

# DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO *GHRD3* EN PACIENTES VENEZOLANOS CON TALLA BAJA

Francisco Álvarez-Nava<sup>1</sup>, Roberto Lanes<sup>2</sup>, Henry Marcano<sup>3</sup>, Tatiana Pardo<sup>1</sup>, William Zabala<sup>1</sup>, José M. Quintero<sup>1</sup>, Mariela Paoli<sup>4</sup>, Peter Gunczler<sup>2</sup>, Nora Maulino<sup>3</sup>, Marvelys Pérez<sup>3</sup>, Karilé Méndez<sup>1</sup>, Marisol Soto<sup>1</sup>, Ernesto Solís<sup>1</sup>, Joalice Villalobos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. <sup>2</sup>Unidad de Endocrinología Pediátrica. Hospital de Clínicas Caracas. Caracas, Venezuela. <sup>3</sup>Servicio de Endocrinología. Hospital de Niños "J.M. de Los Ríos". Caracas, Venezuela. <sup>4</sup>Unidad de Endocrinología, Departamento de Medicina, Universidad de Los Andes, Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. Mérida, Venezuela. <sup>5</sup>Servicio de Endocrinología. Hospital de Especialidades Pediátricas de Maracaibo. Maracaibo, Venezuela.

## RESUMEN

**Objetivos.** La delección (*GHRd3*) o inserción (*GHRfl*) del exón 3 es un polimorfismo común en el gen del receptor de la hormona de crecimiento (*GHR*) en los seres humanos. La presencia del alelo *GHRd3* se ha asociado con el grado de respuesta de terapia con Hormona de Crecimiento Recombinante Humana (rhGH). El objetivo de este estudio fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo en un grupo de 69 niños venezolanos con talla baja que estaban recibiendo rhGH.

**Métodos.** Se extrajo DNA a través de la técnica del método combinado Fenol/Sevag e Inorgánica. Se determinó el genotipo del exón 3 del gen *GHR* usando tanto PCR- monoplex como PCR-multiplex.

**Resultados.** Entre los pacientes con talla baja la frecuencia genotípica se distribuyó de la siguiente manera: *GHRfl/GHRfl* (55%) *GHRfl/GHRd3* (35%) y *GHRd3/GHRd3* (10%) y la frecuencia alélica fue de 0,27 para *GHRd3* y 0,73 para *GHRfl*. Para el grupo testigo la frecuencia genotípica se distribuyó así: *GHRfl/GHRfl* (56%), *GHRfl/GHRd3* (30%) y *GHRd3/GHRd3* (14%) y la frecuencia alélica era de 0,29 para *GHRd3* y 0,71 para *GHRfl*. Las características clínicas basales de los pacientes con talla baja eran similares entre los diferentes genotipos encontrados en el grupo de estudio.

**Conclusiones.** La proporción del genotipo y los alelos del gen *GHR* fueron similares entre el grupo testigo y los pacientes con talla baja, lo que traduce que la etiología de la talla baja no obedece a este polimorfismo.

**Palabras clave:** Deficiencia de Hormona de Crecimiento, Equilibrio de Hardy-Weinberg, Frecuencia Alélica y Genotípica, gen *GHR*, Polimorfismo, Talla Baja.

## ABSTRACT

**Objective.** The deletion (*GHRd3*) or insertion (*GHRfl*) of exon 3 is a common polymorphism in the receptor growth hormone gene (*GHR*) in humans. The presence of the allele *GHRd3* has been associated with the degree of responsiveness to therapy with recombinant human Growth Hormone (rhGH). The aim of this study was to determine the genotypic and allele frequencies of this polymorphism in a group of 69 Venezuelan children with short stature who were receiving rhGH.

**Methods.** Genomic DNA was extracted from blood lymphocytes using combined method Fenol/SEVAG + Salting out. The *GHR*-exon 3 was genotyped using both PCR monoplex and multiplex assays.

**Results.** Among patients with short stature, genotype frequency was distributed as follows: *GHRfl/GHRfl* (55%), *GHRfl/GHRd3* (35%) and *GHRd3/GHRd3* (10%) and allele frequency for *GHRd3* and *GHRfl* was 0.27 and 0.73, respectively. For the control group, genotype frequency was distributed as follows: *GHRfl/GHRfl* (56%), *GHRfl/GHRd3* (30%) and *GHRd3/GHRd3* (14%) and allele frequency for *GHRd3* and *GHRfl* was 0.29 and 0.71, respectively. The baseline clinical features of patients with short stature were similar among different genotypes found in the study group.

**Conclusions.** The proportion of genotype and allele of the *GHR* gene were similar between the control group and patients with short stature, which translates that the etiology of short stature is not due to this polymorphism.

**Key words:** Allele and Genotype Frequencies, *GHR* gene, Growth Hormone Deficiency, Hardy-Weinberg Equilibrium, Polymorphism, Short Stature.

Artículo recibido en: Noviembre 2008. Aceptado para publicación en: Diciembre 2008.

Dirigir correspondencia a: Francisco Álvarez-Nava. falvareznav@yahoo.com

## INTRODUCCIÓN

La Hormona de Crecimiento (GH) es el principal determinante del crecimiento postnatal. Es secretada por la adenohipofisis y actúa sobre las células dianas a través del receptor transmembrana propio de la GH conocido como Receptor de la GH (GHR). Éste es el responsable de todas las acciones de la GH. La unión GH-GHR conduce a la activación de la vía Janus kinases (JAK) and Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) (JAK-STAT) y el posterior incremento en la producción de al menos tres péptidos dependientes de la GH: el Factor Insulinoide Tipo I (IGF-I), la Proteína de Unión al IGF tipo 3 (IGFBP3) y la subunidad ácido-lábil. Estos tres péptidos se combinan para formar la principal forma circulante de IGF, la cual es llevada a las células dianas para unirse al receptor del IGF-I. De esta manera, la GH estimula indirectamente una cascada de eventos que conduce a la transcripción de genes blancos. Mutaciones en el gen *GHR* son las responsables del síndrome de Laron, una condición autosómica recesiva de talla baja severa debido a resistencia a la GH<sup>1-2</sup>. También se han descrito mutaciones en el gen *GHR* en pacientes con talla baja idiopática<sup>3</sup>. El gen *GHR* es un gen de copia única que se localiza en el brazo corto del cromosoma 5, más específicamente en 5p13.1-p12. Este gen contiene 90 kb e incluye 9 exones codificantes (numerados de 2 al 10) y varios exones no-codificantes que se empalman alternativamente ubicados en la región 5'-no-traducida<sup>4</sup>. El exón 2 codifica el péptido señal, los exones 3-7 codifican el dominio extramembrana, el exón 8 codifica el dominio transmembrana y los exones 9 y 10 codifican un dominio intracito-plasmático. Dos de las isoformas más comunes de *GHR* en humanos se generan por retención (*GHR-fl*) o exclusión (*GHR-d3*) del exón 3<sup>5</sup>. Estos alelos tienen una amplia distribución en el humano, con un rango de frecuencia de 68-75% para el alelo *GHR-fl* y 25-32% para *GHR-d3*<sup>6-7</sup>. El polimorfismo proteico codificado por el alelo *GHR-d3* produce la pérdida de los aminoácidos 7 al 28 y la sustitución A6D en el extremo N-terminal del dominio extracelular del receptor, el cual se conserva evolutivamente entre muchas especies de mamíferos. Por lo tanto, el alelo codificante *GHR-d3* es específico de los humanos<sup>2</sup>. La presencia de una sola copia del alelo *GHR-d3* parece ser suficiente para el crecimiento normal en la especie humana. Este

patrón evolutivo sugiere que la pérdida o retención del exón 3 puede afectar la expresión del receptor o su función, específicamente al afectar la unión con la GH, el procesamiento del receptor, su transporte, estabilidad, unión a otros ligandos, dimerización de monómeros de GHR o señal de traducción. Sin embargo, los residuos de aminoácidos desde 6 al 28 de la proteína GHR no se han podido modelar a través de estudios de cristalografía, por lo que se presume que estos residuos no participan directamente en la unión a la GH ya que estudios *in vitro* han encontrado que la afinidad a la GH por parte del GHR no está afectada por el polimorfismo del receptor<sup>8</sup>. Por el contrario, se ha especulado que esta región muy flexible del gen *GHR* puede jugar un papel fundamental en los cambios conformacionales durante la transactivación de los dímeros de GHR por parte de la GH. También, es posible que juegue un efecto sobre la transcripción génica, el empalme de RNA, la estabilidad proteica y la glicosilación así como el transporte a la membrana celular, etc.

El GHR es un receptor transmembrana que, en humanos, contiene 638 residuos de aminoácidos (incluyendo el péptido señal de membrana de 18 residuos) y consiste de un dominio extracelular de unión a hormonas de 246 aminoácidos, un dominio de transmembrana y un dominio intracito-plasmático de 350 aminoácidos<sup>2</sup>. Una vez unido a la GH, la molécula de GHR puede formar homodímeros que son esenciales para la activación del receptor, mediando, por lo tanto, los bien conocidos efectos de la GH. Después de la dimerización de las dos cadenas transmembranas para formar el *GHR* funcional, los individuos homocigotos tienen los homodímeros *GHR-fl* o *GHR-d3* en su superficie, mientras los heterocigotos tienen homodímeros de *GHR-fl*, homodímeros *GHR-d3* y heterodímeros de *GHR-fl*- *GHR-d3*<sup>5</sup>.

La terapia hormonal con GH recombinante humana (rhGH) es un tratamiento aprobado para varias entidades entre las que se incluyen pacientes con deficiencia de GH, talla baja idiopática, retardo del crecimiento intrauterino, y algunos trastornos genéticos como síndrome de Turner, síndrome de Noonan, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Silver-Russell, etc. El tratamiento se basa en dosis estándares fijas calculadas por el peso o la superficie corporal del paciente. Existe una respuesta variable de esta terapia entre los pacientes sometidos a la

misma, la cual puede depender de varios factores entre los cuales cabe mencionar la duración del tratamiento, la talla al comienzo del tratamiento, el retardo en la edad ósea, la talla al inicio de la pubertad, la talla media parental, la velocidad del crecimiento en el primer año del tratamiento, edad al comienzo del tratamiento, y el pico máximo de GH a las pruebas de estimulación, etc<sup>9-12</sup>. Sin embargo estos factores explican solo parcialmente la variabilidad interindividual a la respuesta a la rhGH, lo que implica que factores de tipo genético involucrados en la acción de la GH pueden tener un efecto en esta variabilidad, independiente de los factores ya mencionados. Ya que la GH actúa a través del GHR, es concebible que polimorfismos en la proteína GHR codificados por variantes alélicas en el gen *GHR*, puedan afectar la respuesta a la rhGH exógena en niños deficientes o no-deficientes de GH, y esto podría abrir nuevas perspectivas en el campo de la farmacogenética. Recientemente, se ha reportado una asociación entre el genotipo *GHR-d3* con una mejor respuesta a altas dosis de rhGH en niños con talla baja debido a retardo del crecimiento intrauterino o talla baja idiopática<sup>8</sup>. En ese estudio la respuesta a rhGH se midió a través de la velocidad de crecimiento durante el primer y segundo año de tratamiento. Los niños que tenían uno o dos alelos *GHR-d3* mostraban una respuesta mayor hasta el 75% en la velocidad de crecimiento en comparación con los niños que tenían el alelo *GHR-fl*. Estudios *in vitro* usando fibroblastos HEK co-transfectados con elemento de respuesta lactogénico (LHRE) y los genes *GHRfl* y *GHRd3* y utilizando, además, la actividad de la luciferasa como sistema reportero se encontró una bioactividad mayor *in vitro* de *GHR-d3* con respecto a *GHR-fl*<sup>8</sup>. Estos hallazgos farmacogenéticos sobre el eje de la GH tienen el potencial de promover una base para la individualización racional de la terapia con rhGH. Otros estudios han replicado estos hallazgos en pacientes con deficiencia severa de GH<sup>12</sup>, en sujetos con síndrome de Turner y con retardo de crecimiento intrauterino<sup>13</sup>. Sin embargo, como se han reportado hallazgos contradictorios en la respuesta a la rhGH en pacientes con talla baja y su asociación con el genotipo *GHR*<sup>14-17</sup>, así como también a una gran variabilidad en la frecuencia alélica de los polimorfismos *GHR-fl* y *GHR-d3* entre diferentes poblaciones<sup>7</sup>, se plantea la necesidad de estudiar

la respuesta de la rhGH en la población venezolana de pacientes deficientes y no deficientes de GH que reciben rhGH que porten estos polimorfismos. Para tal fin, se necesita establecer las frecuencias genotípicas y alélicas entre individuos sanos de talla normal y en pacientes con talla baja que reciben rhGH para sentar las bases para un estudio a mayor escala

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Individuos:** Este fue un estudio multicéntrico, analítico, retrospectivo, descriptivo, no intervencionista donde se estudiaron 69 pacientes con talla baja que estaban recibiendo rhGH, los cuales se identificaron previamente en la consulta de asesoramiento genético de la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia, Maracaibo; de la Unidad de Endocrinología Pediátrica del Hospital de Clínicas Caracas, del Servicio de Endocrinología del Hospital de Niños "J.M. de Los Ríos", de la Unidad de Endocrinología del Hospital Universitario de Los Andes de la Universidad de Los Andes, Mérida y Servicio de Endocrinología, Hospital de Especialidades Pediátricas de Maracaibo, Venezuela. Los mismos incluyeron pacientes con diagnóstico de deficiencia aislada o combinada de GH, síndrome de Turner, talla baja idiopática, o con retardo del crecimiento intrauterino.

Para efectos de este trabajo se tomaron en cuenta las siguientes definiciones:

1. Se definió talla baja como una talla por debajo del percentil 3 para su edad y sexo según los datos de FUNDACREDESA para la población infantil venezolana.
2. Se consideró como síndrome de Turner a la ausencia del segundo cromosoma sexual o alteración estructural en el mismo aunado a características propias del trastorno (estigmas turnerianos + talla baja).
3. Se consideró como retardo del crecimiento intrauterino como una talla al nacer por debajo de dos desviaciones estándares.
4. Se definió como deficiencia de GH a la presencia de niveles de GH por debajo de 10 ng/ml por dos valoraciones farmacológicas.
5. Se definió como talla baja idiopática a la presencia de talla baja sin una causa evidente de la misma. Éste fue un diagnóstico de exclusión después de haberse realizados los estudios señalados en los criterios de exclusión (ítem 5).

Los criterios de exclusión fueron:

1. Edad menor de 3 años y mayor de 14 años.
2. Presencia de pubertad antes o durante el primer año de tratamiento indicado por telarquia en las niñas y un volumen testicular > de 3 ml.
3. Los pacientes no debieron haber recibido terapia combinada (GH + otros fármacos inductores del crecimiento).
4. Las pacientes con síndrome de Turner y aquellos con baja talla por retardo del crecimiento intrauterino o talla baja idiopática debieron haber tenido un valor mayor de 10 ng/ml a través de dos pruebas farmacológicas de concentraciones de GH para descartar deficiencia de GH.
5. Presencia de anomalías en los siguientes parámetros: cariotipo (excepto para síndrome de Turner), ecocardiograma, pruebas de funcionalismo renal, etc.

Se analizaron las variables clínicas antes del inicio del tratamiento en 69 niños prepúberes de los cuales 36 pacientes tenían deficiencia de GH (21 niños y 15 niñas) y 22 eran pacientes con síndrome de Turner. El resto de los pacientes (n=11) estaban agrupados en los otros diagnósticos. Los pacientes con deficiencia de GH al comienzo del tratamiento tenían una edad cronológica de  $8.91 \pm 4.2$  años, edad ósea de  $5.2 \pm 3.1$ . Veintitrés pacientes presentaron deficiencia aislada de GH y 13 deficiencia combinada. En las pacientes con síndrome de Turner la edad cronológica era de  $9.1 \pm 5.3$  años y la edad ósea de  $6.2 \pm 5.1$  años.

El grupo testigo estaba conformado por 50 individuos venezolanos sanos con talla normal sin antecedentes familiares de talla baja seleccionados a partir de la cohorte de estudiantes del último bienio de la Escuela de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

**Análisis molecular:** Se tomaron 5 ml de una muestra de sangre total por venipunción por cada individuo y se recolectaron en un tubo de propileno impregnado con EDTA disódico. Se extrajo el DNA por el método combinado Fenol/Sevag e Inorgánica (desarrollada en el laboratorio de Genética Molecular de la UGM-LUZ) y se confirmaron su integridad, verificación y calidad.

Para determinar el genotipo en el exón 3 del gen *GHR*, se realizó una prueba de PCR múltiple, usando los primers G1: 5'-TGTGCTGGTCTGTTGGTCTG-3'; G2: 5'-GTCGTTCTGGGA

CAGAGA-3' y G3 5'-CCTGGATTAACACTT TGCAGACTC-3' (número de acceso al GenBank: AF155912). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos que consistió 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, y un minuto a 72°C seguidos de un período de extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis sobre geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Se calcularon las frecuencias alélicas en un grupo testigo de 50 individuos adultos sanos con talla normal para saber si estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg y se compararon con la frecuencias alélicas en los diferentes subgrupos de estudio.

**Análisis estadístico:** Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias y porcentajes, mientras que las variables cuantitativas se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Los pacientes se agruparon por diagnóstico y a su vez se subclasificaron por la presencia de los polimorfismos *GHRd3* o *GHRfl* para de esta manera comparar las características clínicas basales entre los diferentes genotipos a través test no pareados de *t* de Student para variables continuas (edad, edad ósea, puntuación de Desviación Estándar (SDS) de la talla corregida por talla de los padres, talla al comienzo del tratamiento, donde será considerado como significativo, un valor de  $p < 0,05$ .

Se calculó el Equilibrio de Hardy-Weinberg de acuerdo con el procedimiento estándar utilizando el análisis de  $\chi^2$ . Se analizaron las diferencias de las frecuencias de genotipo *GHRd3/fl* entre los grupos por la prueba  $\chi^2$ .

## RESULTADOS

Se encontró cierta inexactitud en el momento de la asignación del genotipo con la técnica de PCR múltiple competitiva descrita por Pantel et al (1995) con los genotipos homocigotos y heterocigotos *d3*, siendo re-asignado después de una segunda PCR a *fl* (Figuras 1 y 2). Por lo tanto, cuando se detectó un genotipo *d3/d3* correspondiente a una banda de 532 pb y/o cuando se detectó una banda que potencialmente correspondía a 935 pb levemente amplificada, se hizo una nueva amplificación de PCR usando solamente los primeros G1 y G3 (PCR monoplex).

En la Tabla I se muestran las frecuencias

genotípicas y alélicas del grupo de estudio incluyendo todos los diagnósticos (deficiencia de GH, síndrome de Turner, talla baja idiopática, etc.). Entre los pacientes con deficiencia de GH, la distribución de los diferentes genotipos *GHR* fue de 17 (54,84%) para *fl/fl*; 11 (35,48%) para *fl/d3* y 3 (9,68%) para *d3/d3*. Las frecuencias alélicas de *fl* y *d3* fueron de 0,73 y 0,27, respectivamente. Estos porcentajes cumplen con la Ley de Hardy-Weinberg [LH-W:  $a^2 + 2ab + b^2 = 0,73^2 + 2(0,73 \times 0,27) + 0,27^2 = 1$ ]. La distribución de las frecuencias genotípicas en el grupo testigo fue de 28 (56%) para *fl/fl*; 15 (30%) para *fl/d3* y 7 (14%) para *d3/d3*. Las frecuencias alélicas de *fl* y *d3* fueron de 0,71 y 0,29, respectivamente. Se observó una proporción similar para los genotipos *GHRfl/GHRfl*, *GHRd3/GHRd3* y *GHRfl/GHRd3* entre el grupo de estudio y el grupo testigo.

Los niños con los genotipos *fl/d3* y *d3/d3* tenían características clínicas basales similares y debido a que estudios previos no han mostrado diferencias entre los pacientes heterocigotos y homocigotos para el alelo *d3*, se combinaron estos pacientes para un análisis posterior. Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre las características basales (talla, sexo, deficiencia aislada o combinada, edad cronológica, edad ósea, etc.) entre aquellos pacientes que tenían genotipo *fl/fl* y aquellos con al menos un alelo *d3* (*fl/d3+d3/d3*).

## DISCUSIÓN

El desarrollo de tecnologías de alto impacto para la evaluación de la expresión proteica (proteómica) o de genes (genómica) involucradas en el crecimiento abre las puertas para un mejor diagnóstico y manejo de los pacientes con trastornos del crecimiento. Nagalla y Rosenfeld han evaluado los patrones de expresión proteica en pacientes con deficiencia de GH (GHD) y con insensibilidad a la GH (GHI) resultantes de mutaciones en el gen *GHR* usando varias técnicas proteómicas, y han identificado patrones proteicos discriminatorios<sup>25</sup>. En estudios preliminares, pacientes con GHI o GHD pueden ser distinguidos de sujetos sanos con una certeza del 99% a través de la proteómica y los patrones proteicos de GHI y GHD pueden ser discriminados uno de otros con una certeza del 96%. Estas observaciones requieren una confirmación a gran escala, pero apoyan

fuertemente el valor diagnóstico de estas nuevas tecnologías<sup>25</sup>.

Por otra parte, la farmacogenética es el estudio de como los genes de una persona pueden influir en la respuesta a un medicamento. En la segunda mitad de siglo XX, vino a estar claro que la variación genética puede explicar porqué las personas responden de formas diferentes al mismo medicamento. Desde entonces, los progresos en la investigación de la farmacogenética han sugerido que hay un potencial real de trasladar estos hallazgos del laboratorio al cuidado y manejo del paciente<sup>26</sup>. Existen varios ejemplos de cómo los polimorfismos genéticos pueden influir en el resultado de la terapia<sup>27-28</sup>. En el presente, la constitución de un individuo está siendo explorada en un intento de predecir una mejor respuesta a la terapia con rhGH. A un nivel monogénico más simple, se sabe que mutaciones en el gen del receptor de la hormona liberadora de GH que produce una GHD severa responderá muy bien a la rhGH, mientras que un niño con mutaciones en el gen *GHR* (síndrome de insensibilidad congénita a la GH, síndrome de Laron) no lo hará. Sin embargo, estos genes pueden tener cambios en sus secuencias de DNA que no anulan completamente la generación o función de la proteína. Estos cambios son llamados polimorfismos. Un polimorfismo puede ser definido como una variante en la secuencia de DNA que ocurre al menos en el 1% de la población. Estos cambios en la secuencia del DNA de un gen no son suficientes para causar una enfermedad pero afectan la función de la proteína de tal manera que da origen a una variación natural. Un polimorfismo individual puede tener un impacto sobre una característica individual, pero más probablemente es el efecto sumatorio o aditivo de polimorfismos en varios genes que genera esta variación. Se han descrito polimorfismos en los exones 3, 6 y 10 del gen *GHR*<sup>3</sup>. Mientras que los polimorfismos en los exones 6 y 10 son clásicos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), el primero es un inusual polimorfismo genético consistente en la delección o retención de todo un exón. Este polimorfismo tiene una amplia distribución entre la especie humana.

Con la finalidad de comparar los pacientes estudiados con una población normal, se han analizado el genotipo *GHR* en las distintas poblaciones (Tabla I). La proporción de los alelos

**Tabla 1. Distribución de las Frecuencias Alélicas y Genotípicas del Polimorfismo *GHRd3* en Diferentes Poblaciones Estudiadas**

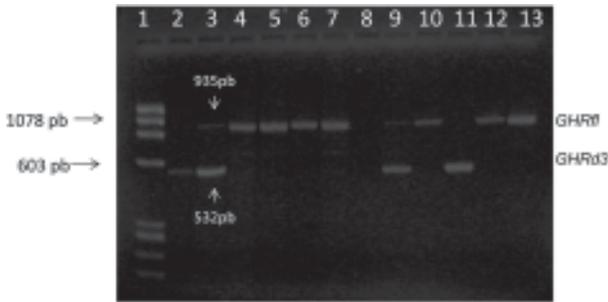
Número de Individuos	d3/d3 (n)	fl/d3 (n)	fl/fl (n)	Frecuencia Alélica <i>d3</i>	Frecuencia Genotípica <i>fl</i>	Referencia
150	9 (13)	33 (49)	58 (88)	0.25	0.75	6
289	15 (44)	58 (167)	27 (78)	0.44	0.56	7
62	15 (9)	40 (25)	45 (28)	0.35	0.65	13
46	11 (5)	50 (23)	39 (18)	0.36	0.64	18
82	41 (34)	11 (9)	48 (39)	0.47	0.53	19
158	17 (27)	42 (67)	41 (64)	0.38	0.61	20
193	8 (15)	41 (80)	51 (98)	0.28	0.72	21
368	11 (40)	36 (133)	53 (195)	0.29	0.71	22
211	8.5 (18)	43.6 (92)	47.9 (101)	0.3	0.7	23
175	17 (30)	30 (52)	53 (93)	0.32	0.68	24
50	14 (7)	30 (15)	56 (28)	0,29	0,71	Presente Estudio

*GHR-fl* y *GHR-d3* entre el grupo testigo fueron similares a las de las poblaciones caucásicas y latinoamericanas previamente reportadas en la literatura (Tabla 1)<sup>18-24</sup>. En la mayoría de los trabajos las frecuencias alélicas y genotípicas del grupo de estudio y el grupo testigo son similares, y la mayoría han alcanzado el equilibrio de Hardy-Weinberg. En el estudio de Seidel y cols (2003), las frecuencias genotípicas se desvían de lo esperado para el equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto parcialmente puede ser el resultado de las relaciones familiares en el seno del grupo de estudio<sup>18</sup>. Aunque, las frecuencias genotípicas han variado entre distintas poblaciones, éstas no alcanzan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos testigo y de estudio en cada uno de los trabajos publicados. La proporción de los alelos *GHR-fl* y *GHR-d3* entre el grupo testigo en el presente trabajo fue similar a las de las poblaciones caucásicas y latinoamericanas previamente reportadas en la literatura<sup>18-24</sup>. Además, la distribución de los diferentes genotipos *GHR* fue igual entre el grupo testigo y el grupo de estudio, cumpliendo ambos con la ley de Hardy-Weinberg. Esto podría traducirse que el polimorfismo *GHRd3* no está relacionado con la etiología de la talla baja en nuestros pacientes. Sin embargo, la influencia que este polimorfismo puede tener sobre la talla no está aún dilucidada. Audi y cols (2006) analizaron esta interrogante con mucha suspicacia<sup>7</sup>. Estos investigadores encontraron frecuencias genotípicas similares en ambos sexos, en la población total (n = 289), en el grupo más alto (talla  $\leq +2SD$  y  $> +1SD$ , n=59) y

el grupo de talla intermedia (talla  $\leq +1SD$  y  $\geq -1SD$ , n=170) pero en el grupo de talla más pequeña (talla  $d'' -1SDS$  y  $e'' -2SD$ , n=60), la frecuencia del genotipo *d3/d3* fue menor aunque no alcanzó significancia estadística. A pesar de que las frecuencias alélicas fueron similares en los tres grupos en el trabajo de Audí y cols. (2006), entre las frecuencias genotípicas sólo se alcanzó el equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo intermedio de talla, pero no en los más altos o los más pequeños<sup>7</sup>. Cabe señalar que las frecuencias alélicas y genotípicas reportadas por diferentes trabajos publicados no asocian éstas con los datos sobre la talla en los individuos analizados en el grupo testigo. Se ha reportado una inexactitud de la técnica original descrita por Pantel y cols.<sup>6</sup> para amplificar el alelo *fl*<sup>7, 29-30</sup>. Horan y cols. (2006) compararon la técnica de Pantel y cols.<sup>6</sup> con la técnica de PCR en tiempo real (RT-Q-PCR) y describieron un descenso del 30% en los genotipos *d3/d3* a través de la técnica RT-Q-PCR<sup>29</sup>. Tales hallazgos también fueron descritos más recientemente por Audí y cols. (2006) a través de la técnica de PCR convencional tanto en el grupo testigo como en los pacientes con talla baja y retardo del crecimiento intrauterino<sup>7</sup>. En el presente trabajo, hemos encontrado la misma inexactitud a través de la técnica PCR multiplex en el grupo testigo, y por tal motivo, hemos realizados PCR monoplex tanto en el grupo testigo como en el grupo de estudio (Figuras 1 y 2). Las frecuencias genotípicas y alélicas descritas en el presente trabajo son el producto de la caracterización de los alelos a través de esta última técnica por lo

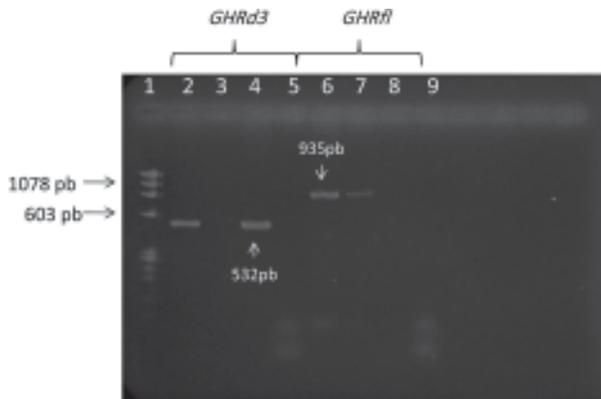
que recomendamos no practicar la técnica de PCR multiplex.

Aunque se han identificado mutaciones en los genes involucrados en el eje GH-IGF en pacientes con trastornos del desarrollo, en los actuales momentos la atención se está



**Fig. 1. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se aprecia reacción multiplex con las bandas *GHRfl* y *GHRd3*.**

(1) Marcador de peso molecular ÖX174 DNA/HaeIII. (2) Control *GHRd3/GHRd3*. (3) Control *GHRfl/GHRd3*. (4) Control *GHRfl/GHRfl*. (5) Paciente *GHRfl/GHRfl*. (6) paciente *GHRfl/GHRfl*. (7) Paciente *GHRfl/GHRfl*. (8) testigo negativo. (9) Paciente *GHRfl/GHRd3*. (10) Paciente *GHRfl/GHRfl*. (11) Paciente *GHRd3/GHRd3*. (12) Paciente *GHRfl/GHRfl*. (13) Paciente *GHRfl/GHRfl*.



**Fig. 2. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se aprecia reacciones monoplex con las bandas *GHRfl* y *GHRd3*.**

(1) Marcador de peso molecular Ö X174 DNA/HaeIII. (2 y 6): Paciente GHR-01. (3 y 7): paciente GRH-02. (4) Testigo negativo para *GHRd3*. (4 y 8): Paciente GHR-03. (9) Testigo Negativo para *GHRfl*. Paciente GHR-01 es *GHRfl/GHRd3*; Paciente GRH-02 es *GHRfl/GHRfl*. Paciente GRH-03 es *GHRd3/GHRd3*.

centrando en los polimorfismos de estos genes que podrían resultar en una expresión o función alterada. También polimorfismos en genes no relacionados con este eje [Short Stature Homeobox (*SHOX*)-containing gene<sup>31</sup>, fibroblast growth factor receptor (*FGFR-3*)<sup>32</sup>, the C-type natriuretic peptide receptor (*NPR2*)<sup>33</sup>], serán foco de atención y estudios. Por tal motivo, pediatras, nutricionista, endocrinó-

logos, genetistas y biólogos moleculares deberán unir esfuerzos para estar a la par con estos adelantos. La creación de un grupo de estudio transdisciplinario en Venezuela, comienza a dar sus frutos con la recolección y desarrollo de un banco de DNA para estar preparados a los nuevos retos de la medicina genómica.

En resumen, tanto la frecuencia genotípica como la frecuencia alélica en población venezolana normal como en el grupo de estudio se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg sin presentar diferencias significativas entre ambos grupos. Estos resultados son similares a los obtenidos en otras poblaciones. Así mismo, las características basales de los pacientes evaluados con talla baja no se asocian con ninguno de los genotipos estudiados en el gen *GHR*. Futuros trabajos son necesarios para relacionar este polimorfismo con la respuesta a corto y a largo plazo a la terapia con rhGH en pacientes venezolanos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Laron Z. Laron Syndrome (Primary Growth Hormone Resistance or Insensitivity): The Personal Experience 1958-2003. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1031-1044.
2. Pantel J, Grulich-Henn J, Bettendorf M, Strasburger CJ, Heinrich U, Amselem S. Heterozygous Nonsense Mutation in Exon 3 of the Growth Hormone Receptor (*GHR*) in Severe GH Insensitivity (Laron Syndrome) and the Issue of the Origin and Function of the *GHRd3* Isoform. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1705-1710.
3. Goddard AD, Covello R, Luoh SM, Clackson T, Attie KM, Gesundheit N, Rundle AC, Wells JA & Carlsson LM. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. The Growth Hormone Insensitivity Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333:1093-1098.
4. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. Molecular genetics of human growth hormone, insulin-like growth factors and their pathways in common disease. *Hum Genet* 2007; 122:1-21.
5. Yang N, Langenheim JF, Wang X, Jiang J, Chen WY, Frank SJ. Activation of Growth Hormone Receptors by Growth Hormone and Growth Hormone Antagonist Dimers: Insights into Receptor Triggering. *Mol Endocrinol* 2008; 22:978-88.
6. Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage

- of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem* 2000; 275:18664-18669
7. Audí L, Esteban C, Carrascosa A, Espadero R, Pérez-Arroyo A, Arjona R, Clemente M, Wollmann H, Fryklund L, Parodi LA; Spanish SGA Study Group. Exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism genotype frequencies in Spanish short small-for-gestational-age (SGA) children and adolescents (n = 247) and in an adult control population (n = 289) show increased fl/fl in short SGA. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:5038-5043.
  8. Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougnères P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nat Genet* 2004; 36:720-724.
  9. Ranke MB, Lindberg A, Chatelain P, Wilton P, Cutfield W, Albertsson-Wikland K, Price DA; KIGS International Board. Kabi International Growth Study Prediction of long-term response to recombinant human growth hormone in Turner syndrome: development and validation of mathematical models. KIGS International Board. Kabi International Growth Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4212-4218.
  10. Bakker B, Frane J, Anhalt H, Lippe B & Rosenfeld RG. Height velocity targets from the national cooperative growth study for first-year growth hormone responses in short children. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:352-357.
  11. Ranke MB, Lindberg A, Cowell CT, Wikland KA, Reiter EO, Wilton P, Price DA; KIGS International Board Prediction of response to growth hormone treatment in short children born small for gestational age: analysis of data from KIGS (Pharmacia International Growth Database). *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:125-131
  12. Jorge AA, Marchisotti FG, Montenegro LR, Carvalho LR, Mendonca BB, Arnhold IJ Growth Hormone (GH) Pharmacogenetics: Influence of GH Receptor Exon 3 Retention or Deletion on First-Year Growth Response and Final Height in Patients with Severe GH Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1076-1080.
  13. Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. The d3-growth hormone receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short SGA children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:659-664.
  14. Blum WF, Machinis K, Shavrikova EP, Keller A, Stobbe H, Pfaeffle RW, Amselem S. The growth response to growth hormone (GH) treatment in children with isolated GH deficiency is independent of the presence of the exon 3-minus isoform of the GH receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4171-4174.
  15. Pilotta A, Mella P, Filisetti M, Felappi B, Prandi E, Parrinello G, Notarangelo LD, Buzi F. Common Polymorphisms of the Growth Hormone (GH) Receptor Do Not Correlate with the Growth Response to Exogenous Recombinant Human GH in GH-Deficient Children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1178-1180.
  16. Schreiner F, Stutte S, Bartmann P, Gohlke B, Woelfle J. Association of the growth hormone receptor d3-variant and catch-up growth of preterm infants with birth weight of less than 1500 grams. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:4489-4493.
  17. Carrascosa A, Esteban C, Espadero R, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, Clemente MA, Audi L, Wollman H, Fryklund L, Parodi L & the Spanish Study Group. The d3- growth hormone receptor polymorphism does not influence the effect of GH treatment (66 mg/k per day) or the spontaneous growth in short non-GH-deficient small-for-gestational-age children: results from a two-year controlled prospective study in 179 Spanish patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3281-3286.
  18. Seidel B, Glasow A, Schutt M, Kiess W, Wu Z, Strasburger CJ, Kratzsch J. Association between the GH receptor/exon 3 genotype and the level of exon 3-positive GH-binding protein in human serum. *Eur J Endocrinol.* 2003; 148:317-24.
  19. Hujeirat Y, Hess O, Shalev S, Tenenbaum-Rakover Y. Growth hormone receptor sequence changes do not play a role in determining height in children with idiopathic short stature. *Horm Res* 2006; 65:210-216.
  20. Strawbridge RJ, Kärvestedt L, Li C, Efendic S, Östenson CG, Gu HF, Brismar K. GHR exon 3 polymorphism: Association with type 2 diabetes mellitus and metabolic disorder *Growth Horm IGF Res* 2007; 17:392-398.
  21. Tauber M, Ester W, Auriol F, Molinas C, Fauvel J, Caliebe J, Nugent T, Fryklund L, Ranke MB, Savage MO, Clark AJ, Johnston LB, Hokken-Koelega AC; NESTEGG group. GH responsiveness in a large multinational cohort of SGA children with short stature (NESTEGG) is related to the exon 3 GHR polymorphism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007; 67:457-461.
  22. Kenth G, Shao Z, Cole DE, Goodyer CG. Relationship of the human growth hormone receptor exon 3 genotype with final adult height and bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:725-728.
  23. Ráz B, Janner M, Petkovic V, Lochmatter D, Eblé A, Dattani MT, Hindmarsh PC, Flück CE, Mullis PE. Influence of growth hormone receptor d3- and full-length isoforms on growth hormone response and final height in patients with severe

- growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:974-980.
24. Mercado M, González B, Sandoval C, Esquenazi Y, Mier F, Vargas G, de los Monteros AL, Sosa E. Clinical and biochemical impact of the d3 growth hormone receptor genotype in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:3411-3415.
  25. Rosenfeld RG. Pharmacogenomics and pharmacoproteomics in the evaluation and management of short stature. *Eur J Endocrinol* 2007; 157:S27-S31.
  26. Clayton PE, Whatmore AJ. The Genomic Approach to Growth Prediction. *Horm Res* 2007; 67(suppl 1):10-15.
  27. Buzi F, Mella P, Pilotta A, Prandi E, Lanfranchi F, Carapella T. Growth hormone receptor polymorphisms. *Endocr Dev*. 2007; 11:28-35.
  28. Thomas FJ, McLeod HL, Watters JW. Pharmacogenomics: the influence of genomic variation on drug response. *Curr Top Med Chem*. 2004; 4:1399-409.
  29. Horan M, Newsway V, Yasmin, Lewis MD, Easter TE, Rees DA, Mahto A, Millar DS, Procter AM, Scanlon MF, Wilkinson IB, Hall IP, Wheatley A, Blakey J, Bath PM, Cockcroft JR, Krawczak M, Cooper DN. Genetic variation at the growth hormone (GH1) and growth hormone receptor (GHR) loci as a risk factor for hypertension and stroke. *Hum Genet*. 2006; 119:527-540.
  30. Carrascosa A, Audí L, Fernández-Cancio M, Esteban C, Andaluz P, Vilaró E, Clemente M, Yeste D, Albisu MA, Gussinyé M. The exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism did not influence growth response to growth hormone therapy over two years in prepubertal short children born at term with adequate weight and length for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:764-70.
  31. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL & Niesler B. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 2007; 44:306-313.
  32. Vajo Z, Francomano CA & Wilkin DJ. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev* 2000; 21:23-39.
  33. Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, Prickett TC, Espiner EA, Potter LR & Warman ML. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metabol* 2006; 91:1218-1219.

#### **AGRADECIMIENTO**

Este trabajo contó con el apoyo financiero del proyecto CONDES-LUZ No. 1038-06.