

Notas clínicas

IDENTIFICATION OF THE P1 POLYMORPHISM IN THE *GH1* GENE IN TWO SIBLINGS WITH GROWTH HORMONE DEFICIENCY

Growth hormone (GH) deficiency has a prevalence of 1/4000-15000 and most cases are idiopathic. Recently, molecular modifications in the genes that regulate the somatotrophic axis have been described. Some of these modifications have been correlated with GH secretion and short stature. A particular modification is the polymorphism of intron 4 in the *GH1* gene named P1 (A or T at base 1663). Recent studies demonstrate that the frequency of allele A is significantly higher in patients with GH deficiency. Moreover, patients with the A/A genotype show a significantly lower GH peak after stimulation, lower IGF-I levels and shorter stature than individuals with the T/T genotype. We report the case of two siblings with isolated GH deficiency, diagnosed by auxological criteria as well as lower GH response to pharmacological stimuli. Both children showed P1 polymorphism. They also had homozygous -4 polymorphism (SNP rs6173) and one of them had heterozygous -68 polymorphism (SNP rs6171, chi-like element), although these alterations are not associated with abnormalities in GH secretion. Neither of them had the 6.7 kb deletion which affects the GH gene and which is the most frequent deletion in familial GH deficiency with phenotype IA. Both patients showed a good response to GH replacement therapy.

Key words: Growth hormone. Growth hormone deficiency. Polymorphism.

Identificación del polimorfismo P1 en el gen *GH1* en 2 hermanos con déficit de hormona del crecimiento

I. SERRANO^a, T. MARTÍN^a, C. QUINTEIRO^b, C. CAMPOS^a, R. FERNÁNDEZ^a, A. TORRES^a, M. DÍAZ^a y É. HERRERA^a

^aServicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Virgen Macarena. Sevilla. España ^bUnidad de Medicina Molecular (INGO). Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. La Coruña. España.

El déficit de hormona del crecimiento (GH) tiene una prevalencia de 1/4.000-15.000 habitantes y en la mayoría de los casos se trata de un déficit idiopático. En los últimos años se han identificado alteraciones moleculares en los genes que regulan el eje somatotrofo, algunas de las cuales se han relacionado con el estado secretorio de GH y con la talla. Ese es el caso del polimorfismo en el intrón 4 del gen *GH1* llamado P-1 (A o T en la base 1663). Recientes estudios demuestran que la frecuencia del alelo A es significativamente superior en los pacientes con déficit de GH. Además, los pacientes con genotipo A/A muestran un pico máximo de GH tras estímulos, valores de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y talla significativamente inferiores a los de los pacientes con genotipo T/T. Presentamos el caso de 2 hermanos diagnosticados de déficit aislado de GH tanto por criterios auxológicos como por la escasa respuesta de GH a estímulos farmacológicos. En ambos se identificó por estudio genético el polimorfismo P1 del intrón 4 del gen *GH1*, en uno en homocigosis y en otro en heterocigosis. También se identificó en ambos el polimorfismo 4 en homocigosis (SNP rs6173) y en uno de ellos el polimorfismo 68 (SNP rs6171, elemento Chi-like) en heterocigosis, si bien éstos no se asocian a ninguna anomalía en la secreción de GH. Ninguno de ellos presentó la delección de 6,7 kb, que engloba el gen *GH1*, que es la delección más frecuente en los déficit familiares de GH con fenotipo IA. En ambos casos se instauró un tratamiento sustitutivo con GH con buena respuesta al tratamiento.

Palabras clave: Hormona del crecimiento. Deficiencia de hormona del crecimiento. Polimorfismo.

INTRODUCCIÓN

El déficit aislado de hormona del crecimiento (GH) se estima que es familiar entre el 5 y el 30% de los casos^{1,2}. La delección del gen *GH1* es una de las causas genéticas más conocidas del déficit de GH³. En otros casos, aunque no se evidencian delecciones, existen mutaciones puntuales y polimorfismos en dicho gen en individuos con déficit de GH^{2,4}. Aunque estas mutaciones en el gen *GH1* se han observado tanto en pacientes con talla baja, con y sin déficit de GH, como en controles, la frecuencia es mucho mayor en los primeros⁵. Además del gen *GH1*, existen otros genes que regulan el eje somatotrofo, de los que también se han descrito alteraciones en humanos, como el gen del receptor de GHRH (7p15-

Correspondencia: Dr. I. Serrano Olmedo.
Avda. Concejil Alberto Jiménez Becerril, 10, 1.º 1.ª. 41009 Sevilla. España.

Manuscrito recibido el 15-10-2003; aceptado para su publicación el 1-03-2004.

p14)⁶, del *Pit 1* (factor transactivador que promueve el desarrollo de las células somatotropas [3p11])⁷, del receptor de la GH (5p13-p12)⁸, del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) (12q22-q24)⁹ y del receptor de IGF-I (15q26.1)¹⁰. En ocasiones se ha podido demostrar la relación existente entre estas alteraciones genéticas con la secreción de GH y talla, como es el caso del polimorfismo P1¹¹. Si bien la metodología necesaria para el estudio genético de estos pacientes no está al alcance de la mayoría de los centros, parece justificado, en los casos en que exista más de un miembro de la familia afectado o en los casos de déficit más grave, buscar una causa genética. A continuación se describen los casos de 2 hermanos diagnosticados de déficit aislado de GH.

CASOS CLÍNICOS

Caso 1

Varón de 6 años y 4 meses remitido para valoración por talla baja. Nacido tras embarazo y parto normales, pesó al nacer 3.100 g. Presenta antecedentes personales de enfermedades propias de la infancia, sin otras enfermedades de interés. Tiene antecedentes familiares de diabetes mellitus, con una talla diana familiar de 166,5 cm (P11, -1,2 desviaciones estándar [DE]). En la exploración destaca una talla de 103,5 cm (< P1, -2,4 DE), un peso 16,2 kg (PPC 95%), un estadio puberal Tanner I, con testes en bolsas de 1 ml, sin otros hallazgos de interés. Se realizan determinaciones analíticas de bioquímica general, hemograma, sedimento urinario y urocultivo; todos ellos normales. Los estudios hormonales de tiroxina (T_4) libre, tirotropina (TSH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculostimulante (FSH), sulfato de dihidroepiandrosterona (DHEAS) y testosterona son normales para su edad. Tanto los valores de IGF-I como la respuesta de GH a estímulos fueron patológicos: IGF-I 3 nmol/l (valores normales [VN]: 6-48); pico de GH tras hipoglucemia insulínica: 1,9 ng/ml, y pico de GH tras clonidina: 6,8 ng/ml. Las concentraciones de GH e IGF-I se determinaron en cada muestra por duplicado mediante IRMA, con técnica de doble anticuerpo (DSL-1900 ACTIVE® para GH, con una sensibilidad de 0,01 ng/ml y DSL-2800 ACTIVE® para IGF-I, con una sensibilidad de 2,06 ng/ml). Presentaba un retraso de edad ósea de unos 3 años respecto a la cronológica, y la resonancia magnética nuclear (RMN) de la silla turca informó de "adenohipófisis algo pequeña", sin otras alteraciones. La velocidad de crecimiento evaluada en posteriores revisiones fue claramente patológica: 3,6 cm/año (< P1, -2,6 DE). El paciente fue diagnosticado de déficit aislado de GH, e inició tratamiento sustitutivo con GH biosintética a dosis de 0,23 mg/kg/semana, con buena tolerancia. La velocidad de crecimiento, evaluada al año de tratamiento, fue de 8 cm/año (> P99, 2,9 DE).

Caso 2

Varón de 11 años, hermano del anterior, al que se estudia paralelamente por talla baja. Nacido tras embarazo normal con parto pretérmino, distócico; pesó al nacer 3.470 g y midió 49 cm. No tenía antecedentes personales de interés. Presentaba una talla de 127,8 cm (P < 1, -2,5 DE), un peso de

29,7 kg (PPC 116%) y estaba iniciando el desarrollo puberal (Tanner II), con testes en bolsas de 4 ml y vello pubiano en estadio P2. En la exploración física no se hallaron otros hallazgos patológicos. Se realizaron determinaciones analíticas de bioquímica general, hemograma, hormonas tiroideas, T_4 libre, TSH, LH y FSH, que fueron normales para su edad. El valor de IGF-I estuvo en los límites inferiores de la normalidad: 9 nmol/l (7-68). Los tests de estímulo para GH fueron patológicos: pico de GH tras hipoglucemia insulínica, 2,2 ng/ml, y pico de GH tras clonidina, 7,2 ng/ml. Las determinaciones hormonales se realizaron con las mismas técnicas que en el caso anterior. La edad ósea presentaba un retraso respecto a la cronológica de 27 meses. La RMN de cráneo fue normal en este caso. La velocidad de crecimiento evaluada posteriormente fue de 3,9 cm/año (P4, -1,47 DE). Fue diagnosticado de déficit aislado de GH y se instauró tratamiento sustitutivo con GH biosintética a dosis de 0,21 mg/kg/semana. La velocidad de crecimiento evaluada al año de tratamiento fue de 8 cm/año (P > 99, 3,5 DE).

Estudio genético

Partiendo de leucocitos de sangre periférica, se extrajo el ADN por métodos convencionales fenol-cloroformo. Mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de endonucleasas de restricción (SmaI), se descartó la delección de 6,7 kb que engloba al gen *GH1*³ en ambos casos. Posteriormente se realizó otra PCR específica para amplificar el gen *GH1*. Una vez comprobada la eficiencia de la PCR, los productos se sometieron a una secuenciación cíclica directa y bidireccional. Para ello se usó DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Los productos de secuencia fueron sometidos a electroforesis en el MegaBACE 1.000 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). En las secuencias analizadas se objetivaron los siguientes cambios: el polimorfismo P1 del intrón 4 (T > A) en homocigosis en el paciente 1 y en heterocigosis en el paciente 2. Este cambio se ha asociado con una menor secreción de GH¹¹. También encontramos otros 2 cambios que no se han asociado con ninguna anomalía: 4 (SNP rs6173) en homocigosis en ambos pacientes, y 68 (SNP rs6171) en heterocigosis en el paciente 2.

DISCUSIÓN

El gen de la GH está localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q22-24)¹², en un grupo de 5 genes: *GH1*, gen de la GH hipofisaria; *GH2*, gen de la GH placentaria, que codifica una variante de la GH (GH-V); *CSH1* y *CSH2*, que codifican las somatotropinas coriónicas, y *CSHP1*, que es un pseudogén (sufrir una mutación que afecta al proceso de corte y empalme de su ARNm). Los 5 genes tienen 5 exones y 4 intrones, y son marcadamente homólogos entre sí, de modo que entre ellos se dan fenómenos de conversión génica que dan lugar a polimorfismos¹³.

Se han descrito diferentes fenotipos de déficit aislado de GH familiar¹⁴⁻¹⁶. El IA se hereda de forma autosómica recesiva (AR) y cursa con ausencia de GH endógena. La base molecular suele ser una delección en homocigosis del gen *GH1*, más frecuentemente de 6,7 kb, aunque pueden ser de hasta 45 kb^{3,14,17}. Otras veces

son mutaciones del gen *GHI* (mutaciones sin sentido, mutaciones que alteran el procesamiento del ARNm, etc.)^{3,15,18}. Estos individuos tienen un retraso de crecimiento muy acusado y de aparición temprana, así como un fenotipo característico; es frecuente la hipoglucemia. Tienen riesgo de desarrollar anticuerpos contra la GH con el tratamiento sustitutivo³. El tipo IB se hereda de forma AR y cursa con valores disminuidos de GH. Se debe a mutaciones en el intrón 4 o deleciones de 2 bases en el exón 3, aunque en algunos casos se han descrito mutaciones en el gen del receptor de GHRH¹⁹. El tipo II es autosómico dominante (AD) y cursa con valores disminuidos de GH¹⁴⁻¹⁶. Se debe a mutaciones en un alelo en el intrón 3 del gen *GHI*, que provoca la pérdida del exón 3 dando lugar a una proteína truncada^{18,20-24}, aunque recientemente se han descrito otras mutaciones²⁵. La tipo III se hereda ligada al cromosoma X y cursa con valores disminuidos de GH, ya que en el cromosoma X hay varios *loci* capaces de regular la secreción de GH. Se han descrito también mutaciones en el gen *GHI* en pacientes con GH bioinactiva²⁶.

La deleción del gen *GHI* como causa de déficit grave de GH es bien conocida. Vnencak-Jones et al³ encontraron que el 29% de los pacientes con déficit de GH y talla inferior a -5 DE eran homocigotos para la deleción de *GHI*. Si, además, presentaban la clínica antes de los 6 meses de edad, este porcentaje se elevaba al 67%. Parks et al²⁷ encontraron deleciones en el gen *GHI* en el 56% de sus pacientes con déficit de GH y talla < -4 DE. En el subgrupo de pacientes con respuesta de GH a GHRH inferior a 4 ng/ml, este porcentaje era del 56%. Por tanto, la frecuencia de deleciones del gen *GHI* es mayor cuanto más grave es el déficit. Por su parte, Wagner et al² estudiaron la prevalencia no sólo de las deleciones, sino también de otras alteraciones genéticas en el déficit grave de GH, y encontraron que éstas dependían del fenotipo familiar y de factores geográficos. Así, la frecuencia de alteraciones genéticas detectadas en el gen *GHI* en familias con déficit familiar de GH tipo IA fue del 66,7% y del 9,9% en el resto. La frecuencia en pacientes del norte de Europa (11,6%) fue menor que en países mediterráneos (14,7%) y asiáticos (31,2%).

Giordano et al¹³ han descrito 12 haplotipos diferentes en la región promotor proximal 5' del gen *GHI*, una región con un inusual alto grado de variabilidad. Sin embargo, no se ha podido demostrar una diferencia significativa en la presentación de estos haplotipos entre pacientes con déficit de GH y los controles.

Por tanto, si bien se han demostrado diversas alteraciones genéticas en pacientes deficitarios de GH, pocas veces se ha demostrado la relación de éstas con la secreción de GH. Algunos trabajos han estudiado polimorfismos en el gen *GHI* asociados a la secreción de GH. Hasegawa et al¹¹ describieron el polimorfismo en el intrón 4 del gen *GHI*, que llamaron P1 (A o T en la base 1663) y lo asociaron con el estado secretor de GH. Estudiaron a pacientes prepuberales con talla

baja, con y sin déficit de GH, y a adultos normales. La frecuencia del alelo A era significativamente mayor en el grupo de déficit de GH que en el resto. Además, se estudiaron en los distintos genotipos 3 parámetros: pico máximo de GH en test de estímulo, IGF-I y talla. Los valores de los 3 parámetros fueron significativamente superiores en el genotipo T/T que en el A/A en niños bajos, con y sin déficit de GH. En el grupo de adultos normales también fueron superiores el IGF-I y la talla en el genotipo T/T pero sin significación estadística. En el grupo total, también la talla y el IGF-I fueron mayores en el genotipo T/T que en A/A, aunque sólo hubo significación estadística para IGF-I. P1 está asociado, a su vez, con otros 2 lugares polimórficos en la región promotor de *GHI* llamados P2 y P3. A o T en P1 se corresponden con T o G en P2, respectivamente. P2 se ha relacionado también con la secreción de GH. Por tanto, parece que estos polimorfismos en el gen *GHI* pueden determinar parcialmente la secreción de GH, quizá por un efecto transcripcional directo de P1 o por regulación de la transcripción en el promotor de *GHI* por P2 o P3¹¹.

En nuestros pacientes, aunque se descartó la deleción del gen *GHI* y no se encontraron mutaciones en la secuencia de dicho gen, se pudo demostrar en ambos el polimorfismo P1.

En uno de nuestros pacientes se detectó en heterocigosis un elemento *Chi-like*. La secuencia *Chi* (GCTGGTGG) es una secuencia bien caracterizada que promueve la recombinación en *E. coli* y bacteriófagos λ . En eucariotas, las secuencias *Chi-like* se observan con frecuencia cerca de segmentos que sufren recombinación y se asocian a posiciones más susceptibles de conversión génica¹³. Sin embargo, este polimorfismo no se ha asociado con alteraciones en la secreción de GH.

La conveniencia de realizar estudio genético de los genes relacionados con la síntesis de GH en un paciente con déficit dependería de la existencia de alguna de las siguientes circunstancias: más de un miembro de la familia afectado o consanguinidad; pacientes con grave retraso del crecimiento (talla < 3 DE, especialmente si es de comienzo temprano); déficit de GH que tenga o haya tenido episodios de hipoglucemias; respuesta a GH a estímulos < 2 ng/ml; cuando no respondan al factor liberador de GH; ante deficiencia de GH, TSH y prolactina; desarrollo de anticuerpos anti-hGH durante el tratamiento con GH, o déficit de GH que se asocie con otro síndrome con incidencia familiar²⁸.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vimpani GV, Vimpani AF, Ligard GP, Farquhar JW. Prevalence of severe growth hormone deficiency. *Br Med J* 1977;2:427-30.
2. Wagner JK, Eble A, Hindmarsh PC, Mullis PE. Prevalence of human GH-1 gene alterations in patients with isolated growth hormone deficiency. *Pediatr Res* 1998;43:105-10.

3. Vnencak-Jones CL, Phillips JA III, De-Fen W. Use of polymerase chain reaction in detection of growth hormone gene deletions. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1550-3.
4. Leiberman E, Pesler D, Parvari R, Elbedour K, Abdul-Latif H, Brown MR, et al. Short stature in carriers of recessive mutation causing familial isolated growth hormone deficiency. *Am J Med Genet* 2000;90:188-92.
5. Millar DS, Lewis MD, Horan M, Newsway V, Easter TE, Gregory JW, et al. Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. *Hum Mutat* 2003;21:424-40.
6. Baumann G, Maheshwari H. The dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *Acta Paediatr* 1997;423(Suppl):33-8.
7. Ohta K, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Ohta T, Tohma T, Jinno Y, et al. Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1. *Genet* 1992;122:387-8.
8. Sánchez JE, Perera E, Baumbach L, Cleveland WW. Growth hormone receptor mutations in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4079-83.
9. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 1996;335:1363-7.
10. Roback EW, Barakat AJ, Dev GV, Mbikay M, Chretien M, Butler MG. An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1-qter) and loss of insulin-like growth factor I receptor gene. *Am J Med Genet* 1991;38:74-9.
11. Hasegawa Y, Fujii K, Yamada M, Igarashi Y, Tachibana K, Tanaka T, et al. Identification of novel human GH1 gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1290-5.
12. Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE, Seeburg PH. The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 1989;4:479-97.
13. Giordano M, Marchetti C, Chiorboli E, Bona G, Momigliano P. Evidence for gene conversion in the generation of extensive polymorphism in the promoter of the growth hormone gene. *Hum Genet* 1997;100:249-55.
14. Mullis PE, Deladoey J, Dannies PS. Molecular and cellular basis of isolated dominant-negative growth hormone deficiency, IGHD type II: insights on the secretory pathway of peptide hormones. *Horm Res* 2002;58:53-66.
15. Perez Jurado LA, Argente J. Molecular basis of familial growth hormone deficiency. *Horm Res* 1994;42:189-97.
16. Mullis PE, Deladoey J, Dannies PS. New GH-1 gene mutations: expanding the spectrum of causes of isolated growth hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15(Suppl 5):1301-10.
17. Perez Jurado LA, Argente J, Barrios V, Pozo J, Munoz MT, Hernandez M, et al. Molecular diagnosis and endocrine evaluation of a patient with a homozygous 7.0 kb deletion of the growth hormone (GH) gene cluster: response to biosynthetic GH therapy. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1997;10:185-90.
18. Kamijo T, Hayashi Y, Seo H, Ogawa M. Hereditary isolated growth hormone deficiency caused by GH1 gene mutations in Japanese patients. *Growth Horm IGF Res* 1999;9:31-4.
19. Salvatori R, Fan X, Phillips JA 3rd, Espigares-Martin R, Martin De Lara I, Freeman KL, et al. Three new mutations in the gene for the growth hormone (GH)-releasing hormone receptor in familial isolated GH deficiency type Ib. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:273-9.
20. Katsumata N, Matsuo S, Sato N, Tanaka T. A novel and de novo splice-donor site mutation in intron 3 of the GH-1 gene in a patient with isolated growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res* 2001;11:378-83.
21. Kamijo T, Hayashi Y, Shimatsu A, Kinoshita E, Yoshimoto M, Ogawa M, et al. Mutations in intron 3 of GH-1 gene associated with isolated GH deficiency type II in three Japanese families. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51:355-60.
22. Missarelli C, Herrera L, Mericq V, Carvallo P. Two different 5' splice site mutations in the growth hormone gene causing autosomal dominant growth hormone deficiency. *Hum Genet* 1997;101:113-7.
23. Takahashi I, Takahashi T, Komatsu M, Sato T, Takada G. An exonic mutation of the GH-1 gene causing familial isolated growth hormone deficiency type II. *Clin Genet* 2002;61:222-5.
24. Cogan JD, Phillips JA 3rd, Schenkman SS, Milner RD, Sakati N. Familial growth hormone deficiency: a model of dominant and recessive mutations affecting a monomeric protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1261-5.
25. Fofanova OV, Evgrafov OV, Polyakov AV, Poltaraus AB, Peterkova VA, Dedov II. A novel IVS2 -2A>T splicing mutation in the GH-1 gene in familial isolated growth hormone deficiency type II in the spectrum of other splicing mutations in the Russian population. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:820-6.
26. Takahashi Y, Kaji H, Okimura Y, Goji K, Abe H, Chihara K. Short stature caused by a mutant growth hormone. *New Engl J Med* 1996;334:432-6.
27. Parks JS, Meacham LR, McKean MC, Keret R, Josefsberg Z, Laron Z. Growth hormone (GH) gene deletion is the most common cause of severe GH deficiency among oriental Jewish children. *Pediatr Res* 1989;25:90A.
28. Domené HM, Martínez AS, Heinrich JJ. Deficiencia hereditaria de hormona de crecimiento. En: Pombo M, editor. *Tratado de endocrinología pediátrica*. Madrid: McGraw-Hill, 2002; p. 432-42.