentes, atingindo 35 dos 73 pacientes examinados (58).

REFERÊNCIAS

1. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Van Der Brande JL, Van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. **Nature** 1972;235:107.
2. Green H, Morikawa M, Nixon T. A dual effector theory of growth hormone action. **Differentiation** 1985;29:195-8.
3. Isaksson OGP, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. Mechanism of the stimulatory effects of growth hormone on longitudinal bone growth. **Endocr Rev** 1987;8:426-38.
4. Sjögren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF1) is the principal source of IGF1 in blood but is not required for postnatal body growth in mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999;96:7088-92.
5. Baker J, Liu J-P, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. **Cell** 1993;75:73-82.
6. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. **Endocr Rev** 1999;20:761-87.
7. Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. **Endocr Rev** 1998;19:717-97.
8. Gayliss BD. Molecular and cell biology of the growth hormone-releasing hormone receptor. **Growth Horm IGF Res** 1999;9:37-44.
9. Baumann G. Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. **Horm Res** 1999;51(Suppl 1):2-6.
10. Lewis UJ, Sinha YN, Lewis GP. Structure and properties of members of the hGH family: a review. **Endocr J** 2000;47(Suppl 1):S1-S8.
11. Postel-Vinay MC. Growth hormone-binding protein: biological significance. **Acta Paediatr** 1996;85(Suppl 417):98-101.
12. Edens A, Talamantes F. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. **Endocr Rev** 1998;19:559-82.
13. Carter-Su C, Schwartz J, Smit LS. Molecular mechanism of growth hormone action. **Annu Rev Physiol** 1996;58:187-207.
14. Wajnrajch MP, Gertner JM, Harbison MD, Chua Jr SC, Leibel RL. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (*lit*) mouse. **Nat Genet** 1996;12:88-90.
15. Baumann G, Maheshwari H. The dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. **Acta Paediatr** 1997;86(Suppl 423):33-8.
16. Netchine I, Talon P, Dastot F, Vitaux F, Goossens M, Amselem S. Extensive phenotypic analysis of a family with growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:432-6.
17. Phillips JA, Prince MA. Applications of new genetic approaches to growth hormone-releasing hormone receptor defects. **Growth Horm IGF Res** 1999;9:45-9.
18. Hayashida CY, Gondo RG, Ferrari C, Toledo SPA, Salvatore R, Levine MA, et al. Familial growth hormone deficiency with mutated GHRH receptor gene: clinical and hormonal findings in homozygous and heterozygous individuals from Itabaininha. **Eur J Endocrinol** 2000;142:557-63.
19. Cogan JD, Phillips III JA. Growth hormone deficiency disorders. In: Jameson JL, editor. **Principles of Molecular Medicine**. 1st edition. Totowa: Humana Press, 1998:451-8.
20. Phillips III JA. Genetic defects of the growth hormone synthetic pathway. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1999;43(Suppl 2):S347-S352.
21. Lee MS, Wajnrajch MP, Kim SS, Plotnick LP, Wang J, Gertner JM, et al. Autosomal dominant growth hormone (GH) deficiency type II: the Del32-71-GH deletion mutant suppresses secretion of wild-type GH. **Endocrinology** 2000;141:883-90.
22. Kowarski AA, Schneider J, Ben-Galim E, Weldon VV, Daughaday WH. Growth failure with normal serum IGF1 and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. **J Clin Endocrinol Metab** 1978;47:461-4.
23. Bright GM, Rogol AD, Johanson AJ, Blizzard RM. Short stature associated with normal growth hormone and

- decreased somatomedin-C concentrations: response to exogenous growth hormone. **Pediatrics** 1983;71:576-80.
24. Valenta LJ, Sigel MB, Lesniak MA, Elias AN, Lewis UJ, Friesen H, et al. Pituitary dwarfism in a patient with circulating abnormal growth hormone polymers. **N Engl J Med** 1985;312:214-7.
25. Takahashi Y, Kaji H, Okimura Y, Goji K, Abe H, Chihara K. Short stature caused by a mutant growth hormone. **N Engl J Med** 1996;334:432-6.
26. Takahashi Y, Shirono H, Arisaka O, Takahashi K, Yagi T, Koga J, et al. Biologically inactive growth hormone caused by an amino acid substitution. **J Clin Invest** 1997;100:1159-65.
27. Boguszewski CL, Hynsjö L, Johannsson G, Bengtsson B-A, Carlsson LMS. 22-kD growth hormone exclusion assay: a new approach to measurement of non-22-kD growth hormone isoforms in human blood. **Eur J Endocrinol** 1996;135:573-82.
28. Boguszewski CL, Jansson C, Boguszewski MCS, Rosberg S, Carlsson B, Albertsson-Wikland K, et al. Increased proportion of circulating non-22-kilodalton growth hormone isoforms in short children: a possible mechanism for growth failure. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:2944-9.
29. Boguszewski CL, Carlsson B, Carlsson LMS. Mechanisms of growth failure in non-growth-hormone deficient children of short stature. **Horm Res** 1997;48(Suppl 4):19-22.
30. Binder G, Benz MR, Elmlinger M, Pflaum CD, Strasburger CJ, Ranke MB. Reduced human growth hormone (hGH) bioactivity without a defect of the GH-1 gene in three patients with rhGH responsive growth failure. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1999;51:89-95.
31. Laron Z. The essential role of IGF1: lessons from the long-term study and treatment of children and adults with Laron Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:4397-404.
32. Eshet R, Laron Z, Pertzalan A, Arnon R, Dintzman M. Defect of human growth hormone receptors in the liver of two patients with Laron-type dwarfism. **Isr J Med Sci** 1984;20:8-11.
33. Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J, Rosenfeld RG, Francke U. Growth hormone receptor deficiency in Ecuador. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:4436-43.
34. Savage MO, Woods KA, Johnston LB, Postel-Vinay MC, Amselem S, Clark AJL. Defects of the growth hormone receptor and their clinical implications. **Growth Horm IGF Res** 1999;9:57-61.
35. Chernašek SD, Horn JA. Growth hormone resistance: biologic implications. **J Endocrinol Invest** 1998;21:18-23.
36. Amselem S, Duquesnoy P, Attree O, Novelli G, Bousnina S, Postel-Vinay MC, et al. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone receptor gene. **N Engl J Med** 1989;321:989-95.
37. Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, et al. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989;86:8083-7.
38. Dastot F, Sobrier ML, Duquesnoy P, Pantel J, Goossens M, Amselem S. Molecular basis of familial growth hormone-resistant syndromes. **J Endocrinol Invest** 1998;21:7-17.
39. Huhtaniemi I. Activating and inactivating hormone receptor mutations. **Horm Res** 2000;53(Suppl 3):9-16.
40. Freeth JS, Silva CM, Whatmore AJ, Clayton PE. Activation of the signal transducers and activators of transcription signaling pathway by growth hormone (GH) in skin fibroblasts from normal and GH binding protein-positive Laron syndrome children. **Endocrinology** 1998;139:20-8.
41. Woods KA, Dastot F, Preece MA, Clark AJL, Postel-Vinay MC, Chatelain PG, et al. Phenotype: genotype relationships in growth hormone insensitivity syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:3529-35.
42. Attie KM. Genetic studies in idiopathic short stature. **Curr Opin Pediatr** 2000;12:400-4.
43. Carlsson LMS, Attie KM, Compton PG, Vitangcol RV, Merimee TJ. Reduced concentration of serum growth hormone-binding protein in children with idiopathic short stature. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;78:1325-30.
44. Goddard AD, Covello R, Luoh SM, Clackson T, Attie KM, Gesundheit N, et al. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. The Growth Hormone Insensitivity Study Group. **N Engl J Med** 1995;333:1093-8.
45. Ross RJ, Esposito N, Shen XY, Von Laue S, Chew SL, Dobson PRM, et al. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. **Mol Endocrinol** 1997;11:265-73.
46. Amit T, Youdim BH, Hochberg Z. Does serum growth hormone (GH) binding protein reflect human GH receptor function? **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:927-32.
47. Johnston LB, Pashankar F, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Analysis of the intracellular signaling domain of the human growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. **Clin Endocrinol (Oxf)** 2000;52:463-9.
48. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. **N Engl J Med** 1996;335:1363-7.
49. Woods KA, Camacho-Hubner C, Barter D, Clark AJ, Savage MO. Insulin-like growth factor I gene deletion causing intrauterine growth retardation and severe short stature. **Acta Paediatr** 1997;86(Suppl 423):39-45.
50. Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. **Cell Mol Life Sci** 2000;57:1050-93.
51. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). **Cell** 1993;75:59-72.
52. Lacerda L, Carvalho JAR, Stannard B, Werner H, Boguszewski MCS, Sandrini R, et al. *In vitro* and *in vivo* responses to short-term recombinant human insulin-like growth factor-1 (IGF1) in a severely growth-retarded girl with ring chromosome 15 and deletion of a single allele for the type 1 IGF receptor gene. **Clin Endocrinol** 1999;51:541-50.
53. Tamura T, Tohma T, Ohta T, Soejima H, Harada N, Abe K, et al. Ring chromosome 15 involving deletion of the insulin-like growth factor 1 receptor gene in a patient

- with features of Silver-Russell syndrome. **Clin Dysmorphol** **1993**;2:106-13.
54. Peoples R, Milatovich A, Francke U. Hemizygoty at the insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) locus and growth failure in the ring chromosome 15 syndrome. **Cytogenet Cell Genet** **1995**;70:228-34.
55. Rodrigues Martineli AM, Braga M, De Lacerda L, Raskin S, Graf H. Description of a Brazilian patient bearing the R271W Pit-1 gene mutation. **Thyroid** **1998**;8:299-304.
56. Osório MGF, Kopp P, Marui S, Latrônico AC, Mendonça BB, Arnhold IJP. Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP-1. **J Clin Endocrinol Metab** **2000**;85:2779-85.
57. Asteria C, Oliveira JH, Abucham J, Beck-Peccoz P. Central hypocortisolism as part of combined pituitary hormone deficiency due to mutations of PROP-1 gene. **Eur J Endocrinol** **2000**;143:347-52.
58. Deladoey J, Fluck C, Buyukgebiz A, Kuhlmann BV, Eble A, Hindmarsh PC, et al. "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1999**;84:1645-50.

Endereço para correspondência:

Cesar Luiz Boguszewski
SEMPR – Serviço de Endocrinologia e Metabologia
Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
Rua Padre Camargo 262
80.060-240 Curitiba, PR
Fax: (041) 264-8721
e.mail: cesarlui@hc.ufpr.br