

El déficit de ALS en la talla baja idiopática

Horacio M. Domené

Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” (CEDIE) CONICET – FEI – División de Endocrinología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Buenos Aires (Argentina)

El diagnóstico de talla baja idiopática (TBI) constituye un diagnóstico de exclusión después que un examen físico exhaustivo y una evaluación bioquímica completa hayan podido descartar otras causas de baja estatura. Diferentes defectos moleculares han sido caracterizados en niños con TBI. La deficiencia completa de ALS (ACLSD), caracterizada por deficiencias severas de IGF-I, IGFBP-3 y ALS, resulta de mutaciones en el gen *IGFALS*. Casos menos severos de ACLSD, heterocigotos portadores de variantes en el gen *IGFALS*, podrían estar presentes en un subgrupo de niños con TBI. El estudio de 218 niños normales y 117 niños con TBI, mostró que las variantes no sinónimas fueron más frecuentes en los niños con TBI (15.5% vs. 4.8%; $P = 0.0039$). De los 16 niños con variantes no sinónimas, uno presentaba ACLSD (heterocigoto compuesto para p.Glu35Glyfs*17/p.Ser490Trp) y otros cinco presentaron ACLSD parcial (heterocigotos portadores para p.Glu35Glyfs*17, p.Arg277His, p.Pro287Leu, and 2 p.Arg548Trp). Una variante resultó en incapacidad completa de la síntesis de ALS (p.Glu35Glyfs*17) y otras dos en síntesis y secreción normales, pero a menores concentraciones (p.Ala330Asp, p.Arg548Trp). La ACLSD completa representa alrededor del 1%, y la ACLSD parcial alrededor del 5% de los niños con TBI, con variantes génicas en el gen *IGALS* de patogenicidad comprobada o a determinar. La identificación de la ACLSD parcial podría tener implicancias prácticas considerando que estos niños, a diferencia de los pacientes con ACLSD completa, retienen su capacidad de responder al tratamiento con GHRh. La efectividad del tratamiento requiere de un seguimiento prolongado hasta alcanzar la talla adulta.

Palabras clave: talla baja idiopática, IGF-I, IGFBP-3, ALS, resistencia a la GH.

Talla baja idiopática

Los trastornos del crecimiento constituyen una causa

frecuente de consulta en Pediatría. Una vez descartada la talla baja secundaria a enfermedades sistémicas no endocrinas, y causas endocrinas como el hipotiroidismo y el exceso de glucocorticoides, debe descartarse la deficiencia de GH (GHD). El diagnóstico de la GHD se realiza habitualmente evaluando los niveles de GH bajo pruebas de estímulo farmacológico y mediante la mediación del IGF-I y de su principal proteína de transporte, la IGFBP-3. Los niños en que no se ha podido caracterizar la causa de su talla baja y presentan una respuesta normal de GH a las pruebas de estímulo, son diagnosticados como talla baja idiopática (TBI). Se define a la TBI como aquella condición clínica que presenta una talla a más de 2 desvíos estándar (DE) por debajo de la media correspondiente para una determinada edad, sexo y estadio puberal de la población, en niños sin evidencias de enfermedades sistémicas, endocrinas, nutricionales, ni anomalías cromosómicas. Esta definición incluye niños con retraso constitucional del crecimiento y del desarrollo y la talla baja familiar^(1,2). El diagnóstico de TBI constituye básicamente un diagnóstico de exclusión después que una cuidadosa historia clínica, un examen físico exhaustivo y una evaluación bioquímica completa hayan podido descartar otras causas de baja estatura. Es evidente que, como ha sido recientemente discutido, el concepto de TBI es controversial, artificial, arbitrario y heterogéneo y probablemente muchos niños normales son clasificados como TBI⁽³⁾. No obstante, resulta evidente que detrás del diagnóstico de la TBI subyacen causas etiológicas no determinadas.

Defectos moleculares en la TBI

Diferentes defectos moleculares han sido caracterizados en niños con TBI. Mutaciones en heterocigocis en el gen que codifica para el receptor de GH (*GHR*) (4-8), mutaciones inactivantes en el gen que codifica para la GH (*GH1*) que resultan en GH bioinactiva (9, 10), mutaciones y deleciones en el gen *SHOX*⁽¹¹⁾,

mutaciones en homocigosis y en heterocigosis en el gen que codifica par el receptor del secretagogo de GH (*GHSR*)⁽¹²⁻¹⁴⁾, mutaciones heterocigotas en el gen que codifica para el receptor del péptido natriurético (*NPR2*)^(15, 16) y mutaciones heterocigotas en el gen *ACAN* que codifica para agregan, un proteoglicano componente de la matriz del cartílago^(17, 18).

Los niños con TBI son, por definición, suficientes de GH y en un porcentaje del 15 al 30% presentan niveles disminuidos de IGF-I^(19, 20). Si bien los niveles bajos de IGF-I pueden ser el resultado de los efectos nutricionales sobre la síntesis de IGF-I, es también posible que en un porcentaje de niños con TBI reflejen algún grado de insensibilidad a la acción de la GH⁽²¹⁾.

La subunidad ácido-lábil (ALS)

En el plasma y otros fluidos biológicos el IGF-I se encuentra formando complejos con proteínas transportadoras (IGFBPs) de las que se han descrito 6 diferentes (IGFBP-1 a IGFBP-6)⁽²²⁾. Estas proteínas incrementan la vida media de los IGFs y modulan la biodisponibilidad en los tejidos blanco. Alrededor del 80-90% del IGF-I se encuentra en la circulación en un complejo ternario de aproximadamente 150 kDa formado por IGF-I, IGFBP-3 o IGFBP-5 y una glicoproteína de aproximadamente 85 kDa conocida como subunidad ácido lábil (ALS)⁽²³⁾. Del 10-15 % del IGF-I circula como complejos binarios asociados mayoritariamente a IGFBP-1, -2 y -4, y no más del 1% lo hace en forma libre. La vida media en la circulación del IGF-I libre es de aproximadamente de 10 minutos, aumenta hasta 30-90 minutos en los complejos binarios y a más de 12 horas en los complejos ternarios⁽²⁴⁾. El IGF-I libre y aquel presente en los complejos binarios puede atravesar el endotelio vascular para alcanzar los tejidos blancos. Por el contrario, los complejos ternarios están restringidos a la circulación y son los responsables de mantener altos niveles circulantes de IGF-I. La acción de la ALS es determinante en la formación de estos complejos, protegiendo a las IGFBPs de la acción de las proteasas.

La ALS es una glicoproteína que se encuentra en la circulación y otros fluidos corporales. Su síntesis se realiza principalmente en el hígado y se encuentra bajo el control estimulador de la GH (25, 26). Se ha observado, tanto en animales de experimentación como en humanos, que los niveles de ALS son muy bajos al nacimiento, aumentando en forma sustancial a medida que se incrementa la síntesis hepática de la misma debido a la mayor capacidad de respuesta a la GH por un incremento en la expresión de los receptores hepáticos a la GH^(27, 28). Al momento de la pubertad se encuentran los niveles máximos de ALS, alcanzándose concomitantemente los niveles más elevados de complejos ternarios⁽²⁹⁾.

Deficiencia de ALS (ACLS)

En el año 2004 tuvimos la oportunidad de caracterizar el primer paciente con deficiencia completa de ALS (ACLS, OMIM #615961) resultante de una mutación inactivante en homocigosis en el gen *IGFALS* (30). La ACLS se caracteriza por deficiencias severas de IGF-I e IGFBP-3, con niveles de ALS no detectables o cerca del límite de detección. Estos parámetros no aumentan significativamente durante el tratamiento agudo o crónico con GH recombinante humana (GHRh). El aspecto más remarcable de esta alteración es la falta de correlación entre la deficiencia de IGF-I e IGFBP-3 y el retraso de crecimiento. Mientras que en otros síndromes de insensibilidad a la GH, por defectos en el receptor de GH (31) o por problemas post receptor, como en la deficiencia de STAT5b⁽³²⁾ la severidad del retraso de crecimiento se correlaciona con la severidad de la deficiencia de IGF-I e IGFBP-3, esto no ocurre en la deficiencia de ALS, donde el retraso de crecimiento es leve o moderado. Un retraso en el inicio puberal y un lento progreso de la misma ha sido reportado en aproximadamente el 50% de los pacientes varones⁽³³⁾.

Resulta interesante resaltar que los portadores heterocigotos para variantes patogénicas en el gen *IGFALS*, familiares de primer grado de pacientes con ACLS, son frecuentemente más bajos que sus familiares no mutados (34), presentando niveles de IGF-I e IGFBP-3 intermedios entre los pacientes con ACLS y sus familiares no mutados (35). En consecuencia, resulta probable que casos menos severos de ACLS, ya sea heterocigotos portadores de mutaciones en el gen *IGFALS* o presentando variantes génicas con preservación de la expresión de ALS en ambos alelos del gen *IGFALS* puedan estar presentes en un subgrupo de niños con TBI, particularmente en aquellos que presenten niveles disminuidos de IGF-I y de IGFBP-3.

Variantes en el gen *IGFALS* en la TBI

Para determinar la frecuencia de las variantes génicas en el gen *IGFALS* estudiamos este gen en niños normales y con TBI⁽³⁶⁾. En un primer estudio se reclutaron 188 niños entre 5.0 y 17.5 años con estatura comprendida entre -1.96 y 2.0 desvíos estándar (DE) de la media para la población Argentina y 79 niños con TBI, con edades entre los 4.8 y los 17.4 años y estatura comprendida entre -2.0 y -4.6 DE. Los niveles de IGF-I, IGFBP-3 y ALS fueron significativamente más bajos en los niños con TBI en comparación con los niños normales (todos los parámetros con una $P < 0.0001$).

La secuenciación del gen *IGFALS* mostró que mientras que las variantes sinónimas (cambios en la secuencia de bases que no producen cambios en el aminoácido codificado) se encontraron con similares frecuencias en niños TBI y normales (3.8% vs. 4.8%),

las variantes no sinónimas (cambios en la secuencia de bases que resultan en cambios en el aminoácido codificado) fueron más frecuentes en los niños TBI que en los normales (11.4% vs. 3.7%, $P=0.013$) (Figura 1). Todas estas variantes fueron encontradas en heterocigosis. En todos los niños TBI con variantes en el gen *IGFALS* se evaluó la formación de complejos ternarios por incubación del suero del paciente con ^{125}I -IGF-I y con y sin el agregado de IGFBP-3 recombinante humana. La formación de complejos ternarios con el agregado de IGFBP-3 fue menor en aquellos niños que presentaban variantes no sinónimas presumiblemente patogénicas de acuerdo a las herramientas bioinformáticas.

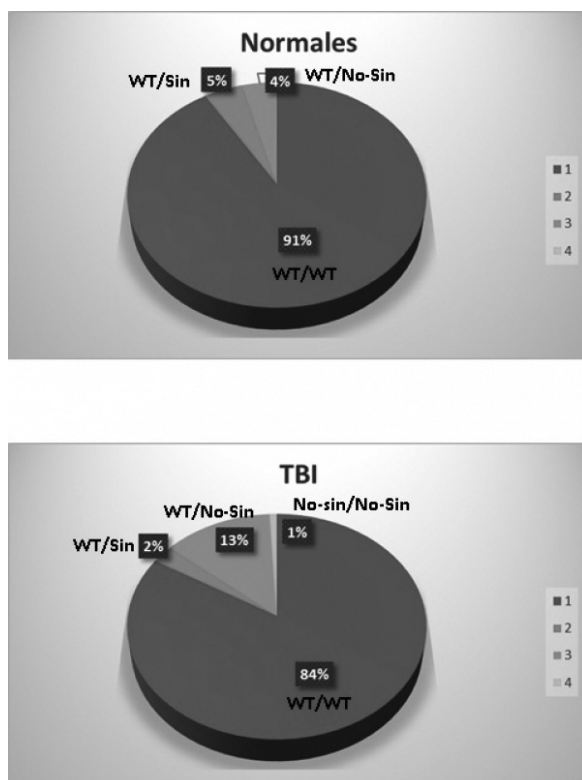


Figura 1. Variantes en el gen *IGFALS* en niños normales y con talla baja idiopática (TBI).

En un segundo estudio ampliamos el número de niños con TBI y niños normales. El análisis conjunto de estos 2 estudios nos permitió determinar la frecuencia de las variantes del gen *IGFALS* en niños con TBI y su asociación con deficiencia parcial o completa de ALS. El análisis conjunto de 218 niños normales y 117 niños con TBI, mostró que las variantes no sinónimas fueron significativamente más frecuentes en los niños con TBI (15.5% vs. 4.8%; $P=0.0039$). Entre los 16 niños con variantes no sinónimas uno presentaba deficiencia completa de ALS, resultando heterocigoto compuesto para dos variantes probablemente patogénicas (p.Glu35Glyfs*17 / p.Ser490Trp) y otros 5 presentaron deficiencia parcial de ALS (heterocigotos portadores para las variantes p.Glu35Glyfs*17, p.Arg277His, p.Pro287Leu, and 2 p.Arg548Trp).

Es importante resaltar que excepto en el caso de un niño con TBI que resultó heterocigoto compuesto para dos variantes patogénicas en el gen *IGFALS*, en todos los otros casos las variantes génicas se encontraron en heterocigosis. La haploinsuficiencia en el gen *IGFALS* puede resultar en expresión variable del alelo salvaje ("wild-type", WT), que puede o no compensar la falta total o menor expresión del alelo portador de la variante génica. Este fenómeno ha sido bien documentado para otras alteraciones génicas como en el caso de la retinitis pigmentosa por alteraciones heterocigotas en el gen *PRPF31* e identificado como el mecanismo responsable de la penetrancia incompleta⁽³⁷⁾. Similar observación ha sido descrita entre los familiares de pacientes con ACLSD completa, en que los portadores heterocigotos pueden o no presentar talla baja y ACLSD parcial^(34, 35).

Caracterización funcional de variantes *IGFALS*:

Para evaluar el impacto funcional de las variantes no sinónimas en el gen *IGFALS*, once de las variantes encontradas en pacientes con deficiencia completa de ALS y/o en niños con TBI fueron generadas en un vector de expresión conteniendo la secuencia del gen *IGFALS* mediante mutagénesis sitio dirigida y posterior transfección en células CHO en cultivo. La presencia de ALS en los lisados celulares y en el medio de incubación se determinó por Western-Immunoblot mediante el uso de un anticuerpo específico para ALS⁽³⁸⁾.

Siete de las variantes genéticas estudiadas (p.Glu35Glyfs*17, p.Glu35Lysfs*87, p.Asn276Ser, p.Leu409Phe, p.Ser490Trp, p.Cys540Arg) no presentaron síntesis ni secreción, una variante (p.Leu213Phe) se sintetizó parcialmente pero no mostró secreción. También se observó una significativa reducción en la cantidad de proteína secretada en tres variantes (p.Ala330Asp, p.Als475Val y p.Arg548Trp), aunque reteniendo su capacidad para formar complejos ternarios in vitro. Todas las variantes encontradas en pacientes con ACLSD afectaron la síntesis y/o la secreción de la ALS. De las variantes encontradas en heterocigosis en los niños TBI una variante resultó en incapacidad completa de la síntesis de ALS (p.Glu35Glyfs*17) y otras dos en síntesis y secreción normales pero a concentraciones más bajas en comparación con la ALS-WT (p.Ala330Asp, p.Arg548Trp).

Respuesta al tratamiento con GH

Para evaluar la potencial utilidad del tratamiento con GH recombinante humana (GHRh) como estrategia para mejorar la talla adulta en pacientes con deficiencia parcial de ALS, portadores heterocigotos para variantes en el gen *IGFALS* (HC), se seleccionaron 12 niños con TBI. Seis de ellos portadores heterocigotos (HC) para variantes en el gen *IGFALS* y otros 6 homocigotos para el alelo WT. El retraso de talla fue comparable en ambos grupos (-2.90 ± 0.15 vs.

-2.82±0.53; HC vs. WT respectivamente). Los niños HC presentaron niveles significativamente más bajos de IGF-I (-2.25±0.44 vs. -0.44±0.95 DE; P=0.0018) y de IGFBP-3 (-2.05±0.98 vs. 0.00±0.55 DE; P=0.0012). Ambos grupos presentaron una ganancia de talla comparable expresada en DE al año de tratamiento con GHRh a la dosis de 0.33 mg/kg.semana (1.21±0.43 vs. 1.15±0.26). Estos resultados preliminares muestran que a diferencia de lo previamente reportado en pacientes con ACLSD completa, los pacientes con deficiencia parcial de ALS son capaces de responder en forma comparable a los niños TBI sin deficiencia. Sin embargo, pudo observarse que esta aceleración de la velocidad de crecimiento al primer año de tratamiento (9.93±1.49 vs. 10.72±1.53 cm/año) se alcanzó con niveles de IGF-I significativamente más bajos (0.32±1.48 vs. 2.21±0.94 DE). Estos hallazgos sugieren que los niños con TBI, HC para variantes en el gen *IGFALS*, podían ser más sensibles a los niveles de IGF-I o que el IGF-I producido localmente y actuando por un mecanismo paracrino tendría un mayor efecto sobre el crecimiento lineal. Aunque estos resultados preliminares son auspiciosos sobre el efecto de la GHRh en niños con deficiencia parcial de ALS, el impacto efectivo sobre la talla adulta requiere un mayor seguimiento.

Conclusiones

Recientes estudios utilizando secuenciación masiva del exoma completo (Whole Exome Sequencing, WES), (Next Generation Sequencing, NGS) reportan que la ACLSD completa representa entre el 3-6% de los niños con diagnóstico clínico y bioquímico de insensibilidad a la GH (39, 40). En el caso de los niños con TBI, la ACLSD completa representa alrededor del 1% (41), mientras que alrededor del 5% de los niños con TBI presentan un perfil bioquímico sugestivo de ACLSD parcial, asociado con la presencia de variantes génicas en el gen *IGALS* de patogenidad comprobada o aún no claramente determinada.

La identificación de la ACLSD parcial podría tener implicancias prácticas considerando que estos niños, a diferencia de los pacientes con ACLSD completa, retienen su capacidad de responder al tratamiento con GHRh (42, 43). Aunque estos resultados preliminares son auspiciosos, el impacto efectivo sobre la talla adulta del tratamiento con GHRh en niños con deficiencia parcial de ALS, requiere de un seguimiento prolongado hasta alcanzar la talla adulta.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los niños que aceptaron participar en estos estudios. También quiero mencionar a todos los profesionales que tomaron parte activa de estos estudios: María Ballerini, Sonia Bengolea, Ignacio Bergadá, Débora Braslavsky, Hamilton Cassinelli, Sabina Domené, Mariana Gutiérrez,

Juan Heinrich, Héctor Jasper, Liliana Karabatas, Ana Keselman, Alicia Martínez, Lucía Martucci, Viviana Pipman, Rodolfo Rey, María Ropelato, Paula Scaglia.

Este trabajo fue realizado con subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2010 Nro. 1916) y subsidios otorgados por Pfizer Global Pharmaceuticals y Sandoz International GmbH, Business Unit Biopharmaceuticals.

Referencias Bibliográficas

1. Ranke MB: Towards a consensus on the definition of idiopathic short stature. *Horm Res* 1996;45 (Suppl 2):64-66.
2. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM on behalf of the 2007 ISS Consensus Workshop participants: Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4210-4217.
3. Argente J. Challenges in the Management of short stature. *Horm Res Paediatr* 2016;85:2-10.
4. 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.
5. Sanchez JE, Perera E, Baumbach L, Cleveland WW: Growth hormone receptor mutations in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4079-4083.
6. Salerno M, Balestrieri B, Matrecano E, Officioso A, Rosenfeld RG, Di Maio S, Fimiani G, Ursini MV, Pignata C: Abnormal GH receptor signaling in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3882-3888.
7. Sjöberg M, Salazar T, Espinosa C, Dagnino A, Avila A, Eggers M, Cassorla F, Carvallo P, Mericq MV: Study of GH sensitivity in Chilean patients with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4375-4381.
8. Bonioli E, Tarò M, Rosa CL, Citana A, Bertorelli R, Morcaldi G, Gastaldi R, Coviello DA: Heterozygous mutations of growth hormone receptor gene in children with idiopathic short stature. *Growth Horm IGF Res* 2005;15:405-410.
9. Takahashi Y, Kaji H, Okimura Y, Goji K, Abe H, Chihara K: Brief report: short stature caused by a mutant

- growth hormone. *N Engl J Med* 1996;334:432-436. Erratum in: *N Engl J Med* 334:1207.
10. Takahashi Y, Shirono H, Arisaka O, Takahashi K, Yagi T, Koga J, Kaji H, Okimura Y, Abe H, Tanaka T, Chihara K: Biologically inactive growth hormone caused by an amino acid substitution. *J Clin Invest* 1997;100:1159-1165.
11. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA: Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 1997;16:54-63.
12. Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton MP, Grouselle D, de Kerdanet M, Kadiiri A, Epelbaum J, Le Bouc Y, Amselem S: Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 2006;116:760-768.
13. Pantel J, Legendre M, Nivot S, Morisset S, Vie-Luton MP, le Bouc Y, Epelbaum J, Amselem S: Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4334-4341.
14. Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K; on behalf of the Japan Growth Genome Consortium: Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E373-8.
15. Olney RC, Bükülmez 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 Metab* 2006;91:1229-1232.
16. Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, Belinchón A, Barreda-Bonis AC, Vasques GA, Ramirez J, Luzuriaga C, Carlone G, González-Casado I, Benito-Sanz S, Jorge AA, Campos-Barros A, Heath KE: Heterozygous NPR2 Mutations Cause Disproportionate Short Stature, Similar to Léri-Weill Dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:E1133-E1142.
17. Nilsson O, Guo MH, Dunbar N, Popovic J, Flynn D, Jacobsen C, Lui JC, Hirschhorn JN, Baron J, Dauber A: Short stature, accelerated bone maturation, and early growth cessation due to heterozygous aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E1510-E1518.
18. Quintos JB, Guo MH, Dauber A: Idiopathic short stature due to novel heterozygous mutation of the aggrecan gene. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2015;28:927-932.
19. Edouard T, Grünenwald S, Gennero I, Salles JP, Tauber M: Prevalence of IGF1 deficiency in prepubertal children with isolated short stature. *Eur J Endocrinol* 2009;161:34:43-50.
20. Clayton PE, Ayoola O, Whatmore AJ: Patient selection for IGF-I therapy. *Horm Res* 2006;65 (Suppl 1):28-34.
21. Attie KM, Carlsson LM, Rundle AC, Sherman BM: Evidence for partial growth hormone insensitivity among patients with idiopathic short stature. The National Cooperative Growth Study. *J Pediatr* 1995;127:244-250.
22. Jones JI, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34.
23. Baxter RC: Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (alpha) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1347-1353.
24. Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER: Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989;121:753-758.
25. Baxter RC, Martin JL: Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6898-6902.
26. Ooi GT, Cohen FJ, Tseng LY, Rechler MM, Boisclair YR: Growth hormone stimulates transcription of the gene encoding the acid-labile subunit (ALS) of the circulating insulin-like growth factor-binding protein complex and ALS promoter activity in rat liver. *Mol Endocrinol* 1997;11:997-1007.
27. Baxter RC: Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (alpha) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1347-1353.
28. Lewitt MS, Scott FP, Clarke NM & Baxter RC: Developmental regulation of circulating insulin-like growth factor-binding proteins in normal pregnancies and in pre-eclampsia. *Progress in Growth Factor Research* 1995;6:475-480.
29. Barrios V, Pozo J, Muñoz MT, Buño M, Argente J: Normative data for total and free acid-labile subunit

of the human insulin-like growth factor-binding protein complex in pre- and full-term newborns and healthy boys and girls throughout postnatal development. *Horm Res* 2000;53:148-153.

30. Domené HM, Bengolea SV, Martínez AS, Ropelato MG, Pennisi P, Scaglia P, Heinrich JJ, Jasper HG: Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene. *N Engl J Med* 2004;350:570-577.

31. Laron Z, Pertzelan A, Mannheimer S: Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone: a new inborn error of metabolism? *Isr J MedSci* 1966;2:152-155.

32. Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, Pratt KL, Jasper H, Tepper A, Heinrich JJ, Rosenfeld RG: Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med* 2003;349:1139-1147.

33. Domené HM, Hwa V, Argente J, Wit JM, Camacho-Hübner C, Jasper HG, Pozo J, van Duyvenvoorde HA, Yakar S, Fofanova-Gambetti OV, Rosenfeld RG, International ALS Collaborative Group: Human acid-labile subunit deficiency: clinical, endocrine and metabolic consequences *Horm Res* 2009;72:129-41. Erratum in: *Horm Res* 2010;73:80.

34. Fofanova-Gambetti OF, Hwa V, Wit JM, Domené HM, Argente J, Bang P, Högl W, Kirsch S, Pihoker C, Chiu HK, Cohen L, Jacobsen C, Jasper HG, Haeusler G, Campos-Barros A, Gallego-Gómez E, Gracia-Bouthelier R, van Duyvenvoorde HA, Pozo J, Rosenfeld RG: Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (IGFALS) gene mutations on stature: Results from the International ALS Consortium. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4184-4191.

35. Högl W, Martin DD, Crabtree N, Nightingale P, Tomlinson J, Metherell L, Rosenfeld R, Hwa V, Rose S, Walker J, Shaw N, Barrett T, Frystyk J. IGFALS gene dosage effects on serum IGF-I and glucose metabolism, body composition, bone growth in length and width, and the pharmacokinetics of recombinant human IGF-I administration. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E703-E712.

36. Domené HM, Scaglia PA, Martínez AS, Keselman AC, Karabatas LM, Pipman VR, Bengolea SV, Guida MC, Ropelato MG, Ballerini MG, Lescano EM, Blanco MA, Heinrich JJ, Rey RA, Jasper HG: Heterozygous IGFALS gene variants in idiopathic short stature and normal children: impact on height and the IGF system. *Horm Res Paediatr* 2013;80:413-423.

37. Venturini G, Rose AM, Shah AZ, Bhattacharya SS,

Rivolta C. CNOT3 is a modifier of PRPF31 mutations in retinitis pigmentosa with incomplete penetrance. *PLoS Genet* 2012;8:1003040.

38. Martucci LC, Gutiérrez ML, Karabatas LM, Scaglia PA, Rey RA, Domené HM, Jasper HG, Domené S. Assessment of pathogenicity of natural IGFALS gene variants by in silico bioinformatics tools and in vitro functional studies. *Mol Cell Endocrinol* 2016;429:19-28.

39. Legendre M, Dastotb F, Collotb N, Duquesnoy P, Cohen E, Sobriera M-L, Adiceam P, Andersond D, Barone S, Cabrol S, Callewaert B, Cartigny M, Craen M, Crock P, Ladjouze A, Lazea C, Polak M, Savendahl L, Touzani A, Amselem S. Contribution of GHR and IGFALS mutations to growth hormone resistance. Identification of new variants and impact on the inheritance pattern. *Horm Res Paediatr* 2016;86 (Suppl 1):114-115.

40. Shapiro L, Savage M, Davies K, Metherell L, Storr H. Whole exome sequencing can identify defects not detected by candidate gene sequencing in patients with short stature and features of growth hormone insensitivity (GHI). *Horm Res Paediatr* 2016;86 (Suppl 1):47.

41. Hess O, Khayat M, Hwa V, Heath KE, Teitler A, Hritan Y, Allon-Shalev S, Tenenbaum-Rakover Y: A novel mutation in IGFALS, c.380T>C (p.L127P), associated with short stature, delayed puberty, osteopenia and hyperinsulinaemia in two siblings: insights into the roles of insulin growth factor-1 (IGF1). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013;79:838-844.

42. Gallego-Gómez E, Sanchez del Pozo J, Cruz-Rojo J, Gómez A, García Bouthelier R, Heath KE, Campos-Barros A. Patients with heterozygous mutations associated with postnatal growth deficit and low IGF-I may benefit from treatment with rhGH. *Horm Res* 2011;76 (Suppl 2):90-91.

43. Grandone A, Miraglia del Giudice E, Cirillo G, Abbondanza C, Cioffi M, Romano T, Micillo F, Marzuillo P, Perrone L. Clinical features of a new acid-labile subunit (IGFALS) heterozygous mutation: anthropometric and biochemical characterization and response to growth hormone administration. *Horm Res Paediatr* 2014;81:67-72.