

UCH-FC
Biotec
5625
C.1

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN DEL
RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO
ASOCIADAS A UNA INSENSIBILIDAD PARCIAL A
LA HORMONA, EN PACIENTES CHILENOS CON
TALLA BAJA IDIOPÁTICA.**

PROFESOR DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PILAR CARVALLO DE S.Q.
LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR.
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE.

PROFESOR PATROCINANTE:

DR. VÍCTOR CIFUENTES.
LABORATORIO DE GENÉTICA.
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ECOLÓGICAS.
FACULTAD DE CIENCIAS.
UNIVERSIDAD DE CHILE.



MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.
MARCELA KETHERINE SJÖBERG HERRERA

2002

*A mi madre y a mis seres
queridos con amor.*

Agradecimientos

Mis agradecimientos, en primer lugar, a la Doctora Pilar Carvallo, por haber depositado su confianza en mis capacidades para la realización de esta memoria, por su constante enseñanza durante el desarrollo de mi tesis y por su valioso aporte al desarrollo de mi persona tanto en el aspecto humano como científico.

Mis agradecimientos a mi familia por el apoyo brindado, por soportar mis malos momentos, por las críticas constructivas, el cariño y las facilidades otorgadas durante este importante período formativo.

Mis agradecimientos a todos los compañeros de laboratorio con los que compartí gratos momentos y aportaron algo de sí para mi desarrollo profesional:

A Mauricio Moraga por su continua colaboración intelectual y experimental, por su opinión objetiva y por su especial humor, compartido durante el desarrollo de esta tesis.

A Paola Rocco por su buena disposición para enseñar y por compartir sus conocimientos y experiencia amistosamente.

A Claudia Espinosa y Carmen Morales por su ayuda en la etapa inicial de mi tesis.

A Paola Faundez porque su presencia colocaba la cuota de alegría en el laboratorio.

A Adrián Rodríguez por su apoyo incondicional y cariño, por su ayuda y acertado consejo tanto en lo experimental como en lo intelectual.

A Francisco Rivera por su amistad y los gratos momentos compartidos durante la etapa universitaria, por su ayuda intelectual, opinión crítica y confianza.

A Loreto Egaña por su calidad humana y ayuda desinteresada.

A José Jaime Arbildua por su amable ayuda y colaboración en el análisis de la estructura cristalográfica del receptor.

ÍNDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
SUMMARY.....	vii
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	1
1. Eje hormona de crecimiento-efector.....	2
2. Receptor de la hormona de crecimiento humana (hGHR).....	4
3. Proteína de unión de GH (GHBP).....	6
4. Alteraciones en el receptor de GH	7
4.1. Síndrome de insensibilidad a GH	7
4.2. Talla baja idiopática	11
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	19
I. PACIENTES	19
II. MATERIALES	23
III. MÉTODOS	25
1. Extracción de DNA genómico	25
2. Amplificación de DNA por la técnica de PCR	26
2.1 Diseño de los partidores.....	26
2.2 Amplificación del gen del GHR por PCR.....	29
3. Electroforesis en geles de agarosa	30
4. Purificación de los productos de PCR	30
4.1 Purificación del producto específico desde un gel de agarosa.....	30
4.2 Purificación directa del producto de PCR desde la mezcla de reacción.....	31
5. Detección de mutaciones por la técnica de polimorfismos de conformómeros de simple hebra (SSCP).....	31

5.1 Electroforesis en geles de MDE.....	32
5.2 Tinción con plata	33
6. Secuenciación de DNA.....	33
6.1 Marcación del partidor.....	33
6.2 Reacción de secuenciación.....	34
6.3 Electroforesis de alta resolución en geles de poliacrilamida	34
7. Digestión con enzimas de restricción	35
RESULTADOS.....	36
1. Análisis de polimorfismos de conformómeros de simple hebra (SSCP).....	36
2. Secuenciación del exón 6 del gen GHR en el paciente B.23 y en sus padres.....	37
3. Análisis de la presencia de la mutación R161C por digestión con la enzima de restricción NlaIII.....	42
3.1- Análisis de la mutación en el paciente B.23 y sus padres.....	42
3.2- Detección de la mutación R161C en 50 individuos controles de la población de Santiago.....	45
4. Secuenciación de los exones 2 al 10 del gen GHR en los pacientes A.....	47
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	:	Resumen de las mutaciones encontradas en el gen del receptor de GH.....	15
TABLA 2	:	Resumen de las características clínicas de los pacientes estudiados	21
TABLA 3	:	Valores de referencia de GHBP, IGF-1 e IGFBP-3.....	22
TABLA 4	:	Lista de partidores utilizados.....	27
TABLA 5	:	Polimorfismos de secuencia nucleotídica en los exones 6 y 10 para el grupo de pacientes A y B.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	:	Esquema de la vía de síntesis y el mecanismo de acción de la hormona de crecimiento	14
FIGURA 2	:	Estrategia de amplificación del gen GHR mediante PCR	28
FIGURA 3	:	Polimorfismos de conformómeros de simple hebra de los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10a, 10b y 10c.....	38-40
FIGURA 4	:	Secuenciación del exón 6 del gen GHR en el paciente B.23 y en sus padres	41
FIGURA 5	:	Localización de la transición C-T en la secuencia nucleotídica del exón 6	43
FIGURA 6	:	Análisis de la transición C-T por digestión con la enzima NlaIII.....	44
FIGURA 7	:	Análisis electroforético del exón 6 digerido con la enzima Nla III, en 50 individuos controles.....	46
FIGURA 8	:	Estructura cristalográfica del complejo hormona de crecimiento- dominio extracelular del receptor de GH, con la mutación R161C.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	: Adenosina 5'-trifosfato.
BSA	: Albúmina de suero de bovino.
cDNA	: DNA complementario.
dATP	: Desoxiadenosinatrifosfato.
dCTP	: Desoxicitosinatrifosfato.
dGTP	: Desoxiguanosinatrifosfato.
dTTP	: Desoxitimidinatrifosfato.
DO	: Densidad óptica.
DNA	: Ácido desoxirribonucleico.
DS	: Desviación estándar
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético.
[γ ³² P]ATP	: Adenosina 5' γ ³² P trifosfato.
GHR	: Receptor de hormona del crecimiento.
GHRH	: Factor liberador de la hormona de crecimiento.
hGH	: Hormona de crecimiento humana.
GH	: Hormona de crecimiento.
GHBP	: Proteína de unión a hormona de crecimiento
IGF-I	: Factor de crecimiento insulínico.
IGFBP	: Proteína transportadora de IGF-I.
kb	: Kilobases
mRNA:	: RNA mensajero
mM	: milimolar
ng	: nanogramos
pb	: pares de bases
pBR322	: Plasmidio Bolivar Rodriguez 322
pmol	: Picomol
PCR	: Reacción de polimerización en cadena
RNA	: Ácido ribonucleico

SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SRIF	: Somatostatina
SSCP	: Polimorfismo de conformómeros de simple hebra
TE	: Tris-EDTA
Tris	: Ácido tris-(hidroximetil)-aminometano

SUMMARY

Several hormones regulate growth and development in humans, being the most important those involved in the hypothalamus-hypophysis axis. The growth hormone exerts its action through the binding to a specific receptor in the liver, the GHR, causing a cascade of signals resulting in the synthesis and secretion of the insulin like growth factor-1 (IGF-1). The IGF-1 is transported in the plasma bound to the IGFBP-3 protein, to finally bind to its specific receptor in the chondrocytes, resulting in bone growth.

Laron syndrome or growth hormone insensitivity syndrome has a recessive mode of inheritance in the majority of the cases, and is caused by mutations in the GHR gene. Very few families have been described having a dominant mode of inheritance. The majority of mutations described until now are present in the region of the gene coding for the extracellular domain of the GH receptor. The GHR gene is located in chromosome 5 and spans around 80 kb. The gene has 9 coding exons (exons 2- 10). Exons 2 to 7 code for the extracellular domain, exon 8 for the transmembrane domain, and exon 9 and part of exon 10 for the intracellular domain.

The causes of idiopathic short stature are unknown until now in the majority of the cases. Two studies in children with idiopathic short stature revealed mutations in the GHR gene present in a heterozygous state. It has been proposed that these mutations could cause minor alterations in the GHR function leading into a decrease of growth in children.

In order to understand the causes of idiopathic short stature in a group of Chilean patients, 26 children presenting a height of less than 2.5 SD, and clinical characteristics concordant to a possible GHR malfunction, were selected. The levels of the circulating

growth hormone, growth hormone binding protein (GFBP), IGF-1 and IGFBP-3 were determined. This thesis involves the molecular analysis of 14 children corresponding to the last patients selected for the whole study. The mutation detection involved PCR amplification of the 9 coding exons from the GHR gene, the single strand conformer polymorphism (SSCP) analysis and DNA sequencing. Five of these patients, which present more relevant characteristics, were selected and 9 coding exons of their GHR gene were sequenced.

Among the 14 children only one mutation was detected in a patient and his father. This mutation detected by SSCP analysis, was an heterozygous C-T transition at the first position of codon 161, located in exon 6. This mutation generates the aminoacidic change R161C, and creates a new restriction site for the enzyme *Nla*III. The analysis of the presence of this nucleotide change in a population of 50 normal subjects, was performed by digestion with *Nla* III. The results showed that this change is not present in 100 studied chromosomes, indicating that it does not correspond to a polymorphism and supporting the fact that it is a mutation. Also this mutation has been described in an homozygous state in GHIS patients. The mechanism through which the R161C alteration disrupts the GHR function is not known. The introduction of an additional cysteine into the extracellular domain may cause misfolding of the protein. The analysis of the crystallographic structure of the complex between the extracellular domain of GHR and GH, showed that the 161 amino acid it is an exposed residue and it is located 10 Å distance from the nearest cysteine with a low probability to form an disulfide bond. However, considering the crystallographic structure, we would not been able to ensure that a mismatched disulfide bond during the folding of the growth hormone receptor could not be form.

In the five patients analyzed by direct sequencing two nucleotide changes were found. The first corresponds to a A-G transition in the third position of codon 168, at exon 6. This change was present in the five patients, in a homozygous state. The second change correspond to a C-A tranversion in the first position of codon 526 at exon 10, and it was present in four patients in a heterozygous state. The same nucleotide changes were analyzed by direct sequencing of exons 6 and 10 in the other 9 patients. Neither of these disrupt the open reading frame, and both have been previously reported in normal subjects as polymorphic changes. We concluded that these changes are not the genetic cause of the partial growth hormone insensitivity in these patients.

RESUMEN

El crecimiento y desarrollo humano están regulados por diversas hormonas, siendo fundamental aquellas involucradas en el eje hipotálamo-hipofisiario. La hormona de crecimiento ejerce su efecto a través de la unión a su receptor específico (GHR) en el hígado, provocando una cascada de señales de transducción que terminan en la síntesis y secreción del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). El IGF-1 es transportado en el plasma unido a la proteína de unión IGFBP-3, para finalmente interactuar con su receptor en los condrocitos, estimulando el crecimiento de los huesos largos.

El Síndrome de Laron o síndrome de insensibilidad a GH presenta una herencia recesiva en la mayoría de los casos y es causado por mutaciones en el gen del receptor de GH. En solo unas pocas familias se ha descrito una herencia dominante para este síndrome. Las mutaciones descritas hasta el momento se encuentran en su mayoría presentes en la región del gen que codifica para el dominio extracelular del gen. El gen del GHR está ubicado en el cromosoma 5 y abarca alrededor de 80 kB. Este gen presenta 10 exones de los cuales solo 9 son codificantes. Los exones 2 al 7 codifican para el dominio extracelular del receptor, el exón 8 para el dominio de transmembrana y los exones 9 y parte del 10.

Las causas de la talla baja idiopática son desconocidas en la gran mayoría de los casos. Sin embargo en dos estudios realizados en niños con talla baja idiopática se han encontrado mutaciones en estado heterocigoto en el gen del receptor de GH. Estas mutaciones podrían producir alteraciones menores en la función del GHR, provocando una disminución del crecimiento.

Con el fin de conocer las causas de la talla baja idiopática en un grupo de pacientes chilenos, se seleccionaron 26 niños que presentaban una estatura bajo las 2,5 DS respecto del promedio para su edad y sexo, y cuyas características clínicas hacían sospechar una alteración en el gen del GHR. A estos pacientes se les determinó los niveles séricos de hormona de crecimiento (GH), su proteína de unión (GHBP), IGF-1 e IGFBP-3. En esta tesis se completó un estudio comenzado previamente en nuestro laboratorio y constituyó el análisis de 14 del total de estos niños. Para la búsqueda de mutaciones, los 9 exones codificantes del gen del GHR fueron amplificados por la técnica de PCR y analizados mediante la técnica de conformómeros de simple hebra (SSCP) y secuenciación de DNA. En cinco de estos pacientes que presentaban las características clínicas más relevantes se secuenciaron los exones 2 al 10 del gen.

En los 14 niños estudiados, sólo se encontró una mutación presente en uno de ellos y en su padre. La mutación detectada por análisis de SSCP, corresponde en ambos casos, a una transición heterocigota C-T en la primera base del codón 161, ubicado en el exón 6. Este cambio nucleotídico provoca el cambio aminoacídico arginina por cisteína y además genera la aparición de un nuevo sitio de restricción para la enzima *NlaIII*. El análisis de la presencia de este cambio en una población de 50 individuos controles, mediante digestión con la enzima *NlaIII*, reveló que éste no se encuentra en 100 cromosomas analizados. Este resultado indica que el cambio nucleotídico encontrado no corresponde a un polimorfismo, apoyando el hecho que se trate de una mutación. El mecanismo a través de cual la mutación R161C altera al receptor de GH es desconocido, sin embargo, el efecto real es importante, ya que esta mutación presente en estado homocigoto ha sido descrita en otros pacientes con síndrome de insensibilidad a GH. La introducción de una cisteína adicional en el dominio extracelular del receptor, en donde se encuentran otras 7 cisteínas, podría causar un

plegamiento erróneo de la proteína. El análisis de la estructura cristalográfica del complejo GH-dominio extracelular del receptor de GH, reveló que el aminoácido 161 es un aminoácido expuesto que está distante unos 10 Å de la cisteína más cercana, con lo cual existe una baja probabilidad de formación de un enlace disulfuro. Sin embargo, como se trata de la estructura cristalográfica no se puede aseverar que no se forman enlaces disulfuros erróneos durante el plegamiento del receptor.

En los cinco pacientes analizados por secuenciación directa de las regiones codificantes del gen del GHR, se encontraron dos cambios nucleotídicos. El primero corresponde a una transición A-G, en la tercera posición del codón 168, ubicado en el exón 6, el cual está presente en los cinco pacientes en estado homocigoto. El segundo es una transversión C-A, en la primera posición del codón 526, ubicado en el exón 10, el cual produce al cambio aminoacídico de leucina por isoleucina y se encontró en 4 pacientes en estado heterocigoto. Los mismos cambios nucleotídicos fueron analizados por secuenciación directa de los exones 6 y 10 en los otros 9 pacientes. Ambos cambios nucleotídicos no provocan un cambio en el marco de lectura y han sido descritos anteriormente en sujetos normales, por lo cual son considerados como cambios polimórficos, de modo que se descartan como causa genética de la talla baja presente en estos pacientes.

INTRODUCCIÓN

La estatura representa un rasgo biológico, determinado por factores tanto ambientales como genéticos. De este modo la baja estatura puede ser provocada por diversas causas, entre las que se incluyen enfermedades sistémicas que pueden afectar distintos órganos, alteraciones nutricionales, displacias óseas, retraso del crecimiento intrauterino y anomalías cromosómicas como el Síndrome de Turner. Los niños que presentan una talla bajo las 2 DS bajo el promedio, representan en un 80% casos de baja estatura familiar o constitucional y en el 20% restante, las causas son consideradas como patológicas. Una estatura baja se considera claramente patológica cuando se encuentra a 3 DS o más por debajo del promedio de la población masculina y femenina (*Mahoney, 1987*).

Una de las causas más estudiada de talla baja, es la de origen genético asociada con alteraciones en el eje hipotalámico-hipofisiario y en la acción fisiológica de la hormona del crecimiento (GH). La GH es uno de los factores fundamentales involucrado en el desarrollo de un individuo, regulando el control sistémico del crecimiento de los órganos y determinando la talla desde el nacimiento hasta la pubertad.

Dos de las patologías más estudiadas en relación con alteraciones en genes relacionados con la síntesis, liberación y acción de GH son: la *Deficiencia Aislada de Hormona de Crecimiento* (IGHD) y el *Síndrome de Larón*. La primera es una de las causas más frecuentes de la talla baja de origen endocrino, se caracteriza por niveles indetectables o muy bajos de GH en la sangre y puede o no estar ligada a alteraciones en el gen de la GH. La segunda se caracteriza por altas concentraciones de GH en la sangre y una insensibilidad a GH por su receptor, debido a alteraciones en la función de éste.

1. EJE HORMONA DE CRECIMIENTO-EFECTOR.

La GH o somatotropina es sintetizada y secretada en forma pulsátil por las células somatotróficas de la adenohipófisis, en respuesta a la acción de dos péptidos producidos en el hipotálamo, el factor liberador de hormona de crecimiento (GHRH) y la somatostatina (Casanueva, 1992). El factor GHRH es secretado al sistema vascular portal pituitario, estimulando en la hipófisis la síntesis y secreción de GH, a través de la interacción con su receptor (GHRHr) acoplado a una proteína G estimuladora. Esta interacción activa la adenilil ciclasa que incrementa los niveles intracelulares de AMP cíclico el cual induce la transducción de la señal que conllevan a la síntesis de GH. Por su parte la somatostatina, interactúa con receptores en la adenohipófisis, que inhiben la adenilil ciclasa a través de una proteína G inhibidora, reduciéndose así la síntesis de GH (Casanueva, 1992; Goth y col., 1992).

La hormona de crecimiento humana (hGH) sintetizada por las células de la adenohipófisis se encuentra en circulación bajo dos isoformas. Una de 22 kDa que corresponde a una sola cadena polipeptídica de 191 amino ácidos, que es mayoritaria en un 70-75%. La segunda isoforma de 20 kDa, está compuesta de 176 amino ácidos y se origina por procesamiento alternativo del mRNA con la consecuente pérdida de los residuos aminoacídicos 32 al 46 (DeNoto y col., 1981; Rosenfeld y col., 1995).

En el mecanismo de acción de la GH, el primer paso es la unión de ésta a su receptor específico (GHR) ubicado principalmente en el hígado. Previo a este evento la GH circula por el plasma acompañada a la proteína de unión de GH (GHBP) de alta afinidad, la cual libera a la hormona cuando ésta interactúa con su receptor (Baumann y Mercado, 1993). Se ha visto que la GH posee dos sitios diferentes para unir dos moléculas idénticas de receptor, lo que permite la dimerización secuencial del receptor de GH. Esta reacción activa al receptor,

presumiblemente por la aproximación de los dos dominios citoplasmáticos, de modo que estos puedan iniciar la cascada de transducción de señales intracelulares, que conlleva a la síntesis y secreción del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (*de Vos y col., 1992*). Un primer evento en la cascada de transducción de señales inducida por GH es la asociación de la tirosina quinasa JAK2 con el receptor de GH dimerizado y la activación de esta proteína quinasa mediante fosforilación, con la consecuente activación del receptor por fosforilación en residuos de tirosina. Producto de este evento se activan las señales intracelulares que incluyen a MAP quinasas, proteína quinasa C (PKC), fosfatidil inositol-3 quinasa, factores de transcripción y transductores de señal como *Stat*, *c-fos* y *spi 1, 2* entre otros (*Carter-Su y col., 1996, Leger y col., 1995*).

El IGF-1 pertenece a una familia de factores de crecimiento tipo insulínico (IGF) que son potentes agentes mitogénicos y anabólicos, relacionados estructuralmente con la insulina (*Conover y col., 1996*). Estos factores participan en procesos de crecimiento en todos los sistemas del organismo y sus acciones están determinadas por la disponibilidad de IGF libre para interactuar con sus receptores específicos (IGF-1R) (*Ferry y col., 1999*). Estos péptidos se asocian con una familia de proteínas de unión presentes en el suero llamadas proteínas de unión de factores de crecimiento tipo insulínico (IGFBP), que presentan una alta afinidad y especificidad (*Rosenfeld y col., 1999*). Los IGFs presentan una actividad pleiotrópica y una distribución ubicua haciendo que las IGFBPs pasen a ser componentes integrales de su fisiología. Las distintas formas de IGFBPs difieren en su peso molecular, composición aminoacídica, distribución e influencia en la actividad de los IGFs, sin embargo, comparten una alta homología en sus dominios amino y carboxilo terminal. Entre las propiedades biológicas de las IGFBP están, el aumentar la vida media de los IGF en la sangre, potenciar la

actividad de éstos en la proliferación celular y modular la interacción de éstos con sus receptores (*Kostecka y col., 1999*). La afinidad de unión a los IGF puede ser modulada por modificaciones tales como fosforilación, proteólisis y asociaciones a matriz extracelular entre otras (*Baxter y col., 2000*).

El IGF-1 se asocia principalmente con la IGFBP-3, cuya expresión también es inducida por la GH. De este modo los niveles de IGFBP-3 constituyen un indicador importante y un marcador periférico útil, para evaluar estados de secreción y acción alterados de GH (*Rosenfeld y col., 1995; Ranke y col., 1997*).

2. RECEPTOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA (hGHR).

El receptor de hormona de crecimiento es un miembro de la familia de receptores de citoquinas/hematopoyetina. Es una proteína de 620 aminoácidos, que posee un solo dominio de transmembrana y una baja identidad en el dominio extracelular en relación con los otros miembros de esta superfamilia. El receptor humano de GH es sintetizado inicialmente como una preproteína de 640 aminoácidos de largo, que contiene un péptido señal corto en su región amino terminal. El receptor de GH maduro posee un dominio extracelular de unión a la hormona de 245 aminoácidos, un dominio de transmembrana hidrofóbico de 24 aminoácidos y un dominio intracelular hacia el extremo carboxilo terminal de 350 aminoácidos (*Edens y Talamantes, 1998*). En el dominio extracelular destacan diversas asparraginas que son potenciales sitios de glicosilación y 7 cisteínas, 6 de las cuales forman puentes disulfuros (Cys38-Cys48, Cys83-Cys94, Cys 108-Cys 122). También está presente un motivo aminoacídico próximo a la membrana WSXXWS, con sustituciones conservadas, que se postula podrían jugar un papel clave en la unión a ligandos (*Fuh y col., 1990; de Vos y col.,*

1992). En el dominio intracelular se encuentran dos motivos presentes también en otros miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas. El dominio Box1, un motivo rico en prolinas, requerido para la asociación de JAK2 con el receptor de GH, y Box 2 que comienza con un grupo de aminoácidos hidrofóbicos y termina con uno o dos aminoácidos cargados positivamente. Estas regiones podrían participar en la transducción de la señal mediada por receptor, ya que mutaciones o deleciones en Box 1 y 2, resultan en un crecimiento celular, mediado por ligando, defectivo (*Carter-Su y col., 1996; Postel-Vinay y Finidori, 1995; Leung, 1987*).

El gen que codifica para el receptor de GH humano, está localizado en el brazo corto del cromosoma 5 (5p13.1-p12) y tiene un tamaño de 87 Kb. El gen del receptor de GH posee 9 exones codificantes (exones 2-10). Los exones 2 al 9 poseen tamaños entre 66-179 pb, mientras que el exón 10 presenta un tamaño de 3400 pb. El péptido señal está codificado por el exón 2, mientras que el dominio extracelular está codificado por los exones 3 al 7, la región transmembrana está codificada por el exón 8 y el dominio citoplasmático está codificado por el exón 9 y parte del 10 (*Phillips y col., 1992; Godowski y col., 1989*). Por análisis de Northern se ha estimado que el mRNA que codifica para el largo total del receptor posee un tamaño de 4,6 Kb y se expresa principalmente en el hígado. Además el análisis del cDNA para este receptor, mostró la presencia de 8 secuencias que variaban solamente en la región 5' no traducida (5'-UTR). Estos cDNA que varían en el 5'UTR son considerados productos de procesamientos alternativos del primer exón del gen del receptor de GH, y participarían en la expresión del receptor en distintos tejidos (*Edens y Talamantes, 1998*).

Existen dos isoformas del receptor de GH, que son expresadas en la placenta, las cuales difieren en la presencia o ausencia del exón 3, siendo ambas funcionales. El exón 3

codifica para un segmento de 22 amino ácidos en el dominio extracelular y es removido producto de un procesamiento alternativo causado por un cambio nucleotídico polimórfico. La regulación individuo-específica de las isoformas del receptor son el resultado de este polimorfismo en el gen del receptor de GH que altera el procesamiento del transcrito (*Stallings-Mann y col., 1996*). Este hecho es interesante ya que no se han descrito mutaciones en el exón 3 del gen, lo que indica que de existir éstas no afectan la función del receptor.

3. PROTEÍNA DE UNIÓN DE GH (GHBP).

La GH es unida con alta afinidad y especificidad por dos proteínas, el receptor de GH y la GHBP. Spencer y col., en 1988 propusieron que la proteína GHBP derivaba del dominio extracelular del receptor de GH, ya que la secuencia nucleotídica de esta proteína ligante es idéntica a la de éste.

Se han descrito dos proteínas de unión a GH, una de baja afinidad y otra de alta afinidad. La proteína de unión de baja afinidad parece no relacionarse con el receptor de GH ni con la GHBP de alta afinidad. Aunque ha sido poco estudiada se piensa que ésta puede ser una proteína de unión primaria para otras especies de GH humana, ya que tiene un sitio de unión específico para la variante de 20 kDa de la GH humana (*Baumann, 1991*).

La GHBP de alta afinidad es una glicoproteína de 61 kDa, con un PI de 5,0 (*Baumann y col., 1994*). Une una molécula de GH de 22 kDa con alta afinidad ($K_a=1,08\pm 0,19 \times 10^9$ L/mol) formando un complejo de 85 kDa y tiene una capacidad de unión máxima a una concentración de GH de 20 ng/ml (*Amit y col., 1990; Davis y col., 1992*). Se ha postulado que esta GHBP podría originarse producto de la proteólisis del dominio extracelular del receptor de GH o por procesamiento alternativo del RNA mensajero del receptor. Hasta el momento se desconoce la presencia de un mRNA humano que codifique para esta proteína de unión,

sugiriendo que en el hombre la forma soluble del receptor es generada a partir de la proteólisis del receptor de membrana (*Delehay-Zervas y col., 1994; Baumann y Mercado 1993; Leung y col., 1987; Conte F., y col., 2002*).

Aunque aún no se ha determinado la función biológica exacta de la GHBP, se ha demostrado que ésta prolonga la vida media de la GH en circulación, sugiriendo que podría así potenciar las acciones de la GH, prolongando la disponibilidad de GH a los tejidos blanco. Otras funciones que se le otorgan son: la mantención de un reservorio de GH en la circulación para amortiguar la marcada pulsatilidad en la secreción de ésta, la modulación de la unión de la GH a su receptor y la restricción de su distribución en el organismo (*Baumann y Mercado 1993; Edens y Talamantes, 1998*).

Además de las potenciales funciones de la GHBP en la modulación de la liberación y/o función de la GH, esta proteína es importante porque representa un marcador, fácilmente medible, del estado funcional del receptor de GH en los tejidos. Esto se explica porque la determinación de la GHBP plasmática se realiza utilizando un anticuerpo que reconoce sólo al complejo GH-GHBP, por lo tanto, en este ensayo se determina el porcentaje de la GHBP funcional. Como la GHBP deriva del receptor de GH, este ensayo también entrega información de cual es el estado funcional del dominio extracelular del receptor de GH (*Baumann y Mercado 1993; Carlsson y col., 1991*).

4. ALTERACIONES EN EL RECEPTOR DE GH.

4.1. SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A GH.

El prototipo del Síndrome de Insensibilidad a GH, es el Síndrome de Laron descrito por primera vez en 1986 por Laron y col., como un tipo de enanismo severo con una herencia autosómica recesiva. Los afectados se caracterizan por presentar un retraso severo del

crecimiento postnatal, resultando en una estatura adulta entre 108 y 142 cm (*Guevara-Aguirre y col., 1991*). Los estudios reunidos a partir de diversas publicaciones han permitido caracterizar el fenotipo de estos pacientes, cuyas principales características son: peso normal al nacer, talla promedio del recién nacido 1,6 DS bajo la media, velocidad de crecimiento postnatal deficiente, talla baja proporcionada, edad ósea retrasada, obesidad truncal, hipoplasia media facial con puente nasal deprimido, frente prominente, presencia de hipoglicemia y micropene. Este síndrome es distinguible clínicamente de la deficiencia aislada de hormona de crecimiento, ya que se caracteriza por presentar niveles bajos o elevados de GHBP en algunos casos y además un nivel elevado de GH en la sangre (*Savage y col., 1993*).

El Síndrome de Laron es causado por mutaciones en el gen del receptor de GH. Pacientes diagnosticados con síndrome de Laron, han sido analizados genéticamente por secuenciación del gen del receptor de GH, encontrándose diversas mutaciones, que alteran la función de la proteína (Tabla 1). La mayoría de las mutaciones encontradas se localizan en el dominio extracelular del receptor y corresponden a deleciones o mutaciones puntuales que involucran la aparición de codones de término, cambios de aminoácidos y alteraciones en las secuencias que determinan el procesamiento del pre-mRNA.

De las mutaciones descritas en el gen del receptor de GH, las 4 primeras (deleción de exones 4,6; F96S; R43X; C38X) fueron encontradas en pacientes Laron, caracterizados por presentar bajos niveles plasmáticos de GHBP. Se encontró que las mutaciones R43X y C38X producen un receptor truncado producto de la pérdida de una gran parte del dominio de unión a GH, del dominio transmembrana y del dominio intracelular. Esto fue consistente con la carencia de la actividad de unión de la proteína GHBP, en el plasma de estos pacientes (*Amselem y col., 1989; Godowski y col., 1989; Amselem y col., 1991*). Otro caso interesante de

destacar en relación con pacientes que presentan bajos niveles de GHBP, es el publicado por Kaji y col., en 1997, el cual describe una niña con Síndrome de Laron que presentaba niveles indetectables de GHBP en el plasma. Los análisis moleculares revelaron que esta paciente era un heterocigoto compuesto para mutaciones en el gen del receptor de GH. Es decir, el alelo proveniente de la madre contenía una mutación correspondiente a una transversión G a T en el codón 224 del exón 7 que introducía un codón de término en lugar de ácido glutámico y el alelo proveniente del padre contenía otra mutación consistente en una deleción de citosina en la posición 981 en el exón 10. Esta segunda mutación provoca un cambio en el marco de lectura y la aparición de un codón de término prematuro, luego de 20 aminoácidos nuevos generados a partir del punto de deleción. El análisis por RT-PCR y secuenciación de éste cDNA permitieron sugerir que ninguno de los alelos mutantes podía generar un receptor de GH funcional, ya que, en ambos casos se producía una molécula truncada. En el caso de la mutación del alelo materno, se producía una deleción de la región carboxilo terminal del dominio de unión a GH, así como también la deleción de los dominios de transmembrana e intracelular, y en el caso de la mutación en el alelo paterno, el resultado era la pérdida de la región carboxilo terminal del dominio intracelular.

Se han publicado también casos de pacientes Laron que presentan niveles elevados de GHBP en el plasma. Un ejemplo de esto se presenta en el trabajo de Woods y col., (1996) el cual describe una mutación en estado homocigoto en el dominio intracelular del receptor, consistente en una transversión de G a C en la posición -1 del sitio dador de *splicing* del exón 8. Esta mutación genera un error de *splicing* que provoca la pérdida del exón 8 y la aparición de un codón de término prematuro. El receptor mutante carente de los dominios de transmembrana e intracelular, es incapaz de anclarse en la membrana celular, liberándose a la

circulación sanguínea, siendo medido como GHBP y elevando por ende los niveles de esta proteína en el plasma. Iida y col., (1998) describen otra mutación en el gen del GHR, en dos hermanos Japoneses que también presentaban niveles elevados de GHBP. Mediante análisis del mRNA se encontró una mutación presente en estado heterocigoto, que correspondía a una transición de G a A en la posición +1 del sitio dador de *splicing* del intrón 9. Del mismo modo que en el caso anterior, un error de *splicing* producto de la mutación genera la pérdida del exón 9 en el alelo mutado y la aparición de un codón de término prematuro que deja un dominio intracelular de solo 7 aminoácidos. Los autores caracterizaron el efecto de esta mutación, expresando el cDNA del receptor normal y el mutado en células COS-7 y CHO. Encontraron que los niveles de GHBP de las células en cultivo expresando el receptor mutado, eran aproximadamente 3 veces más altos que los de las células expresando el receptor normal. Los estudios funcionales utilizando un gen reportero que contenía el elemento de unión STAT5 (transductor de señal y activador de transcripción) demostraron que el receptor mutado suprimía la función del receptor normal cuando ambos receptores eran cotransfectados, sugiriendo que éste ejercía un efecto dominante negativo. Además, experimentos *in vitro* revelaron que el receptor mutado podía formar heterodímeros con el receptor normal, inhibiendo completamente la función de este último cuando la razón de cDNA transfectado era igual. El efecto dominante negativo se observa cuando un polipéptido mutante no funcional interfiere con la función del polipéptido originado del alelo normal en una persona heterocigota. Esto explica el efecto de la mutación previamente descrita.

En 1994 Duquesnoy y col., describieron una nueva mutación en el gen del receptor de GH, pero esta vez en pacientes Larón con niveles normales de GHBP. Se estudiaron dos familias no relacionadas, en las cuales se encontró la misma mutación, consistente en una

substitución de aspartato por histidina en la posición 152. Este residuo es altamente conservado en el dominio extracelular, ubicado en la región de homodimerización del receptor. El receptor mutado se expresaba correctamente en la membrana plasmática, sin embargo, era incapaz de homodimerizar y de formar heterodímeros con la molécula del receptor normal, siendo no funcional. Esto evidenció que el receptor monomérico es inactivo y que la dimerización del receptor es uno de los eventos primordiales en la señal mediada por GH que conlleva al crecimiento.

4.2. TALLA BAJA IDIOPÁTICA.

Un gran número de niños presentan una talla baja no patológica, entre 1,5 y 2,0 DS bajo el promedio, de origen desconocido, llamada idiopática. Algunos de estos niños presentan un cuadro clínico sugerente de insensibilidad parcial a GH, caracterizado por niveles séricos de GH, en respuesta a pruebas de estímulo farmacológico, mayores a 10 ng/ml (siendo el nivel normal 7 ng/ml) y niveles bajo lo normal de IGFBP-3 e IGF-1. En algunos pacientes se han detectado además bajos niveles de GHBP, en estos casos lo más probable sería encontrar mutaciones en el dominio extracelular del receptor de GH que disminuyan la afinidad de unión de la GHBP por la GH, acumulándose la GH en el plasma y no logrando activar la transducción de la señal que provoca la síntesis del factor IGF-1. Por otra parte, también se han descrito pacientes con niveles de GHBP normales o elevados. En estos casos lo más probable sería encontrar mutaciones en el dominio intracelular o de transmembrana del receptor que pueden alterar el anclaje del receptor a la membrana, provocando una mayor liberación de GHBP al plasma y una concentración más baja de receptores funcionales en la membrana.

Dos estudios realizados en grupos de niños con estas características han demostrado que mutaciones que se presentan en forma heterocigota en el locus GHR pueden ser la causa de la baja estatura idiopática (ISS), por provocar una deficiencia parcial en la función del receptor.

Uno de estos estudios fue realizado por Goddard, y col. (1995), en 14 niños con talla baja idiopática (ISS), los cuales fueron seleccionados basándose en niveles normales de secreción de GH y en bajas concentraciones de GHBP (entre 2,0 a 3,0 DS bajo la media) e IGF-1 (entre 1,2 a 8,2 DS bajo la media). En cuatro de estos niños se encontraron cinco mutaciones en estado heterocigoto, ubicadas en el dominio extracelular del gen del receptor de GH. Tres pacientes presentaron tres mutaciones puntuales diferentes (R211H; E224D; C122X). Estas estaban en sólo uno de los alelos del gen del receptor de GH, en cada uno de ellos y un paciente resultó ser un heterocigoto compuesto, presentando la mutación (R161C) proveniente del alelo materno que puede producir un plegamiento erróneo de la proteína y otra mutación (E44K) proveniente del alelo paterno que reduce la afinidad de unión del receptor por GH.

Por su parte Sánchez, J. E. y col. (1998), analizaron el gen del receptor de GH en otros 17 pacientes con ISS, que presentaban niveles de GH sobre o iguales a 10 ng/ml y niveles de IGF-1 bajos o normales. En este estudio sólo uno de los niños presentó una nueva mutación en el exón 6 del gen del GHR, la cual estaba también presente en la madre y en un hermano del paciente estudiado, siendo ambos de baja estatura. Ambos hermanos afectados presentaban niveles normales de GHBP. La secuenciación del gen del GHR reveló la presencia de una transición de G a A, en la primera base del codón 144, provocando el cambio aminoacídico valina por isoleucina, en un residuo conservado entre receptores de GH de distintas especies.

transición de G a A, en la primera base del codón 144, provocando el cambio aminoacídico valina por isoleucina, en un residuo conservado entre receptores de GH de distintas especies. Esta misma mutación había sido encontrada previamente por Amselem y col., (1993) en un paciente con síndrome de Laron que resultó ser un heterocigoto compuesto para ésta y la mutación R43X en el gen del GHR.

Ambos estudios concluyen que algunos niños con baja estatura idiopática, pueden presentar una insensibilidad parcial a GH, debido a mutaciones menos disruptivas en el gen del receptor de GH. Por otra parte, el amplio rango de fenotipos presentados por los pacientes que portan estas mutaciones dependería también de la composición genética del individuo.

El último estudio realizado al respecto fue publicado por Salerno M.C. y col. (2001), en el cual se encontró una sola mutación en un sólo niño, de 14 pacientes analizados que presentaban ISS. La mutación había sido descrita previamente en otros trabajos y corresponde al cambio aminoacídico R161C.

En Chile existe un gran número de pacientes que consultan en el Instituto de Investigación Materno Infantil, de la Universidad de Chile, por talla baja. Entre éstos se presentan niños con una talla baja proporcionada, no mayor a 2 DS bajo la media. Nuestro interés entonces fue el de investigar si algunos de estos pacientes pudiesen presentar mutaciones en el gen del receptor de GH, ya sea en estado heterocigoto u homocigoto, y que causen una alteración parcial en la función del receptor de GH.

Para ello se seleccionaron aquellos pacientes cuyos exámenes clínicos (indicados en Métodos) mostraran alguna indicación de una insensibilidad parcial a GH, y se realizó el estudio molecular del gen del receptor de GH.

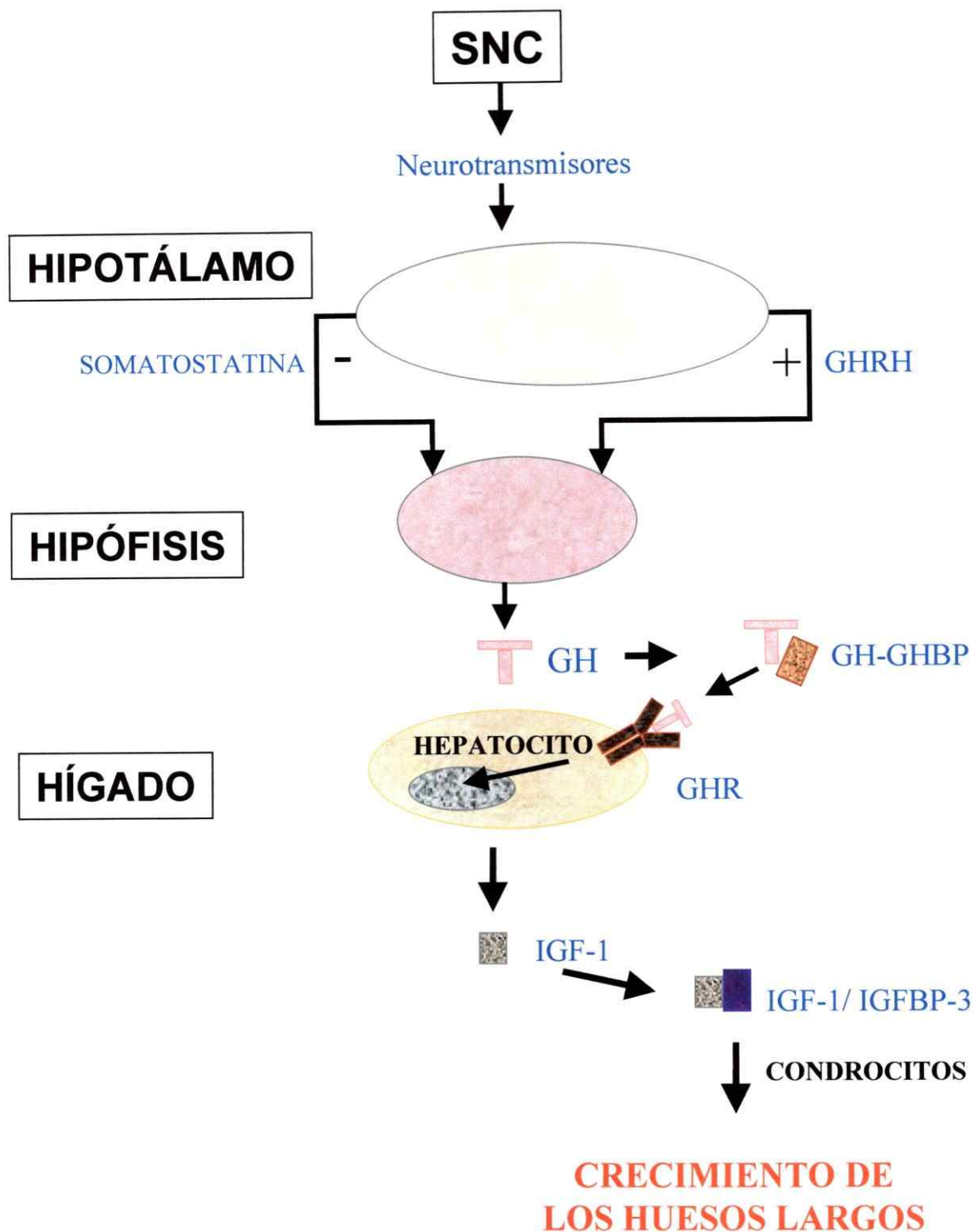


FIGURA 1. ESQUEMA DE LA VIA DE SÍNTESIS, SECRECIÓN Y ACCIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH). La figura muestra la vía de síntesis, secreción y acción de GH sobre su receptor, culminando en la liberación de IGF-1. GHRH: hormona liberadora de hormona de crecimiento. GHBP: proteína de unión de GH. IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1. IGFBP-3: principal proteína de unión de IGF-1.

MUTACIONES EN EL GEN DEL GHR ASOCIADAS AL SINDROME DE LARON.

TIPO	DEFECTO MOLECULAR	EXÓN	REF.
<i>Mutación de codón de término</i>	C38X	4	2
	R43X	4	2
	Q65X	4	7
	W80X	5	7
	W157X	6	7
	E183X	6	5
	R217X	7	3
	G224X	7	8
<i>Mutación de cambio de aminoácido</i>	C38S	4	7
	S40L	4	7
	W50R	4	7
	R71K	4	3
	F96S	5	1
	V125A	5	3
	P131Q	6	9
	V144D	6	3
	D152H	6	6
	I153T	6	10
	Q154P	6	10
	V155G	6	10
	R161C	6	3
	R211G	7	3
	C422F	10	4
	P561T	10	4
<i>Rearreglos</i>	Del exón 3, 5, 6	5, 6	16
<i>Deleciones</i>	36delC	4	7
	46delTT	4	12
	230delTA	7	12
	309delC	10	8
<i>Mutaciones de splicing</i>	G - A/+1 ds	Intrón 2	7
	G - A/+1 ds	Intrón 4	12
	G - C/-1 as	Intrón 5	3
	G - T/-1 as	Intrón 6	12
	A - G/-24 ds	(E180 splice) 6	11
	C - T/-61 ds	Intrón 7	7
	G223G	7	13
	R274T	8	13
	G - C/ -1 ds	Intrón 8	14
	G - A/ +1 ds	Intrón 9	15

MUTACIONES EN EL GEN DEL GHR ASOCIADAS A TALLA BAJA IDIOPATICA.

TIPO	DEFECTO MOLECULAR	EXÓN	REF.
<i>Mutación de cambio de aminoácido</i>	D44L	4	17
	R161C	6	17
	V144I	6	18
	R211H	7	17
	E224D	7	17
	A478T	10	19

TABLA 1. RESUMEN DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN DEL RECEPTOR DE GH. Las mutaciones descritas se clasifican en: sustituciones nucleotídicas que generan aparición de codones de término, cambios aminoacídicos, deleciones pequeñas y modificación de sitios de splicing. El 84% de las mutaciones descritas están localizadas en el dominio extracelular del receptor. Las referencias son: **1:** *Amselem y col., 1989.* **2:** *Amselem y col., 1991.* **3:** *Amselem y col., 1993.* **4:** *Kou y col., 1993.* **5:** *Berg y col., 1994.* **6:** *Duquesnoy y col., 1994.* **7:** *Sobrier y col., 1997.* **8:** *Kaji y col., 1997.* **9:** *Walker y col., 1998.* **10:** *Wojcik y col., 1998.* **11:** *Berg y col., 1992.* **12:** *Berg y col., 1993.* **13:** *Rosenbloom y col., 1999.* **14:** *Woods y col., 1996.* **15:** *Iida y col., 1998.* **16:** *Meacham y col., 1993.* **17:** *Goddard y col., 1995.* **18:** *Sanchez y col., 1998.* **19:** *Aylin y col., 1997.*

HIPÓTESIS

Pacientes con talla baja moderada que presentan una alteración en el nivel normal de GHBP, o una disminución del IGF-1, o un aumento de la GH circulante, presentan mutaciones en el gen del receptor de GH, que causan una alteración parcial en la función del receptor.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar en pacientes con talla baja idiopática, que manifiestan clínicamente una insensibilidad parcial a la hormona de crecimiento, la presencia de mutaciones en el gen del GHR, que podrían ser la causa genético-molecular de su baja estatura.

Objetivos específicos:

1. Detectar en los pacientes seleccionados para el estudio, posibles mutaciones puntuales en los exones codificantes del gen del receptor de GH, utilizando la técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism).
2. Determinar la alteración nucleotídica presente en aquellos conformómeros que presenten una alteración en la migración de su banda respecto a un control, mediante secuenciación del fragmento de DNA afectado.
3. Analizar la presencia de mutaciones en los exones codificantes del gen del GHR, en cinco pacientes seleccionados, por presentar niveles representativos de una insensibilidad a GH, mediante secuenciación de DNA de las regiones codificantes del gen.
4. Analizar la posible alteración que podría estar causando en la función del receptor los cambios nucleotídicos encontrados.

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

I.- PACIENTES

Los pacientes analizados se seleccionaron de un grupo de 100 niños con edades entre 5 y 10 años al momento de evaluación, que consultaron por talla baja, en el Instituto de Investigación Materno Infantil, de la Universidad de Chile, ubicado en el Hospital San Borja Arriarán.

A los niños se les sometió a un examen físico acucioso y a los siguientes exámenes de laboratorio clínico: perfil bioquímico completo, hemograma con velocidad de sedimentación, función tiroidea (T4 y TSH) y coproparasitológico seriado, orina completa, caroteno y/o antiendomiso, con el fin de descartar genopatías y enfermedades sistémicas.

También se les realizó la determinación plasmática de los niveles de IGF-1 por RIA, de IGFBP3 por IRMA con un kit comercial (DSL) y de GHP por RIA con el anticuerpo monoclonal (Mab 263). Se les midió secreción espontánea de hormona de crecimiento por RIA con doble anticuerpo, durante 12 horas, tomándose muestras de sangre cada 20 minutos. Por último se midió la respuesta de secreción de GH a pruebas de estímulo con clonidina, tomándose muestras de sangre a los 0, 60 y 90 minutos.

En una primera etapa se realizó una selección de pacientes que cumplieran con los siguientes criterios:

- Talla menor a 2,0 DS respecto a la media de las curvas del NCHS (National Center for Health Statistics).
- Velocidad de crecimiento menor al percentil 5 para su edad y sexo.
- Relación peso/talla dentro del rango normal (90-100%).

- Retraso en la edad ósea de al menos un año.

Posteriormente, en una segunda etapa, del grupo de niños que presentaba las características anteriores, se seleccionaron pacientes que cumplieran con al menos uno de los siguientes criterios:

- Niveles de IGF-1 y/o IGFBP3 bajo el promedio para su edad y sexo.
- Niveles de GHBP aumentados o disminuidos.
- Respuesta de GH a pruebas de estímulo farmacológico mayor a 10 ng/ml, concentración que es considerada normal.

De los 100 niños que consultaron por talla baja, 26 pacientes quedaron seleccionados por cumplir con los criterios antes mencionados en la primera y segunda etapa de selección. En este estudio se consideraron y estudiaron 14 de los 26 pacientes seleccionados.

A estos pacientes se les tomó una muestra de sangre de 10 ml, para la preparación de DNA genómico a partir de leucocitos. El consentimiento informado fue obtenido de uno de los padres de los niños analizados. Las características clínicas de cada uno de los pacientes seleccionados para el estudio molecular, están detalladas en la tabla 2. Los valores de referencia para IGF-1, IGFBP-3 y GHBP de acuerdo a la edad y sexo de los niños, están detallados en la tabla 3.

PACIENTE	EDAD (años)	TALLA (DS)	IGF-1 (ng/ml)	IGFBP-3 (mg/L)	GHPB (%RSB)	GH máxima* (ng/ml)
A.9	10,5	-2,5	42	1,4	75,3	57,4
A.11	9,2	-2,5	48,4	1,7	63,1	28
A.14	7,9	-4,2	32	1,0	63,7	17,2
A.15	5,4	-2,5	83	1,4	45,4	22
A.16	6,7	-4,0	81	1,0	45,5	32,7
B.20	8,8	-2,7	141	2,5	56,5	11,5
B.21	10,4	-2,5	156	2,4	51,9	33,4
B.22	9,2	-5,2	123	2,7	49,2	16,4
B.23	6,3	-2,7	158	3,6	47,2	37,3
B.24	5,3	-3,5	106	2,7	77,2	38,7
B.25	10,2	-2,8	200	3,4	63,8	32
B.27	10	-2,7	334	4,2	ND	34,7
B.28	3,6	-3,3	141	2,6	ND	11,6
B.29	11	-2,9	78	2,2	64	26,6

TABLA 2. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS. En la parte superior están los pacientes A, a los cuales se les secuenció todos los exones codificantes del gen del GHR. En la parte inferior están los pacientes B, a los cuales se les analizó las regiones codificantes del gen del GHR por SSCP. %RSB: Porcentaje de unión relativa a un pool de suero de adulto normal. *:Concentración máxima de GH obtenida en respuesta a un test de estímulo farmacológico.

Valores de referencia para IGF-1 e IGFBP-3 en niños prepuberales:

	Varones	Mujeres
IGF-1	164 +/-40	182 +/-70
IGFBP-3	2,3 +/-0,4	2,3 +/-0,3

Valores de GHBP en niños prepuberales:

EDAD	HOMBRES		MUJERES	
	n	GHBP (%RSB)	n	GHBP (%RSB)
4	3	30 +/-11	4	38 +/-16
5	6	39 +/-18	7	52 +/-16
6	8	42 +/-13	12	52 +/-20
7	11	46 +/-16	3	44 +/-5
8	4	35 +/-16	3	57 +/-22
9	3	42 +/-5	3	62 +/-8

TABLA 3. VALORES DE REFERENCIA PARA GHBP, IGF-1 E IGFBP-3. La tabla superior indica los valores de referencia para los factores IGF-1 y su proteína de unión IGFBP-3 según sexo. La tabla inferior indica los valores de referencia para la proteína de unión GHBP, según edad y sexo para niños entre 4 a 9 años.

II.- MATERIALES

Los reactivos químicos, enzimas y otros productos fueron obtenidos de las siguientes compañías:

- ◆ De *Sigma Chemicals Co* , se obtuvo el Triton X-100, la formamida, “Sigmacote” y el acetato de sodio.
- ◆ De *Merck*, se obtuvieron KCl, MgCl₂, NaCl, NaOH, HCl, el etanol absoluto y el ácido acético glacial.
- ◆ De *Bio-Rad Laboratories*, se obtuvo el SDS, el persulfato de amonio y el azul de bromofenol.
- ◆ De *Gibco BRL*, se obtuvo el EDTA, el tampón Tris, la agarosa, el ácido bórico, la urea, TEMED, el kit de secuenciación de DNA “dsDNA Cycle Sequencing System” y el kit de purificación de productos de PCR “Concert Matrix Gel Extraction”.
- ◆ De *Stratagene*, se obtuvo el bromuro de etidio.
- ◆ De *Fluka Chemica*, se obtuvo el isopropanol.
- ◆ De *Equilab*, se obtuvo el ácido nítrico.
- ◆ De *Promega*, se obtuvo el carbonato de sodio, el nitrato de plata, el formaldehído 37%, xilano y el kit de purificación de DNA “ Wisard™ PCR Preps Purification Systems”.
- ◆ De *Winkler Ltda*, se obtuvo la solución para gel de secuencia “Secugel 6%”.
- ◆ De *FMC Bioproducts*, se obtuvo NuSieve agarosa y la solución de acrilamida MDE.
- ◆ De *Whatman Ltd.*, se obtuvo el papel filtro número 3.
- ◆ De *Kodak*, se obtuvo la película autorradiográfica Reflection™ de 35,6x43,2 cm.

- ◆ De *Polaroid*, se obtuvo la película instantánea en blanco y negro tipo 667.
- ◆ De *NEN*, se obtuvo el [γ^{32} P]ATP con una actividad específica de 6000 Ci/mmol.
- ◆ De *GEN-SET*, *Gibco BRL* y del centro de análisis y biomoléculas *Oligopéptido* del Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se obtuvieron los oligonucleotidos utilizados como partidores para la reacción de PCR.
- ◆ De *Boehringer Mannheim*, se obtuvo la enzima Taq DNA polimerasa y los desoxinucleótidos dGTP, dATP, dTTP, dCTP.
- ◆ De *New England Biolabs*, se obtuvieron las enzimas *NlaIII*, *Hinf I* y el vector pBR322.

III.- MÉTODOS

1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Se utiliza la técnica descrita por Lahiri y col., (1991). Se extraen 10 ml de sangre venosa a los pacientes en estudio, se colocan en un tubo que contiene 0,1 ml de EDTA 0,5M como anticoagulante y se invierte para mezclar. Luego el volumen de sangre se divide en dos tubos de 15 ml y se agregan 5 ml de tampón TKM1 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2mM) con 125 µl de Triton X-100, se mezcla suavemente para lisar las células y se centrifuga a 810xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se elimina por inversión y el sedimento nuclear se conserva. Este sedimento se lava nuevamente con 5 ml de tampón TKM1, resuspendiendo suavemente y luego se centrifuga a 810xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se elimina y el sedimento se resuspende en 800 µl de tampón TKM2 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,4 M). Luego se agregan 50 µl de SDS al 10% , se mezcla bien y se incuba 10 minutos en un baño de agua a 55°C. Pasado el tiempo, se agregan 300 µl de NaCl 6 N (saturado), se mezcla bien hasta observar la formación de un precipitado de proteínas y se centrifuga a 2050xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se colecta el sobrenadante en un tubo de 15 ml y el sedimento de proteínas se descarta. Al sobrenadante se le agregan dos volúmenes de etanol al 100% y se mezcla por inversión para precipitar el DNA. El DNA se remueve con la ayuda de una punta de pipeta y se transfiere a un tubo de 1,5 ml que contiene 1 ml de etanol frío al 70%, manteniéndolo en hielo. Luego se centrifuga a 12000xg durante 5 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y el DNA se seca a temperatura ambiente por

algunos minutos para luego resuspenderlo en 500 μ l de tampón TE-PCR (Tris- HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM, pH 8).

Cada muestra de DNA se cuantifica espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm para determinar su concentración y pureza.

2. AMPLIFICACIÓN DE DNA POR LA TÉCNICA DE PCR.

2.1 Diseño de los partidores.

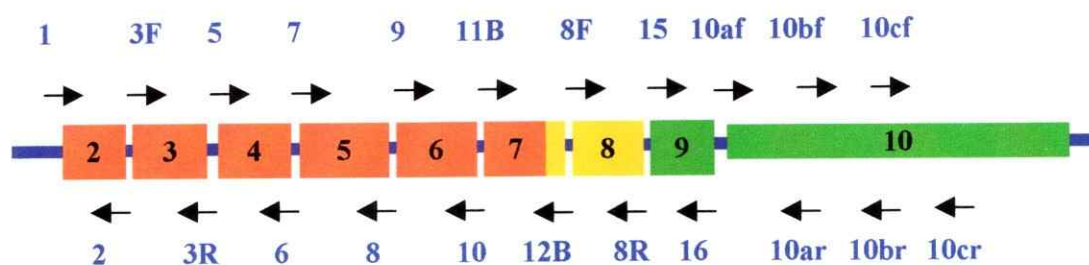
Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron a partir de la secuencia publicada del gen del receptor de GH para los exones 2, 4, 5, 6, 7 y 9 (Leung y col., 1987). Las secuencias para los partidores de los exones 3 y 8 fueron facilitadas por la Dra. Goddard (Genetech). Para el exón 10 se diseñaron tres parejas de partidores que permitieran la amplificación del exón completo en 3 fragmentos sobrepuestos.

Los partidores se diseñaron aproximadamente 20 nucleótidos antes del inicio y después del término de cada exón, a modo de abarcar las regiones de unión intrón-exón del gen GHR. La longitud de los partidores se ajustó entre 18 a 25 bases y sus T_m en el rango de los 52 a 64°C, según la formula empírica: $(A + T) \times 2 + (C + G) \times 4$. Además se tuvo consideración de que los oligonucleótidos no presentaran secuencias palindrómicas que permitieran complementariedad entre ellos y formación de estructura secundaria.

Las secuencias de los partidores utilizados con sus respectivas T_m se muestran en la tabla 4. La figura 2 muestra un esquema parcial del gen, la localización relativa de los partidores y una tabla con los tamaños esperados de los fragmentos amplificados.

PARTIDORES USADOS PARA AMPLIFICAR LOS EXONES DEL GEN GHR			
NOMBRE DEL PARTIDOR	EXON	SECUENCIA NUCLEOTIDICA 5'→3'	T _m (°C)
REGH-1	2	TCTGCTTTTAATTGCTGGGCTTT	64
REGH-2	2	GAATACAGTTCAGTGTTGTTTCAA	64
GHR3GF	3	TACACAGGGTCATATCAGATTG	62
GHR3GR	3	CTATTCCAGTACTACCATCCC	64
REGH-5	4	ATATGACTCACCTGATTTTCATGC	64
REGH-6	4	TAGGTACATCCATGGAGAGGAA	64
REGH-7	5	GCTACAACATGATTTTTGGAACAA	64
REGH-8	5	CATTTATTTAGTCTAAAACATGTCA	64
REGH-9	6	AATATTAATTGTGTCTGTCTGTGT	64
REGH-10	6	GAAAGAAAAGTCAAAGTGTAAGGT	64
RECGH-11B	7	TTGAGTTGTTGACTCTTTGGCC	64
RECGH-12B	7	AACTGTTATATTGACAAAAGCC	58
GHR8GH	8	GAAACTGTGCTTCAACTAGTC	60
GHR8GR	8	AACGGTACAAAATCACAA	48
REGH-15	9	AGAATATGTAGCTTTTAAGATGTCA	64
REGH-16	9	GACAGGAGTCTTCAGGTGTTAA	64
GHR10GFA	10a	GAGTTTCTTTTCATAGATCTTC	58
GHR10GRA	10a	TTAACCTCTGTGGCTGAG	54
GHR10GFB	10b	ACATGAGGGTACCTCAGA	52
GHR10GRB	10b	CAGAAGTAGGCATTGTCC	54
GHR10GFC	10c	GGAAATGGTCTCACTCTG	54
GHR10GRC	10c	CCAAAGAAAGGCTAAGGC	54

TABLA 4. LISTA DE PARTIDORES. Se indican las secuencias de los partidores utilizados para amplificar cada uno de los exones del gen GHR y el T_m estimado de acuerdo a su composición nucleotídica [$T_m = 2x(A + T) + 4x(C + G)$].



PARTIDORES	TAMAÑO DEL FRAGMENTO
1 - 2	187 pb
3F - 3R	252 pb
5 - 6	225 pb
7 - 8	276 pb
9 - 10	268 pb
11B - 12B	268 pb
8F - 8R	205 pb
15 - 16	183 pb
10FA - 10RA	311 pb
10FB - 10RB	396 pb
10FC - 10RC	375 pb

FIGURA 2. ESTRATEGIA DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN GHR POR PCR. Las flechas indican la posición relativa de los partidores en el gen. Los cuadros enumerados representan los exones codificantes. El color naranja indica la región codificante para el dominio extracelular, el amarillo indica la región codificante para el dominio transmembrana y el verde indica la región codificante para el dominio citoplasmático. La tabla inferior indica el tamaño de los fragmentos amplificados por cada pareja de partidores.

2.2 Amplificación del gen del GHR por PCR.

La amplificación de los exones codificantes del gen del receptor de GH, se realiza en un volumen final de 50µl, utilizando los partidores indicados en la tabla 4. La mezcla de reacción contiene los desoxinucleótidos dGTP, dATP, dTTP, dCTP, en una concentración de 200 µM cada uno, el tampón específico (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, Tritón X 100 0,1%, MgCl₂ 2,5 mM), 25 pmoles de cada partidor, 200-500ng de DNA genómico y 1 unidad de Taq DNA polimerasa. La reacción de amplificación se efectúa en varias etapas, determinadas por una temperatura y tiempo específicos programados en un termociclador.

Se utilizan tres programas de PCR distintos, según el exón a amplificar.

La amplificación para los exones 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se realiza con el programa: 1) desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, 2) 28 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 48°C y 1 minuto a 72°C, 3) elongación final de 10 minutos a 72°C.

El exón 3 se amplifica con el programa: 1) desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, 2) 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, 3) elongación final de 6 minutos a 72°C.

El exón 10 se amplifica con el siguiente programa de "touchdown": 1) desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, 2) 4 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C y 30 segundos a 72°C, 3) 4 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, 4) 26 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, 5) elongación final de 6 minutos a 72°C.

3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

Los productos de PCR obtenidos se resuelven por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris 9 mM, ácido bórico 9 mM, EDTA 2 mM, pH 8), utilizando como estándar de tamaño molecular el plasmidio pBR322 digerido con la enzima HinfI. La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 80 volts por aproximadamente 2 horas. El gel de agarosa se tiñe con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y la fluorescencia emitida se observa en un transiluminador UV.

4. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

El fragmento de DNA amplificado por la reacción de PCR se purifica por dos métodos distintos, de acuerdo a la presencia o ausencia de bandas inespecíficas en cada producto de la reacción.

4.1 Purificación del producto específico desde un gel de agarosa.

Los productos de la reacción de amplificación se separan por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se corta el trozo del gel que contiene el producto de PCR específico y se siguen las indicaciones que acompañan el kit de purificación de "CONCERT Matrix Gel Extraction System". El trozo de agarosa se coloca en un tubo de 1,5 ml, se pesa y se agregan 30 µl de tampón L1 (perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio, solubilizador de TBE-TAE), en conjunto con 1 µl de resina de sílica por cada 10 mg de gel en ambos casos. La mezcla se agita en Vortex en forma esporádica mientras se incuba a 50°C durante 15 minutos y se deja 5 minutos más hasta la completa disolución. Se centrifuga a 12000xg por 30 segundos y el sobrenadante se elimina.

Este paso se repite una vez más. Luego el sedimento se resuspende con Vortex en igual cantidad de tampón L2 (NaCl, EDTA, Tris-HCl). Se centrifuga a 12000xg por 30 segundos y el sobrenadante se remueve cuidadosamente. Este paso se repite una vez más, se elimina el sobrenadante y se deja secar la resina para remover el etanol residual. Finalmente la resina se resuspende por Vortex en 20 µl de tampón TE (Tris- HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM, pH 8), se incuba a 50°C durante 5 minutos y se centrifuga a 12000xg por 30 segundos. Luego se remueve el sobrenadante cuidadosamente y se coloca en un tubo limpio.

4.2 Purificación directa del producto de PCR desde la mezcla de reacción.

Se transfiere el volumen de la reacción de PCR a un tubo de 1,5 ml y se sigue las indicaciones del kit "*WizardTM PCR Preps DNA Purification Systems*". El volumen de la reacción de PCR se mezcla con 100 µl de tampón modificador (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,8 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tritón X-100 0,1%) más 1 ml de resina y se agita en vortex durante un minuto en forma esporádica. Se filtra esta mezcla por la columna suministrada por el kit. Luego se lava con 2 ml de isopropanol al 80%. Se centrifuga para eliminar el isopropanol residual y el DNA puro se recupera agregando 50 µl de agua destilada a la columna. Se deja reposar un minuto y se centrifuga a 10000xg por 30 segundos sobre un tubo limpio.

5. DETECCIÓN DE MUTACIONES POR LA TÉCNICA DE POLIMORFISMOS DE CONFORMÓMEROS DE SIMPLE HEBRA (SSCP).

La técnica de SSCP permite detectar mutaciones puntuales en fragmentos de DNA de no más de 300 pares de bases, que han sido previamente amplificados por la técnica de PCR y purificados. El producto de PCR es desnaturado previo a ser sometido a una electroforesis en

gel de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalantes. De esta forma cada simple hebra del DNA adopta una estructura secundaria específica (conformómero) dependiente de su secuencia, a medida que avanza la electroforesis. Estos conformómeros de DNA de simple hebra migran en el gel a una velocidad determinada dependiente de su tamaño y conformación. De esta forma es esperable que la mayoría de los conformómeros cambie su movilidad electroforética cuando el DNA presenta una mutación. Con esta técnica se pueden detectar alrededor del 80% de las mutaciones existentes en un gen. El éxito en la detección de mutaciones depende de las condiciones de la electroforesis y de la secuencia nucleotídica que involucra a la mutación.

5.1 Electroforesis en geles de MDE.

Los fragmentos de DNA obtenidos de la amplificación por PCR se resuelven por electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando una solución comercial MDE (Mutation Detection Enhancement) al 0,5X. Previo a la confección del gel se esparce en uno de los vidrios 1 ml de una solución que contiene xilano (γ -metacriloxiopropiltri-metoxisilano) al 0,3%, ácido acético al 0,5% y etanol al 95%, con el fin de que el gel se pegue en este vidrio y así poder manipularlo durante el proceso de tinción con plata. La electroforesis se realiza en tampón TBE 0,6X , a una potencia de 3 watts por un tiempo de 12 horas a temperatura ambiente.

Las muestras de DNA se preparan tomando 5 μ l del producto amplificado y se mezclan con 5 μ l de tampón de carga que contiene formamida al 95% (V/V). Luego se desnaturalan a 95°C durante 5 minutos y se conservan en hielo otros 5 minutos, para posteriormente cargar en el gel 8 μ l de la mezcla.

5.2 Tinción con plata.

Finalizada la electroforesis se tiñe el gel con plata utilizando el siguiente protocolo: el gel se coloca en una solución de etanol al 10% por aproximadamente 8 minutos y luego se lava con agua destilada (este lavado se repite entre cada paso). A continuación el gel se oxida en una solución de ácido nítrico al 1% por 5 minutos. Luego se coloca a teñir en una solución de nitrato de plata 5,9 mM por 30 minutos. El gel se revela en una solución de carbonato de sodio 0,28 mM y formaldehído 0,056%, el que debe agregarse en el momento en que se procede a revelar. La solución debe estar a 4°C aproximadamente. El gel se deja en esta solución con movimiento continuo hasta que comiencen a aparecer las bandas. Para fijar la tinción, después de enjuagar con agua destilada, se coloca el gen en una solución de ácido acético glacial al 10% por 5 minutos.

6. SECUENCIACIÓN DE DNA.

La secuenciación de los productos de PCR se realizó con el kit "*dsDNA Cycle Sequencing System*", una modificación del método de Sanger, que permite secuenciar fragmentos de DNA de doble hebra directamente. La reacción se realiza en tres etapas según el protocolo:

6.1 Marcación del partidor.

En un tubo de 0,5 ml se coloca 1 pmol de partidor, 2 pmoles de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (10 μCi), 1 unidad de T4 polinucleótido quinasa (1U/ μl) en presencia de tampón quinasa (Tris-HCl 60 mM pH 7,8, MgCl_2 5 mM, KCl 0,2 mM) y se lleva a un volumen final de 5 μl . La mezcla se

incuba a 37°C por 15 minutos y posteriormente la enzima se inactiva a 55°C por 5 minutos. El partidor marcado en su extremo 5' se conserva en hielo hasta su uso.

6.2 Reacción de secuenciación.

Se incuban 50 a 100 ng de DNA templado, previamente purificado, en presencia de 1 pmol del partidor marcado radiactivamente y 1,25 unidades de Taq DNA Polimerasa en el tampón adecuado (Tris-HCl 30 mM, pH 9, MgCl₂ 5 mM, KCl 30 mM, W-1 0,05%(^P/_V)), en un volumen final de 36µl. Este volumen se distribuye en cuatro tubos a los cuales se le han adicionado 2 µl de la correspondiente mezcla de terminación (dGTP, dATP, dTTP, dCTP más ddGTP, o ddATP, o ddTTP, o ddCTP). La mezcla de reacción se cubre con una gota de aceite mineral y se transfiere a un termociclador donde se somete al siguiente programa: 5 minutos de desnaturación inicial a 95°C; 30 ciclos consistentes en 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y un minuto a 70°C. Finalizados los 30 ciclos las muestras quedan a 4°C. Luego se agregan 5 µl de solución de detención a cada tubo [95%(^V/_V)de formamida, EDTA pH 8 10 mM, 0,1% (^P/_V) de azul de bromo fenol y 0,1% (^P/_V) de xileno cianol] y se almacenan a -20°C.

6.3 Electroforesis de alta resolución en geles de poliacrilamida.

La reacción de secuenciación se resuelve en un gel comercial "Secugel 6%" de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (acrilamida:bisacrilamida (19:1), urea 8 M). El gel es precorrido a 1800 volts por aproximadamente 30 minutos con el fin de que éste alcance una temperatura de alrededor de 52°C. Las muestras se desnaturan a 95°C por 5 minutos, luego se colocan en hielo por 5 minutos y se cargan 4 µl de muestra por carril. La electroforesis se

realiza en tampón TBE a 1800 volts aproximadamente por un período de 3 a 6 horas. Después el gel se transfiere a un papel Whatman, se seca al vacío a 80°C por 2 horas y se expone a una película autorradiográfica por 12 a 72 horas dependiendo de la radiactividad del $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

7. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

El fragmento amplificado con los partidores REGH-9 y REGH-10 se digiere con la enzima de restricción *NlaIII*, para verificar la presencia del cambio nucleotídico encontrado en el paciente B.23, que origina un nuevo sitio de restricción para esta enzima. Los tamaños obtenidos producto de la digestión se muestran en un esquema la figura 9A.

Se colocan 250 ng de la reacción de PCR en un tubo de propileno de 0,5 ml, se agrega el tampón suministrado con la enzima de restricción (acetato de potasio 50 mM, Tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 1 mM pH 7,9), BSA 100 µg/ml, 1 unidad de la enzima de restricción *NlaIII* y agua destilada hasta completar un volumen final de 30 µl. La reacción se mezcla en Vortex, se centrifuga brevemente y se incuba a 37°C durante 3 horas en un baño termostático. El producto total de la digestión se carga en un gel de NuSieve-agarosa al 3% (2:1), usando como estándar de tamaño molecular el plasmidio pBR322 digerido con la enzima *HinfI*. La electroforesis se realiza en tampón TBE a un voltaje de 90 volts por 3 horas. Luego el gel se tiñe con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y la fluorescencia emitida se observa en un transiluminador UV.

RESULTADOS

Esta tesis constituye la parte final de un estudio realizado en el laboratorio de Genética Molecular Humana, en el cual se analizaron en total 26 pacientes con talla baja idiopática, en un período de tres años. En esta tesis se estudiaron en total 9 pacientes nuevos (B), a los cuales se les realizó el estudio molecular completo del gen GHR. Además se secuenciaron los exones 2 al 10 del gen GHR en otros 5 pacientes del año anterior (A), que ya habían sido analizados por la técnica de SSCP. Estos 5 pacientes fueron escogidos por presentar características clínicas más relevantes en relación con el síndrome de insensibilidad a GH, motivo por el cual nos pareció importante analizar el gen con mayor detalle. Las características clínicas de los pacientes A y B están detalladas en la tabla 2.

1. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE CONFORMÓMEROS DE SIMPLE HEBRA (SSCP).

Con el fin de detectar posibles mutaciones en alguno de los exones, o en alguna de las regiones de unión intrón-exón del gen GHR, en los pacientes B, se realizó un análisis molecular de este gen por la técnica de SSCP. Para ello se amplificó por la técnica de PCR los exones codificantes 2 al 10 del gen en cada paciente, se purificó el producto específico de cada reacción y se los sometió a análisis por electroforesis en solución MDE, como se explica en la sección 5.1 de Métodos.

La figura 3 muestra el resultado del análisis por SSCP de cada uno de los exones para algunos de los pacientes analizados, a modo de ejemplo. En el resultado del análisis por SSCP del exón 6 se puede observar que el paciente B.23, presenta una alteración en el patrón de

migración de las bandas de DNA. Una de las bandas, la banda inferior, migra más abajo respecto al control y al resto de los individuos analizados. Como el conformómero de simple hebra depende de la secuencia nucleotídica del DNA, estos resultados sugieren que este fragmento presenta algún cambio en su secuencia nucleotídica con respecto al control.

El análisis por SSCP para el fragmento c del exón 10, presenta leves diferencias en el patrón de migración de algunas bandas, que no son reproducibles entre un SSCP y otro por dificultades de la técnica. Esto sugiere que la secuencia de DNA de este fragmento del exón 10, podría presentar cambios nucleotídicos que dan cuenta de las diferencias observadas en la migración para tales bandas. El fragmento c del exón 10 fue secuenciado para los 14 pacientes analizados, y se encontró el polimorfismo L526I, analizado posteriormente en la sección 4 de Resultados.

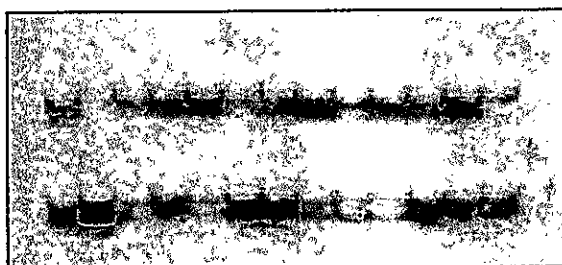
En el resto de los exones analizados por SSCP no se observan diferencias en el patrón de bandas obtenido con respecto al control.

2. SECUENCIACIÓN DEL EXÓN 6 DEL GEN DEL GHR EN EL PACIENTE B.23 Y EN SUS PADRES.

Con el fin de determinar la alteración molecular detectada en la electroforesis del exón 6 del paciente B.23, se procedió a secuenciar este exón. Para ello se siguió el protocolo de secuenciación explicado en la sección 6 de Métodos, utilizando los mismos partidores descritos para el exón 6 en la tabla 2.

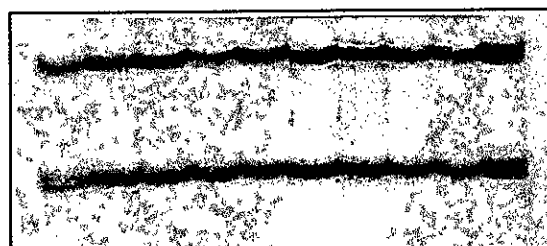
La figura 4 muestra la autorradiografía de la secuencia nucleotídica del exón 6 en el DNA de la madre, del padre y del hijo (paciente B.23). La secuencia reveló un cambio nucleotídico, que corresponde a una transición C-T en la primera base del codón 161 del cDNA. Este cambio está presente en el DNA del padre y del hijo en forma heterocigota, ya

EXON 2



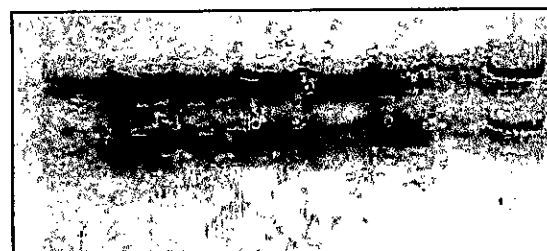
C 15 11 9 22 20 25 23 21 24 27 28 29

EXON 3



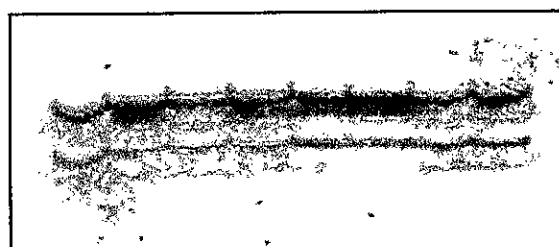
20 21 22 23 24 25 27 28 29 C

EXON 4



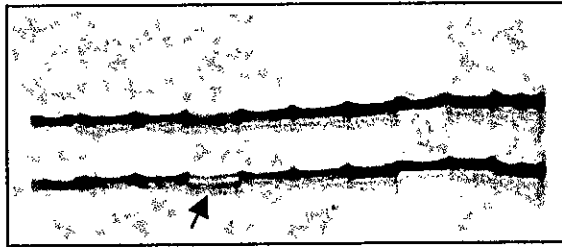
22 20 25 23 21 24 27 C

EXON 5



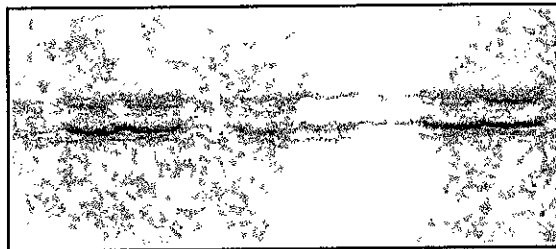
22 20 25 23 21 24 27 C

EXON 6



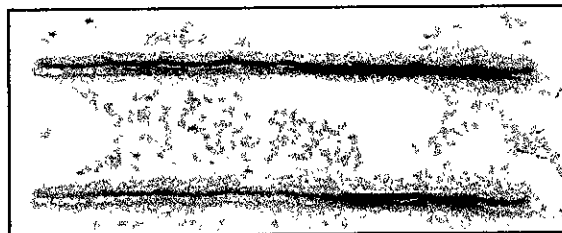
20 21 22 23 24 25 27 28 29 C

EXON 7



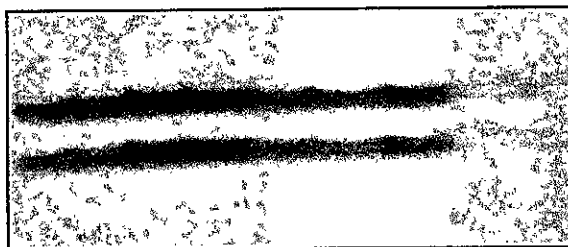
22 20 25 23 21 24 27 28 C

EXON 8



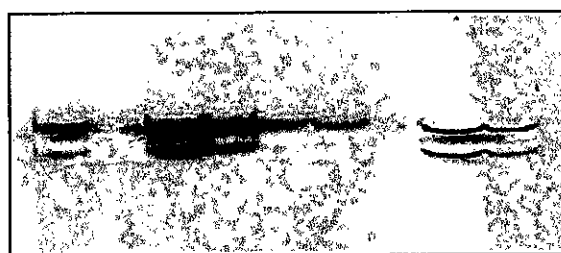
22 20 25 23 21 24 29 C

EXON 9



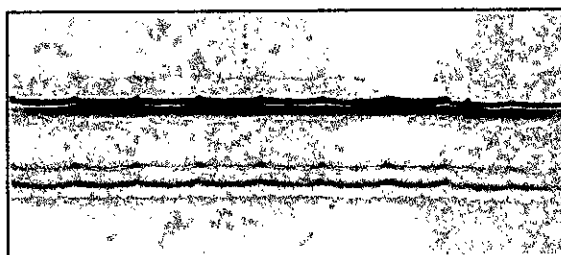
22 20 25 23 21 24 27 28 C

EXON 10a



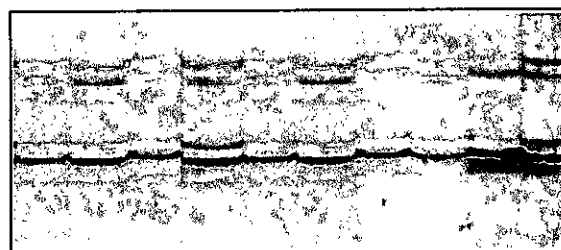
22 20 25 23 21 24 C 27 28

EXON 10b



22 20 25 23 21 24 27 28 C

EXON 10c



20 21 22 23 24 25 27 28 29 C

FIGURA 3. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE CONFORMOMEROS DE SIMPLE HEBRA DE LOS EXONES 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10a, 10b y 10c. Cada uno de los exones 2 al 10 fue amplificado por PCR para luego ser analizados por SSCP según se describe en Métodos V. La figura muestra el resultado de la electroforesis, luego de la tinción de plata. Los números bajo cada figura indican el número del paciente y c: control.

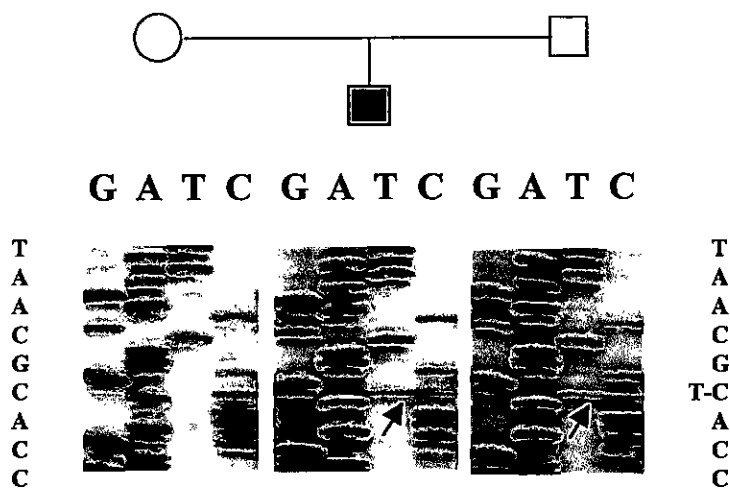


FIGURA 4. SECUENCIACIÓN DEL EXÓN 6 DEL GEN GHR EN EL PACIENTE B.23 Y SUS PADRES. El exón 6 se amplificó por la técnica de PCR, utilizando los partidores REGH-9 y REGH-10 y se purificó, para su posterior secuenciación de acuerdo al protocolo VI de Métodos. La reacción de secuencia se resolvió en un gel desnaturalante de poliacrilamida al 6% y se reveló por autorradiografía. La figura muestra el resultado de la autorradiografía, donde la flecha indica la posición del cambio nucleotídico C-T, presente en el hijo y también en el padre.

que se observa la comigración de dos bandas en la misma posición, que corresponden a una citosina y a una timina. La autorradiografía correspondiente a la secuencia de DNA del exón 6 encontrada en la madre no presenta cambios nucleotídicos con respecto a la secuencia publicada (Godowski y col 1989).

Esta transición provoca un cambio aminoacídico de arginina por cisteína, (R161C) en una región del dominio extracelular del receptor de GH que presenta 7 cisteínas, 6 de las cuales se unen de a pares.

3. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN R161C POR DIGESTIÓN CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *NlaIII*.

La transición C-T presente en el exón 6 del gen GHR genera la aparición de un sitio de restricción para la enzima *NlaIII*, como se indica en la figura 5. Además río arriba de la mutación detectada existe un sitio de restricción normal para la misma enzima.

3.1- Análisis de la mutación en el paciente B.23 y sus padres.

Con el fin de montar un ensayo rápido para la detección de esta transición se amplificó por la técnica de PCR el fragmento de DNA que contiene el exón 6, y el producto de la reacción se sometió a digestión con la enzima *NlaIII* según se indica en la sección 7 de Métodos. La figura 6A muestra un esquema donde se indica el tamaño del fragmento amplificado del exón 6, los sitios de restricción para la enzima y los productos obtenidos luego de realizar la digestión enzimática. El fragmento amplificado del exón 6 presenta un tamaño de 268 pb, y los tamaños esperados de la digestión con la enzima son: 116 pb, 31 pb y 121 pb, en el caso de que el cambio se presente en forma homocigota para un individuo. En el caso de

```

1.  AATATTAAAT  TGTGTCTGTC  TGTGTACTAA  TGATCTGTTG
    .....

41  AATTGCACAG  TGCAACCAGA  TCCACCCATT  GCCCTCAACT
    .....

81  GGACTTTACT  GAACGACAGT  TTAACTGGGA  TTCATGCAGA
    .....
                                Nla III

121 TATCCAAGTG  AGATGGGAAG  CACCACGCAA  TGCAGATATT
    .....
                                CACCATGCAA
                                Nla III

161 CAGAAAGGAT  GGATGGTTCT  GGAGTATGAA  CTTCAATACA
    .....

201 AAGAAGTAAA  TGAAACTAAA  TGGAAAATGG  TAAGATGTTG
    .....

241 CTACACCTTA  CACTTTGACT  TTTCTTTC
    .....

```

FIGURA 5. LOCALIZACIÓN DE LA TRANSICIÓN C-T EN LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL EXÓN 6. La secuencia control se muestra en color azul y el cambio nucleotídico C-T, se indica en la parte inferior en color rojo. Los puntos señalan la homología de secuencia. En color verde se indican los dos sitios de restricción para la enzima NlaIII en el fragmento amplificado del exón 6.

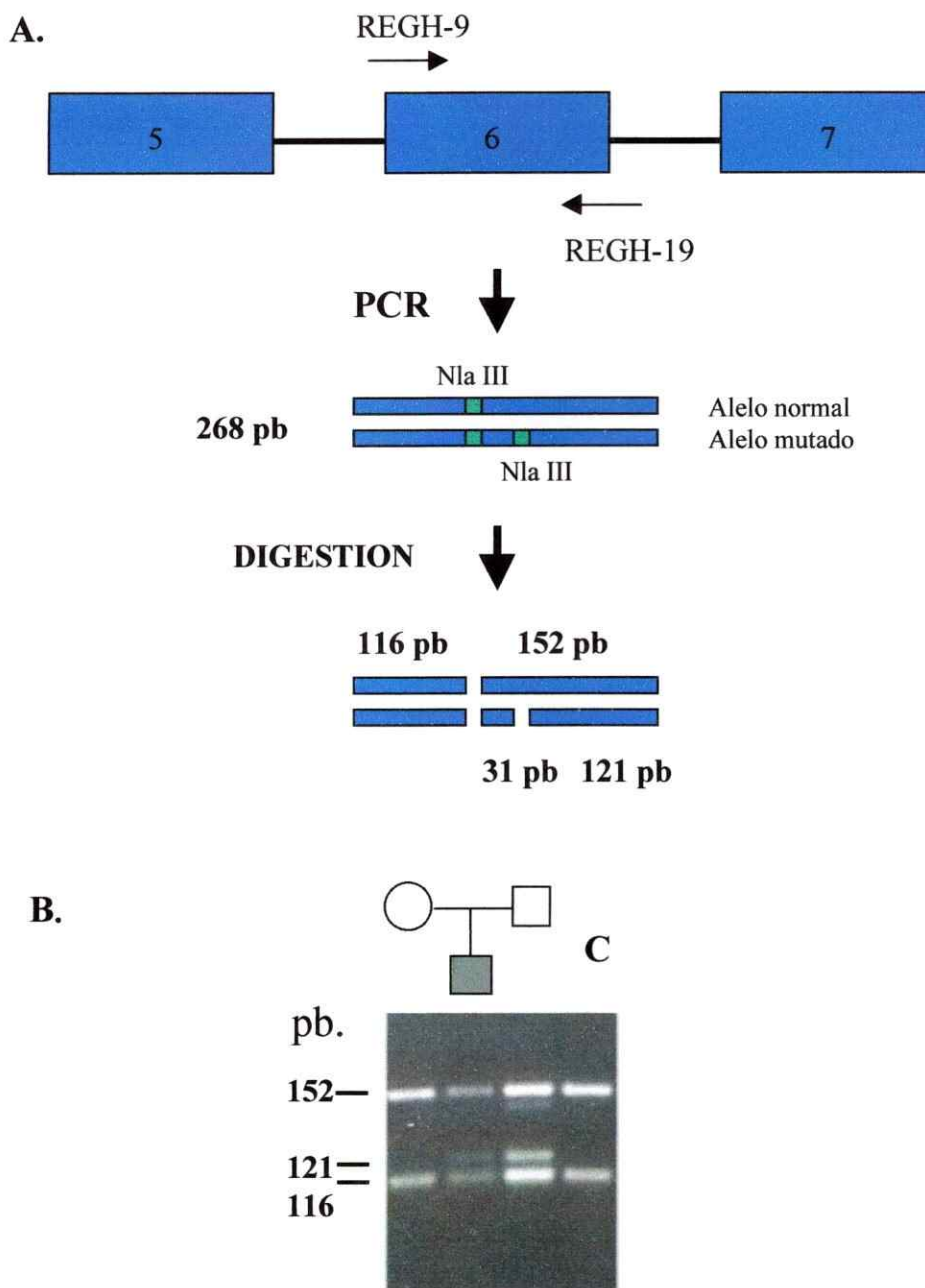


FIGURA 6. ANÁLISIS DE LA TRANSICIÓN C-T POR DIGESTIÓN CON LA ENZIMA NlaIII. A. Esquema de la digestión del exón 6 con la enzima NlaIII en un alelo normal y en uno mutado. Las flechas indican la ubicación de los partidores 9 y 10. En color verde se indican los sitios de restricción para la enzima y los tamaños de los productos están indicados en pb: pares de bases. B. La figura muestra el patrón de bandas obtenido de la digestión del exón 6 con la enzima Nla III, en la madre, el hijo, el padre y en un control (C).

estar ausente la transición los tamaños esperados son 116 pb y 152 pb. Este análisis se realizó en ambos padres y en el hijo (B.23). La figura 6B muestra el resultado de la digestión enzimática en la familia, donde se puede observar la presencia de las bandas de 116 pb y 121 pb tanto en el padre como en el hijo, lo que corrobora la presencia de la transición C-T estado heterocigoto, mientras que en la madre solo se aprecian las bandas de 152 pb y 116pb, correspondientes a la digestión de alelos normales.

3.2- Búsqueda de la mutación R161C en 50 individuos controles de la población de Santiago.

Con el propósito de definir si la transición que genera el cambio aminoacídico R161C corresponde a un polimorfismo de secuencia o a una mutación, se analizó la presencia de ésta, en una población control de 50 individuos por digestión con la enzima de restricción *NlaIII*. Para establecer esto se procedió como se explica en el punto 3.1.

La figura 7 muestra el resultado de la digestión, con la enzima *NlaIII*, del fragmento amplificado del exón 6 para 9 de los 50 individuos analizados. El patrón de bandas observado fue el mismo en los 50 individuos y corresponde a las bandas esperadas en ausencia de la transición C-T. En los carriles 2 al 10 se observa el patrón de digestión de 9 individuos controles.

Este resultado confirma que lo más probable es que la transición C-T en la primera posición del codón 161, no corresponda a un cambio polimórfico y represente una mutación, que está presente en el paciente B.23 y en su padre.

Se analizaron 50 individuos, es decir 100 cromosomas, ya que se define como polimorfismo aquel que está presente en una frecuencia de al menos 1%, en un total de 100 cromosomas.

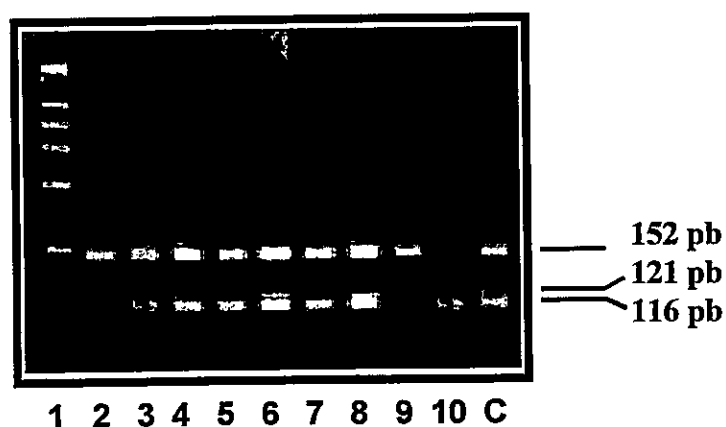


FIGURA 7. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL EXÓN 6 DIGERIDO CON LA ENZIMA *Nla* III, EN 50 INDIVIDUOS CONTROLES. 250 ng de la reacción de amplificación del exón 6, fueron utilizados para la digestión como se indica en Métodos VII. Los productos obtenidos de la digestión se resolvieron por electroforesis en gel de NuSieve-agarosa al 3% en tampón TBE, a 80 volts por 2 horas. Carril 1: estándar de tamaño molecular, el plasmidio pBR322 digerido con la enzima *Hinf* I; carriles 2 al 10: productos de digestión para 9 de los 50 individuos analizados; C: control positivo.

4. SECUENCIACIÓN DE LOS EXONES 2 AL 10 DEL GEN GHR EN LOS PACIENTES A.

Cinco pacientes (A1- A5), fueron seleccionados para ser secuenciados en todos los exones codificantes del gen del GHR, por presentar alguna de las características clínicas con una desviación estándar negativa considerable. Esto es, en los niveles del factor IGF-1 para los pacientes A.9 (-3.1 SD), A.11 (-2.9 DS) y A.14 (-3.3 DS), y en los niveles de la proteína IGFBP-3 para los pacientes A.14 (-3.2 DS), A.15 (-2.3 DS) y A.16 (-3.2 DS). Estos pacientes habían sido analizados previamente por la técnica de SSCP, sin encontrarse cambios en la migración de los conformómeros de simple hebra respecto a un control. Sin embargo como la técnica de SSCP sólo detecta entre el 70 y el 90% de las mutaciones resulta relevante realizar la secuenciación de los exones codificantes del gen GHR en estos individuos. La secuenciación se realizó tal como se explica en la sección 6 de Métodos, para lo cual se amplificaron y purificaron previamente los exones 2 al 10 del gen GHR, para cada uno de los pacientes.

La secuenciación de estos fragmentos permitió determinar la presencia de dos cambios nucleotídicos. Uno de éstos corresponde a una transición A-G, ubicada en el codón 168 del exón 6. Este cambio nucleotídico no genera un cambio aminoacídico, ya que tanto el codón 168 normal (GGA) como el alterado (GGG) codifican para glicina. El segundo corresponde a una transversión C-A en el codón 526 del exón 10. Esta alteración genera un cambio aminoacídico de leucina, codificada por el codón normal 526 (CTC), por isoleucina, codificada por el codón alterado (ATC). Este cambio de aminoácido no presenta un cambio de polaridad ni de tipo estérico, puesto que el radical de leucina es un isobutilo y el de isoleucina un sec-butilo, lo que sugiere que se trataría de un polimorfismo. Efectivamente estos cambios

nucleotídicos están descritos en la literatura como polimorfismos de secuencia, que corresponden a alteraciones genéticamente neutras. En tabla 5 se detalla el polimorfismo encontrado en cada paciente secuenciado. Los 5 pacientes son homocigotos para el polimorfismo G168 del exón 6, mientras que para el polimorfismo L526, 4 individuos son heterocigotos y uno presenta el codón normal.

El fragmento c del exón 10 fue secuenciado además en el resto de los pacientes nuevos (B) para establecer cual era el polimorfismo presente y ver si este representaba los cambios observados en la migración de ciertas bandas, en el análisis por SSCP. Debido a que el polimorfismo del exón 6 no es detectado por SSCP, este exón también fue secuenciado en los pacientes nuevos del estudio. Cabe destacar que el polimorfismo del exón 10 no fue detectado en forma clara y reproducible, en el análisis por SSCP. Los polimorfismos detectados en los exones 6 y 10 para los pacientes B se encuentran resumidos en la tabla 5. Todos los pacientes B, excepto el paciente B.22, que presentó el polimorfismo en estado heterocigoto, resultaron ser homocigotos para el polimorfismo G168. Respecto al polimorfismo L526, cinco pacientes (B.20, B.21, B.25, B.27, B.29) lo presentaron en estado heterocigoto y dos (B.28 y B.22) lo presentaron en estado homocigoto.

El resto de la secuencia del gen GHR arrojó resultados negativos respecto a la presencia de posibles mutaciones, ya sea en las regiones codificantes como en las zonas de unión intrón-exón, involucradas con el procesamiento del mRNA.

PACIENTE	EXÓN 6 (CODÓN 168)	EXÓN 10 (CODÓN 526)
A.9	G	C/A
A.11	G	C/A
A.14	G	C/A
A.15	G	A
A.16	G	C/A
B.20	G	C/A
B.21	G	C/A
B.22	A/G	A
B.23	G	C
B.24	G	C
B.25	G	C/A
B.27	G	C/A
B.28	G	A
B.29	G	C/A

TABLA 5. POLIMORFISMOS DE SECUENCIA NUCLEOTÍDICA EN LOS EXONES 6 Y 10 PARA LOS PACIENTES A Y B. Resumen de los cambios polimórficos encontrados en exones 6 y 10 del gen GHR en los 5 pacientes secuenciados en los exones codificantes del gen GHR y en los pacientes B. En el codón 168 el cambio corresponde a una transición de A-G y en el codón 526 el cambio es una transversión de C-A.

DISCUSIÓN

Esta tesis realizó el estudio molecular del gen GHR en 14 pacientes que presentaban talla baja idiopática, con el propósito de establecer si mutaciones heterocigotas en este gen fuesen las causantes de una insensibilidad parcial a GH.

Los resultados obtenidos en el análisis por la técnica de SSCP y secuenciación de los exones codificantes 2 al 10 del gen GHR en los pacientes A y B, reveló la presencia de una mutación puntual en el exón 6 y dos cambios polimórficos en los exones 6 y 10.

En los pacientes B, el análisis por SSCP de los exones 2 al 10 del gen GHR reveló sólo la presencia de una alteración en el patrón de migración de un conformómero respecto al control, en el exón 6. Los demás exones analizados en el resto de los pacientes no presentaron diferencias en la migración de los conformómeros respecto al control. Es importante destacar que la técnica de SSCP no posee el 100% de sensibilidad y por lo tanto existe la posibilidad de que algunas mutaciones no hayan sido detectadas.

En el resultado de la electroforesis para el exón 6 se observó que el paciente B.23 presentó una banda que migraba más abajo respecto al control y los demás pacientes. La secuenciación de este fragmento en el paciente y sus padres, permitió determinar que el resultado obtenido por SSCP correspondía a un cambio nucleotídico consistente en una transición C-T en la primera base del codón 161 localizado en el exón 6. Esta transición provoca un cambio de arginina por cisteína en el codón 161, el cual está ubicado en el dominio extracelular del receptor. Esta transición fue encontrada en el padre y en el paciente en estado heterocigoto y estuvo ausente en la madre, quien no mostró cambios de secuencia en este exón:

La transición encontrada en el exón 6 generó la aparición de un nuevo sitio de restricción para la enzima *Nla III*. Esto permitió evaluar la presencia de la transición en 50 individuos controles de la población de Santiago mediante digestión del producto amplificado, con la enzima de restricción *Nla III*. Se encontró que esta mutación estaba ausente en todos los sujetos analizados, es decir en 100 cromosomas, descartándose la posibilidad de que se tratara de un cambio polimórfico. Por lo tanto, podemos decir que se encontró una mutación, que puede ser una posible causa de la insensibilidad parcial a GH manifestada en este paciente. Estos resultados confirman en parte lo postulado por Goddard y col., (1995) quienes fueron los primeros que sugirieron que mutaciones en el gen del GHR de individuos con talla baja idiopática, pueden afectar la función del receptor, generando una insensibilidad parcial a GH.

La mutación R161C se ubica en una región del dominio extracelular del receptor donde se encuentran 7 cisteínas, 6 de las cuales están formando puentes disulfuros en este dominio. Se intentó evaluar el efecto de esta mutación a través del programa de análisis de proteínas *Modeler*. Para ello se bajó la estructura cristalográfica del receptor de GH desde la base de datos de proteínas y se visualizó con el programa *Insight II* (Figura 8, estructura cristalográfica en amarillo). Posteriormente se destacó en celeste las cisteínas del dominio extracelular y en blanco y rojo la arginina 161 de ambas moléculas de GHBP. Luego se introdujo la mutación R161C en la secuencia de aminoácidos y se obtuvo el modelo cristalográfico, construido sobre la base del templado por el programa de proteínas *Modeler*. En el modelo cristalográfico resultante, en color verde, se observa que el residuo Cys161 es un aminoácido expuesto, ubicado en una vuelta β , que está distante del dominio de unión de la hormona de crecimiento con el receptor. Además por el análisis de distancia realizado resulta poco probable la

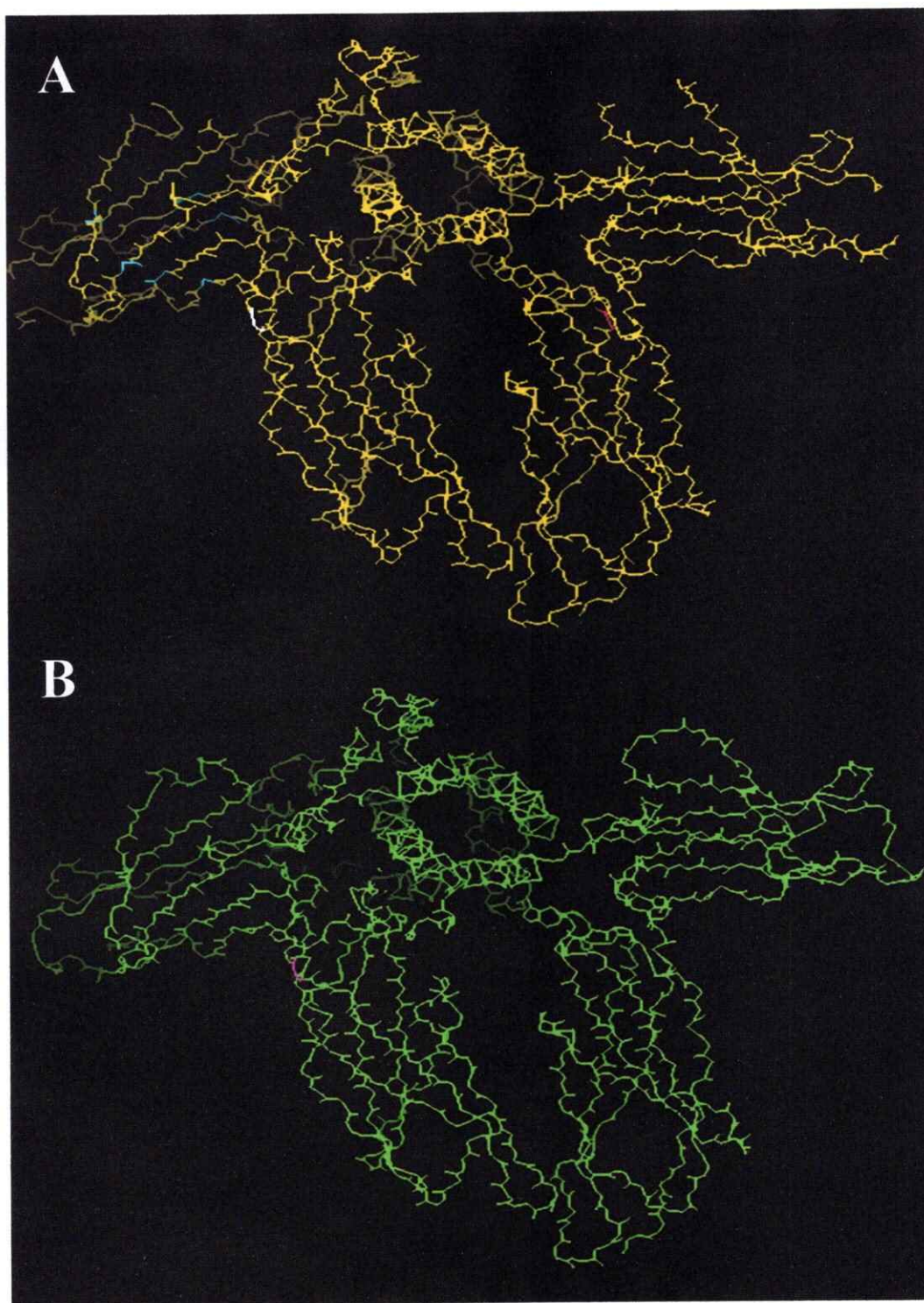


FIGURA 8. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DEL COMPLEJO GH-GHBP CON LA MUTACIÓN R161C. (A) Complejo GH-GHBP dimérica, visualizado en amarillo, por el programa de proteínas *Insight II*, destacan en celeste las 6 cisteínas de la GHBP de la izquierda, en blanco y rojo la arginina 161 de ambas GHBP respectivamente. (B) Estructura predicha del complejo GH-GHBP dimérica, por el programa *Modeler* en verde, destaca en rosado el residuo aminoacídico cisteína 161 de la GHBP de la izquierda.

posibilidad de formación de un enlace disulfuro con alguna de las otras cisteínas presentes en esta región, debido a que la distancia a la cisteína más cercana supera los 10 Å .

Sin embargo, es importante considerar que se está trabajando sólo con un modelo cristalográfico y no se puede descartar que esta mutación, que afecta un aminoácido conservado entre receptores relacionados, como sucede en el caso del receptor de GMCSF, si tenga un efecto importante ya sea en el plegamiento de la molécula o en la función del receptor.

La mutación R161C descrita en esta tesis en el paciente B.23, fue descrita previamente en estado homocigoto, en un paciente con retardo severo en el crecimiento y que presentaba Síndrome de Laron (*Amselem y col., 1993*). Además esta mutación fue descrita en un paciente con IGHS, en estado heterocigoto compuesto (R161C/ E44K) (*Goddard y col., 1995*). En este paciente, los autores indican que la mutación E44K, tendría un efecto más severo. Ellos estudian la afinidad del dominio extracelular del receptor expresado *in vitro*, tanto para la mutación E44K como para la mutación R161C. Se observó que la mutación R161C, reduce la afinidad de unión de la GH en un factor de sólo 2,1. Este efecto resulta ser bastante leve en comparación con la mutación E44K que reduce la afinidad de unión de GH al receptor, en un factor de 330. En estos estudios se usó la constante de disociación como medida de la afinidad del receptor por la GH. La constante de disociación fue determinada por estudios de competencia utilizando hGH marcada con ^{125}I como señal y un anticuerpo monoclonal Mab5, para precipitar los complejos hGH-GHBP.

Además se encontró esta mutación en otros tres pacientes más con baja estatura idiopática, y que la presentan en estado heterocigoto (*Goddard y col., 1997; Salerno M.C. y col., 2001*).

Los antecedentes anteriormente mencionados avalan que la mutación encontrada en el paciente B.23, si bien no afecta la afinidad de unión de la GH al dominio extracelular del receptor, según lo observado de experimentos realizados *in vitro*, esta podría estar provocando una modificación real, ya sea en el plegamiento de la molécula completa del receptor GHR, que si afecte la unión de la GH o una alteración a nivel de la región transmembrana que pudiera afectar el proceso de dimerización del receptor y la cascada de transducción de señal que se genera producto de este evento.

La mutación R161C, encontrada en esta tesis, ha sido descrita en individuos de distinto origen y composición genética, a diferencia de otras que ocurren con una baja frecuencia y que han sido descritas para uno o más individuos de una sola familia, o diferentes individuos que comparten un ancestro común. La frecuencia de ocurrencia de esta mutación, puede deberse a que esta ocurre en regiones llamadas "puntos calientes". Estas mutaciones, suceden producto de una desaminación de la 5-metil citosina a timidina, la cual ocurre preferencialmente en dinucleótidos CpG, causando transiciones de citosina a timina (*Cooper y col., 1989*). En este caso la mutación encontrada en el paciente B.23 ocurre en un islote CpG, lo que explicaría en parte, que la mutación R161C ocurra con una alta frecuencia. Este hecho podría indicar además, que la mutación R161C ha ocurrido en forma independiente.

Cabe destacar que el padre del paciente 23 presenta una estatura normal a pesar de que ambos comparten la misma mutación presente en estado heterocigoto. Una situación similar ha sido observada en otros pacientes con ISS y también en familiares de individuos afectados con Síndrome de Laron, quienes presentan mutaciones en el gen GHR en estado heterocigoto. En estos casos lo más probable es que la composición genética del individuo logre compensar,

por ejemplo, con otras mutaciones de ganancia de función, la mutación que esta afectando la molécula del GHR.

Por otra parte, los pacientes A tenían una mayor probabilidad de presentar mutaciones en el gen GHR, por exhibir una talla bajo las $-2,5$ DS respecto al promedio para la edad y sexo, niveles de GH sobre los 10ng/ml en respuesta a pruebas de estímulo farmacológico, en conjunto con bajos niveles de IGF-1 y/o de IGFBP-3. Por este motivo se analizaron por secuenciación los exones codificantes 2 al 10 del gen GHR en cada uno de estos pacientes. En ellos se determinó la presencia de dos polimorfismos. Una transición A-G en el codón 168, presente en los cinco pacientes en forma homocigota y el segundo, una transversión C-A en el codón 526 presente en forma homocigota en el paciente A.15 y en estado heterocigoto en el resto de los pacientes A. Estos cambios nucleotídicos denominados polimorfismos, no modifican el marco de lectura y se encuentran tanto en pacientes como en individuos controles siendo alteraciones genéticamente neutras, ya que no todos los cambios nucleotídicos conducen a fenotipos clínicamente anómalos. Estos dos polimorfismos fueron descritos previamente por Rosenbloom y col., (1994) y no presentan ningún efecto ya sea en la función y/o unión del receptor a la hormona, lo que permite descartarlos como causa genética de la insensibilidad parcial a GH.

Aunque es común encontrar el polimorfismo G168 asociado con mutaciones en el exón 6 del gen GHR, es difícil establecer un efecto combinado entre este polimorfismo y mutaciones en el gen del GHR, ya que se carece de antecedentes que permitan asociar este polimorfismo con la baja estatura, así como también no existen antecedentes de sujetos con

baja estatura, heterocigotos para mutaciones en el gen GHR y que no presenten el polimorfismo G168.

Adicionalmente, la búsqueda de mutaciones mediante secuenciación de los exones codificantes, que se pudieran asociar con una insensibilidad parcial a GH arrojó resultados negativos. Las estaturas de estos pacientes estaban entre las -2.5 y -4.3 DS, los niveles de IGF-1 entre -2 y -3.4 DS y los niveles de IGFBP-3 entre -1.5 y -3.8 DS. En base a estas observaciones y los resultados obtenidos pueden proponerse otras causas responsables de la baja estatura. Puesto que la síntesis y secreción de estos dos factores (IGF-1 e IGFBP-3) depende de la función del receptor de GH y los exones codificantes del gen están libres de mutaciones, es posible que alguno de estos pacientes tenga alguna mutación en el gen GHR, no detectada. Esto ya sea por localizarse en regiones promotoras o en regiones no codificantes del gen, las cuales no fueron analizadas en este estudio debido a la complejidad y gran extensión en tamaño que éstas presentan. Otra explicación plausible es que en algunos de estos pacientes podrían existir otros defectos, tales como mutaciones en los genes que codifican para las proteínas involucradas en la vía de transducción de señales que conlleva a la síntesis y expresión del los factores IGF-1 e IGFBP-3.

Un defecto en la síntesis del factor IGF-1 fue propuesto por Laron y col. (1993), para explicar las características clínicas del Síndrome de Laron que presentaban dos hermanas árabes. Una unión aparentemente normal de GH a su receptor, en conjunto con concentraciones normales de GHBP e IGFBP-3. Por otra parte Freeth y col., (1997) propusieron un defecto en la transducción mediada por la unión de GH a su receptor, para explicar la baja estatura en 4 niños provenientes de dos familias pakistaníes no relacionadas. Estos pacientes presentaban niveles positivos de GHBP, con bajas concentraciones de IGF-1 e

IGFBP-3 y altas concentraciones plasmáticas de GH. No presentaban características fenotípicas de Síndrome de Laron, excepto por su baja estatura moderada. En uno de los niños se demostró *in vitro* una falla para activar la vía de transducción de señal mediada por GH.

Las causas genéticas de la baja estatura, continúan siendo indeterminadas en la mayoría de los casos. Aunque se han encontrado mutaciones que pueden ser las causantes de una insensibilidad parcial a la hormona de crecimiento, se observa que algunas mutaciones tienen un efecto más drástico en la estatura que otras y no está claro cuando mutaciones en el gen del GHR en estado heterocigoto, provocan un fenotipo clínicamente importante. Woods y col., (1997) concluyeron que el Síndrome de insensibilidad a GH presenta una amplia variabilidad en relación con la severidad de los fenotipos clínicos y bioquímicos. Un ejemplo de este fenómeno se describe en un estudio realizado por Iida y col., (1998), con una mutación que modifica un sitio de splicing en el intrón 9. Esta mutación está presente en estado heterocigoto en individuos de una familia con síndrome de Insensibilidad a GH, ejerciendo un efecto dominante negativo, sin embargo, el hijo presenta una talla baja mucho más severa que la madre, a pesar de que ambos comparten la misma mutación. Otro ejemplo es el mostrado en el trabajo de Woods y col., (1996) en donde se observa una gran variabilidad en las desviaciones estándar que presenta la estatura de individuos afectados con la misma mutación, pero que pertenecen a familias de diferentes regiones y orígenes étnicos. Claramente tal variación no sólo es debido a defectos en el gen GHR, sino que también pueden contribuir al fenotipo GHIS otros factores genéticos y/o ambientales.

De este modo sólo un reducido porcentaje de niños con talla baja están bien caracterizados por defectos genéticos que contribuyen a una falla en el crecimiento, sin

embargo, es importante considerar que existen otros factores que pueden influenciar el efecto biológico de una mutación sobre el crecimiento lineal y la estatura adulta.

Por otra parte la presencia de mutaciones en estado homocigoto o heterocigoto en pacientes que manifiestan un síndrome de insensibilidad a GH, refleja que alteraciones genéticas que afectan regiones claves para el funcionamiento del receptor pueden causar un retardo severo en el crecimiento, aún cuando sólo afecten a uno de los alelos del gen.

Un alto porcentaje de las mutaciones descritas en el gen del GHR, se encuentran en el dominio extracelular del receptor, que corresponde al dominio de unión a la hormona, lo que explica la reducción en los niveles de la GHBP en el plasma de algunos pacientes. De este modo se entiende además, por qué en ciertos pacientes los niveles de GH están elevados, ya sea porque la hormona no interactúa con su proteína de unión GHBP debido a la presencia de mutaciones que alteran la afinidad de unión de la GHBP por GH o porque los niveles de la proteína GHBP están disminuidos en el plasma producto de alguna mutación en el receptor de GH.

Sin embargo, después de que se une la molécula de GH al receptor, éste debe dimerizar y aquí está el potencial para que alguna mutación altere la proteína normal y se observe un efecto dominante negativo. Es decir, una molécula de receptor anormal podría dimerizar con un receptor normal, alterando la transducción de la señal hormonal y resultando en una disminución de los factores IGF-1 y/o IGFBP-3.

Sería interesante llevar a cabo, experimentos posteriores para determinar el efecto real de la mutación R161C. Una posibilidad es la expresión de los alelos normal y mutado, en

células en cultivo, con la finalidad de analizar posibles defectos en el plegamiento y/o función del receptor de GH.

La relevancia de este estudio radica en que la caracterización de éste y otros alelos mutantes asociados a un síndrome de insensibilidad parcial a GH, permite la identificación de sitios que son críticos para la funcionalidad del receptor de GH, cuya alteración se traduce en una modificación en los niveles de expresión y secreción de los factores IGF-1 e IGFBP-3 relacionados con el crecimiento y desarrollo, entre otros.

La búsqueda de mutaciones en genes relacionados con enfermedades genéticas y su estudio molecular, además de contribuir al conocimiento científico de la funcionalidad de una molécula, permite lograr nuevos avances en las técnicas de diagnóstico de una enfermedad, así como también en las alternativas de tratamiento existentes, con la finalidad de apuntar hacia terapias óptimas para este tipo de pacientes.

CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos y los antecedentes discutidos, se concluye lo siguiente:

- 1) En los 5 pacientes, que se analizó el gen del GHR mediante secuenciación completa de las regiones codificantes, sólo se encontraron dos polimorfismos de secuencia, consistentes en una transición A- G en el codón 168 y una transversión C-A en el codón 526.
- 2) Tanto el polimorfismo en el codón 168 y como en el codón 526 han sido descritos previamente en la literatura, tanto en sujetos normales como en pacientes, motivo por el cual se descartan estos cambios nucleotídicos como causa genética de la insensibilidad parcial a GH presente en los pacientes.
- 3) En los 9 pacientes B analizados mediante la técnica de SSCP, sólo se encontró una mutación en el gen GHR. La mutación consiste en una transición C-T en la primera base del codón 161 y se encuentra en estado heterocigoto en el paciente B.23 y en su padre, generando el cambio aminoacídico R161C.
- 4) Teóricamente este cambio aminoacídico no provoca una modificación estructural visible en el plegamiento del dominio extracelular del receptor, según se observó en el modelo cristalográfico obtenido por el programa de proteínas *MODELER*.
- 5) Sin embargo esta mutación ha sido descrita previamente en dos pacientes con GHIS, en uno presente en estado homocigoto y en otro presente en estado heterocigoto compuesto. Además se ha descrito en otros 3 pacientes con talla baja idiopática, en estado heterocigoto, por lo que probablemente la mutación si tiene un efecto importante sobre la función o el plegamiento del receptor.

BIBLIOGRAFÍA

- Amit, T., Barkey, R., Youndim, M., Hochberg, Z., (1990): A New and Convenient Assay of Growth Hormone Binding Protein Activity in Human Serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 473-479.
- Amit, T., Bergman, T., Dastot, F., Youdim, M. B. H., Amselem, S., Hochberg, Z. (1997): A membrane-fixed, truncated isoform of the human growth hormone receptor. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82: 3813-3817.
- Amselem, S., Duquesnoy, P., Attree, O., Novelli, G., Bousnina, S., Postel-Vinay, M.-C., Goossens, M. (1989): Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene. *New Eng. J. Med.* 321: 989-995.
- Amselem, S., Sobrier, M.-L., Duquesnoy, P., Rappaport, R., Postel-Vinay, M.-C., Gourmelen, M., Dallapiccola, B., Goossens, M. (1991): Recurrent nonsense mutations in the growth hormone receptor from patients with Laron dwarfism. *J. Clin. Invest.* 87: 1098-1102.
- Amselem S, Duquesnoy P, Duriez B, Dastot F, Sobrier ML, Valleix S, Goossens M. (1993): Spectrum of growth hormone receptor mutations and associated haplotypes in Laron syndrome. *Hum Mol Genet.* 2:355-9.
- Ayling, R. M., Ross, R., Towner, P., Von Laue, S., Finidori, J., Moutoussamy, S., Buchanan, C. R., Clayton, P. E., Norman, M. R. (1997): A dominant-negative mutation of the growth hormone receptor causes familial short stature. (Letter) *Nature Genet.* 16: 13-14.
- Baumann, G. (1991): Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants and binding proteins. *Endocrine Reviews.* 12: 424-449.
- Baumann, G., y Mercado, M. (1993): Growth hormone-binding proteins in plasma. *Nutrition.* 9: 546-553.
- Baumann, G., Lowman, H., Mercado, M., Wells, J. (1994): The Stoichiometry of Growth Hormone-Binding Protein Complexes in Human Plasma: Comparison with Cell Surface Receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1113-1118.
- Baxter, R. C. (2000): Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278:E967-76.
- Berg, M. A., Guevara-Aguirre, J., Rosenbloom, A. L., Rosenfeld, R. G., Francke, U. (1992): Mutation creating a new splice site in the growth hormone receptor genes of 37 Ecuadorean patients with Laron syndrome. *Hum. Mutat.* 1: 24-34.

- Berg, M. A., Argente, J., Chernausk, S., Gracia, R., Guevara-Aguirre, J., Hopp, M., Perez-Jurado, L., Rosenbloom, A., Toledo, S. P. A., Francke, U. (1993): Diverse growth hormone receptor gene mutations in Laron syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 998-1005.
- Berg, M. A., Peoples, R., Perez Jurado, L., Guevara-Aguirre, J., Rosenbloom, A., Laron, Z., Milner, R. D., Francke, U. (1994): Receptor mutations and haplotypes in growth hormone deficiency: a global survey and identification of the ecuadorean E180 splice mutation in an oriental Jewish patient. *Acta Paediatr. Suppl.* 339:112-114.
- Carlsson, B., Eden, S., Nilsson, A., Ohlsson, C., Tornell, J., Vikman, K., Isaksson, O. G. P. (1991): Expression and physiological significance of growth hormone receptors and growth hormone binding protein in rat and in man. *Acta. Paediatr. Scand. Suppl* 379: 70-76.
- Carter-Su C., Schwartz J. (1996): Molecular mechanism of growth hormone action. *Ann. Rev. Physiol.* 58: 187-207.
- Casanueva, F. F. (1992): Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 21: 483-517.
- Conover, C. A. (1996): Regulation and physiological role of insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr J. Suppl.* 43:43-8.
- Conte F., Salles J.P., Raynal P., Fernández L., Molinas C., Tauber M., Bieth E.(2002): Identification of a region critical for proteolysis of the human growth hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 290:851-857.
- Cooper, D. N., Krawczak, M. (1989): Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum. Genet.* 83:181-188.
- Davis, S., Graf, M., Morrison, A., Hall, T., Swift P., (1992): Identification and partial purification of serum growth hormone binding protein in domestic animal Species. *J. Anim. Sci.* 70:773-780.
- Delehay-Zervas, M. C., Mertani, H. C., Martini, J. F., Nihoul-Fekete, C. Morel, G., Postel-Vinay, M. C., (1994): Expression of the growth hormone receptor gene in human digestive tissues. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 78: 1473-1480.
- DeNoto, F. M., Moore, D. D., Goodman, H. M. (1981): Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 9: 3719-3730.
- de Vos, A. M., Ultshch, M., Kossiakoff, A. A., (1992): Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: cristal structure of the complex. *Science.* 255: 306-312.
- Duquesnoy, P., Sobrier, M. L., Duriez, B., Dastot, F., Buchanan C. R., Savage, M. O., Preece, M. A., Craescu, C. T., Blouquit, Y., Goosens, M. (1994): A single amino acid substitution in the exoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor confers familial GH

resistance (Laron syndrome) with positive GH-binding activity by abolishing receptor homodimerization. *EMBO*. 13: 1386-1395.

Edens, A., y Talamantes, F. (1998): Alternative Processing of Growth Hormone Receptor Transcripts. 19(5): 559-582.

Ferry RJ Jr, Katz LE, Grimberg A, Cohen P, Weinzimer SA. (1999): Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Metab Res*. 31(2-3):192-202.

Freeth, J. S., Ayling, R. M., Whatmore, A. J., Towner, P., Price, D. A., Norman, M. R. (1997): Human skin fibroblasts as a model of growth hormone (GH) action in GH receptor-positive Laron's syndrome. *Endocrinology*. 138:55-61.

Freeth, J. S., Silva, C. M., Whatmore, A.J., Clayton, P. E. (1998): 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*. 139: 20-28.

Fuh, G., Mulkerrin, M. G., Bass, S., McFarland, N., Brochier, M., Bourell, J.H., Light, D. R., Wells, J. A., (1990): The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. *J Biol Chem*. 265(6):3111-5.

Guevara-Aguirre, J., Rsenbloom, A. L., Vaccarello, M. A., Fielder, P. J., dela Vega, A. Diamond F. B., Rosenfeld, R. G. (1991): Growth hormone receptor deficiency (Laron Syndrome): Clinical and genetic characteristics. *Acta. Paediatr. Suppl*. 377: 96-103.

Goddard, A. D., Covello, R., Luoh, S.-M., Clackson, T., Attie, K. M., Gesundheit, N., Rundle, A. C., Wells, J. A., Carlsson, L. M. S. (1995): Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. *New Eng. J. Med*. 333: 1093-1098.

Goddard, A. D., Dowd, P., Chernausek, S., Geffner, M., Gertner, J., Hintz, R., Hopwood, N., Kaplan, S., Plotnick, L., Rogol, A., Rosenfield, R., Saenger, P., Mauras, N., Hershkopf, R., Angulo, M., Attie, K. (1997): Partial growth -hormone insensitivity: The role of growth-hormone receptor mutations in idiopathic short stature. *The Journal of Pediatrics*. 131: S51-S55.

Godowski, P. J., Leung, D. W., Meacham, L. R., Galgani, J. P., Hellmiss, R., Keret, R., Rotwein, P. S., Parks, J. S., Laron, Z., Wood, W. I. (1989): Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 86: 8083-8087.

Goth, M.I., Lyons, C.E., Canny, B.J., Thorner, M.O., (1992): Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, growth hormone (GH)-releasing peptide and GH-releasing hormone stimulate GH release through distinct receptors. *Endocrinology*. 130: 939-944.

- Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H., Nose, O., Okimura, Y., Abe, H., Chihara, K. (1998): Growth hormone (GH) insensitivity syndrome with high serum GH-binding protein levels caused by a heterozygous splice site mutation of the GH receptor gene producing a lack of intracellular domain. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 531-537.
- Kaji, H., Nose, O., Tajiri, H., Takahashi, Y., Iida, K., Takahashi, T., Okimura, Y., Abe, H., Chihara, K. (1997): Novel compound heterozygous mutations of growth hormone (GH) receptor gene in a patient with GH insensitivity syndrome. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82: 3705-3709.
- Kostecka, Y., Blahovec, J. (1999): Insulin-like growth factor binding proteins and their functions (minireview). *Endocr Regul.* 33(2):90-4.
- Kou Kou, Lajara, R., Rotwein, P., (1993): Aminoacid substitutions in the intracellular part of the growth hormone receptor in a patient with the Laron Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 54-59.
- Lahiri, D., Nunberger, John, Jr., (1991): A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research.* 19: 5444.
- Laron, Z., Pertelan, A., Mannheimer, S. (1966): Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone. *Isr. J. Med. Sci.* 2: 152-155.
- Laron, Z., Klinger, B., Eshet, R., Kaneti, H., Karasik, A., Silbergeld, A. (1993): Laron syndrome due to a post-receptor defect: response to IGF-1 treatment. *Isr. J. Med. Sci.* 29:757-763.
- Leger, J., Noel, M., Czernichow, P., Postel-Vinay, M. C., (1995): Progressive normalización of growth hormone-binding protein and IGF-I levels in treated growth hormone deficient children. *Pediatric Res.* 37: 731-735.
- Leung, D. W., Spencer, S. A., Cachianes, G., Hammonds, R. G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Waters, M. J., Wood, W. I. (1987): Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature.* 330: 537-543.
- Mahoney, P. (1987): Evaluating the child short stature. *Paediatr. Clinics of N. A.* 34: 825-849.
- Meacham, L.R., Brown, M.R., Murphy, T.L., Keret, R., Silbergeld, A., Laron, Z., Parks, J.S. (1993): Characterization of a noncontiguous gene deletion of the growth hormone receptor in Laron's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 77(5):1379-83.
- Postel-Vinay, M. C. y Finidori. (1995): Growth hormone receptor; structure and signal transduction. *Eur. J. Endocrinol.* 133: 654-659.
- Phillips III, J. A. (1992): Molecular biology of growth hormone receptor dysfunction. *Acta Paediatr Suppl.* 383: 127-131.

- Ranke, M.B., Elmlinger, M., (1997): Functional role of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Res. Suppl.* 48: 4:9-15.
- Rosenbloom, A. L., Guevara-Aguirre, J., Rosenfeld, R. G., Pollock, B. H. (1994): Growth in growth hormone insensitivity. *Trends Endocrinol Metab.* 5: 296- 303.
- Rosenbloom, A. L. (1999): Growth hormone insensitivity: Physiologic and genetic basis, phenotype, and treatment. *J. Pediatr.* 135:280-289.
- Rosenfeld, R., Albertsson-Wikland, K., Cassorla, F. (1995): Diagnostic controversy: The diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 80: 1532-1540.
- Rosenfeld, R.G., Hwa, V., Wilson, L., Lopez-Bermejo, A., Buckway, C., Burren, C., Choi, W.K., Devi, G., Ingermann, A., Graham, D., Minniti, G., Spagnoli, A., Oh, Y. (1999): The insulin-like growth factor binding protein superfamily: new perspectives. *Pediatrics.* 104:1018-1021.
- Salerno M.C., Balestrieri B., Matrecano E., Officioso A., Rosenfeld R. G., Di Maio S., Fimiani G., Ursini V. M. and Pignata C.(2001): Abnormal GH receptor signaling in children with idiopathic short stature. *J. Clin. Endocr. Metab.*86:3882-3888.
- Sanchez, J. E., Perera, E., Baumbach, L., Cleveland, W. W. (1998): Growth hormone receptor mutations in children with idiopathic short stature. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 4079-4083.
- Savage, M. O., Blum, W. F., Ranke, M, (1993): Clinical features and endocrine status in patients with growth hormone insensitivity (Laron Syndrome). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 1465-1471.
- Spencer, S. A., Hammonds, R. G., Henzel, W. J., Rodriguez, H., Waters, M. J., Wood, W. I. (1988): Rabbit liver growth hormone receptor and serum binding protein: purification, characterization, and sequence. *J. Biol. Chem.* 263: 7862-7867.
- Stallings-Mann, M. L., Ludwiczak, R. L., Klinger, K. W., Rottman, F. (1996): Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 12394-12399.
- Sobrier, M.L., Dastot, F., Duquesnoy, P., Kandemir, N., Yordam, N., Goossens, M., Amselem, S. (1997): Nine novel growth hormone receptor gene mutations in patients with Laron syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 82 (2):435-7.
- Walker, J. L., Crock, P. A., Behncken, S. N., Rowlinson, S. W., Nicholson, L. M., Boulton, T. J. C., Waters, M. J. (1998): A novel mutation affecting the interdomain link region of the growth hormone receptor in a Vietnamese girl, and response to long-term treatment with

recombinant human insulin-like growth factor-I and luteinizing hormone-releasing hormone analogue. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 2554-2561.

Wojcik, J., Berg, M. A., Esposito, N., Geffner, M. E., Sakati, N., Reiter, E. O., Dower, S., Francke, U., Postel-Vinay, M.-C., Finidori, J. (1998): Four contiguous amino acid substitutions, identified in patients with Laron syndrome, differently affect the binding affinity and intracellular trafficking of the growth hormone receptor. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 4481-4489.

Woods, K. A., Fraser, N. C., Postel-Vinay, M.-C., Savage, M. O., Clark, A. J. L. (1996): A homozygous splice site mutation affecting the intracellular domain of the growth hormone (GH) receptor resulting in Laron syndrome with elevated GH-binding protein. *J. Clin. Endocr. Metab.* 81: 1686-1690.

Woods, K. A., Camacho-Hübner, C., Savage, M. O., Clark, A. J. L. (1996): Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of insulin-like growth factor I gene. *N. Engl. J. Med.* 335: 1363-1367.