



ORIGINAL BREVE

Aspectos clínicos en dos casos de pseudohipoparatiroidismo (1a y 1b) y estudio molecular del locus *GNAS*

A. Domínguez García^{a,*}, L.A. Castaño González^{b,c}, G. Pérez-Nanclares^{b,c}, S. Quinteiro González^a y E. Caballero Fernández^a

^a Unidad de Endocrinología Pediátrica, Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil, Las Palmas, España

^b Unidad de Investigación en Endocrinología y Diabetes, Hospital Universitario Cruces, UPV-EHU, CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras), Cruces-Baracaldo, Vizcaya, España

^c Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, UPV/EHU, Cruces-Baracaldo, España

Recibido el 9 de diciembre de 2012; aceptado el 11 de marzo de 2013

Disponible en Internet el 26 de abril de 2013

PALABRAS CLAVE

Seudohipoparatiroidismo;
Osteodistrofia hereditaria de Albright;
Gen *GNAS*

KEYWORDS

Pseudohypoparathyroidism;
Albright's hereditary osteodystrophy;
GNAS gene

Resumen El pseudohipoparatiroidismo (PHP) es una entidad rara, caracterizada por resistencia tisular a la hormona paratiroidea (PTH). Los 2 subtipos principales, PHP-1a y PHP-1b, son causados por alteraciones en el gen *GNAS* (20q13.3), que codifica para la proteína $G_{s\alpha}$, esencial para la acción de la PTH y otras hormonas.

El PHP-1a se asocia a diversas alteraciones hormonales, osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO) y actividad reducida de $G_{s\alpha}$. Está causado por mutaciones inactivantes del gen *GNAS*. El PHP-1b presenta resistencia aislada a la PTH, sin AHO y con actividad $G_{s\alpha}$ normal o levemente baja. Se asocia a defectos en la impronta de *GNAS*.

Se presentan 2 casos con PHP-1a y PHP-1b, ahondando en su clínica y en el diagnóstico diferencial frente a afecciones similares.

© 2012 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Clinical features of two cases of pseudohypoparathyroidism (1a and 1b) and molecular analysis of *GNAS*

Abstract Pseudohypoparathyroidism (PHP) is a rare disorder, characterized by a tissue resistance to parathyroid hormone (PTH). The two main subtypes of PHP, PHP1a and PHP1b, are caused by alterations in the *GNAS* locus (20q13.3), which encodes the $G_{s\alpha}$ protein, essential for the action of PTH and other hormones.

PHP-1a is associated with several hormone resistances, Albright hereditary osteodystrophy (AHO), and reduced $G_{s\alpha}$ activity. It is caused by inactivating mutations in the *GNAS* gene. PHP-1b presents with isolated resistance to PTH, without AHO and with normal to low $G_{s\alpha}$ activity. It is related to imprinting defects in *GNAS*.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: argdom@wanadoo.es (A. Domínguez García).

Two unrelated cases of PHP-Ia and PHP-Ib are presented here, focusing on their clinical aspects and in the differential diagnosis with similar pathologies.

© 2012 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Muchas hormonas peptídicas, como la hormona paratiroidea (PTH), la hormona estimuladora de tiroides (TSH), las gonadotropinas (LH y FSH), estimuladora de la hormona de crecimiento, etc., así como neurotransmisores y factores autocrinos y paracrinos, ejercen sus acciones a través de receptores acoplados a la proteína de membrana G_{α} ^{1,2} que, tras ser activada por el complejo hormona-receptor, desencadena procesos de señalización celular a través de un segundo mensajero, el AMP cíclico (fig. 1a). Esta cascada de señales incluye fosforilaciones mediadas por la proteína quinasa A (PKA), mientras que las fosfodiesterasas actúan como reguladores negativos de la vía (fig. 1b)³. Así, alteraciones en los receptores específicos provocan resistencias selectivas a dichas hormonas, mientras que alteraciones de la vía AMPc/PKA afectan simultáneamente a diversos sistemas metabólicos.

El pseudohipoparatiroidismo (PHP) es un grupo de endocrinopatías raras, caracterizadas por hipocalcemia, hiperfosfatemia y aumento de la hormona paratiroidea (PTH), debido a una resistencia variable a dicha hormona en sus órganos diana, fundamentalmente el túbulo renal proximal^{2,4,5}. El diagnóstico de PHP se realiza, casi siempre, en la infancia, por hipocalcemia o por un peculiar fenotipo llamado osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO)⁴, caracterizado por talla baja, obesidad, cara redondeada, braquidactilia, calcificaciones ectópicas y/o retraso mental. En función del fenotipo y la bioquímica asociada, el PHP se divide en diversos subtipos, siendo los 2 más importantes el PHP-Ia (OMIM #103580) y el PHP-Ib (OMIM #603233).

Pacientes con PHP-Ia presentan múltiple resistencia hormonal (PTH, TSH, gonadotropinas), fenotipo AHO y reducción en la actividad de G_{α} del 50%. Los pacientes con PHP-Ib presentan resistencia a la PTH sin AHO, con actividad de G_{α} habitualmente normal. Estas formas de PHP están causadas por defectos en el locus *GNAS* (20q13.2-13.3), donde se encuentra el gen *GNAS*, codificante para la proteína G_{α} ^{6,7}.

En este trabajo se presenta el estudio clínico y molecular de 2 casos con PHP-Ia y PHP-Ib.

Pacientes y métodos

Caso 1

Varón de 9 años, hijo de padres sanos, no consanguíneos. Presentó hiperbilirrubinemia en el periodo neonatal. Estudiado por primera vez a los 2 años de edad por calcificaciones subcutáneas en antebrazos, abdomen, muslos y piernas. La exploración física reveló obesidad, cara redonda, cuello corto y manos pequeñas (fig. 2). Sin desarrollo puberal, peso 20 kg (DE 3,2), talla 90 cm (DE -1,1), índice de masa corporal (IMC) 24,7 (DE 6,9), lesiones máculo-papulosas induradas

en el tronco y las extremidades. Bioquímica en sangre: calcio (Ca) total 9,3 mg/dl (rango normal 8,8-10,8); Ca iónico 4,9 mg/dl (4,9-5,5); fósforo (P) 5,6 mg/dl (2,9-5,1); PTH intacta 830 pg/ml (0-68,2); tiroxina T4 libre (T4L) 0,9 ng/dl (0,7-2,0) y TSH 2,9 μ U/ml (0,49-4,67). Tomografía computarizada cerebral (TCC) normal. A los 8 años de edad presenta disminución de los niveles de Ca total (8,1 mg/dl) y Ca iónico (4,36 mg/dl) y aumento de niveles de P (6,7 mg/dl) y PTH (1.716 pg/ml); el calcitriol 56 pg/ml (normal 16-56) y la T4L (0,8 ng/dl) fueron normales, y la TSH fue elevada (9,7 μ U/ml). La TCC muestra pequeñas calcificaciones en plexos coroideos. No han aparecido nuevas calcificaciones subcutáneas. En la radiografía de mano izquierda se observa braquidactilia, osteoporosis y aceleración de la edad ósea (edad ósea, 12 años; edad cronológica, 9 años) (fig. 3). Se realiza diagnóstico clínico de PHP-Ia e hipotiroidismo e inicia tratamiento con L-tiroxina, calcio y calcitriol, con normalización de las cifras de Ca, P, T4L y TSH, mientras que la PTH persiste elevada.

Caso 2

Varón de 11 años, sin antecedentes familiares de interés, remitido a endocrinología por hipocalcemia severa detectada por cuadro de mioclonías y espasmos de miembros inferiores (MMII), empeorado en las 2 semanas previas. Refería desde los 3 años tratamiento rehabilitador por torpeza motora, hipertonia de MMII y dislalia. La exploración clínica muestra peso 53,2 kg (DE 1,18), talla 150 cm (DE 0,79) e IMC 23,6 (DE 1,65), leve hipertonia de MMII, retracción aquilea, marcha con rigidez, torpeza motora y pies en garra, sin desarrollo puberal y ausencia de fenotipo peculiar. En la analítica destacaban: Ca total 5,3 mg/dl; Ca iónico 2,34 mg/dl; P 10,6 mg/dl; PTH intacta 674 pg/ml; TSH 3,38 mU/l y T4L 1,0 ng/dl; calcitriol normal. La TCC muestra múltiples calcificaciones bilaterales y simétricas en ganglios basales, con calcificaciones corticosubcorticales en parénquima de lóbulos frontales, temporales y parietales. Con estos hallazgos, se realizó el diagnóstico de PHP-Ib. Se inició tratamiento con calcio y calcitriol, con desaparición de los síntomas y normalización de las cifras de Ca, P y PTH a los 12 meses de tratamiento.

No fue posible realizar en ninguno de los 2 casos el test de Ellsworth-Howard, ni la determinación de la actividad eritrocitaria de la proteína G_{α} .

Análisis molecular

El ADN fue extraído de sangre total usando el QIAamp DNABlood Minikit (Qiagen, Alemania). Los 13 exones codificantes del gen *GNAS* se estudiaron por reacción en cadena de la polimerasa, purificación con Exo-Sap (USB, EE. UU.) y secuenciación directa en un secuenciador ABI3130xl (Applied Biosystems, EE. UU.). Las secuencias fueron

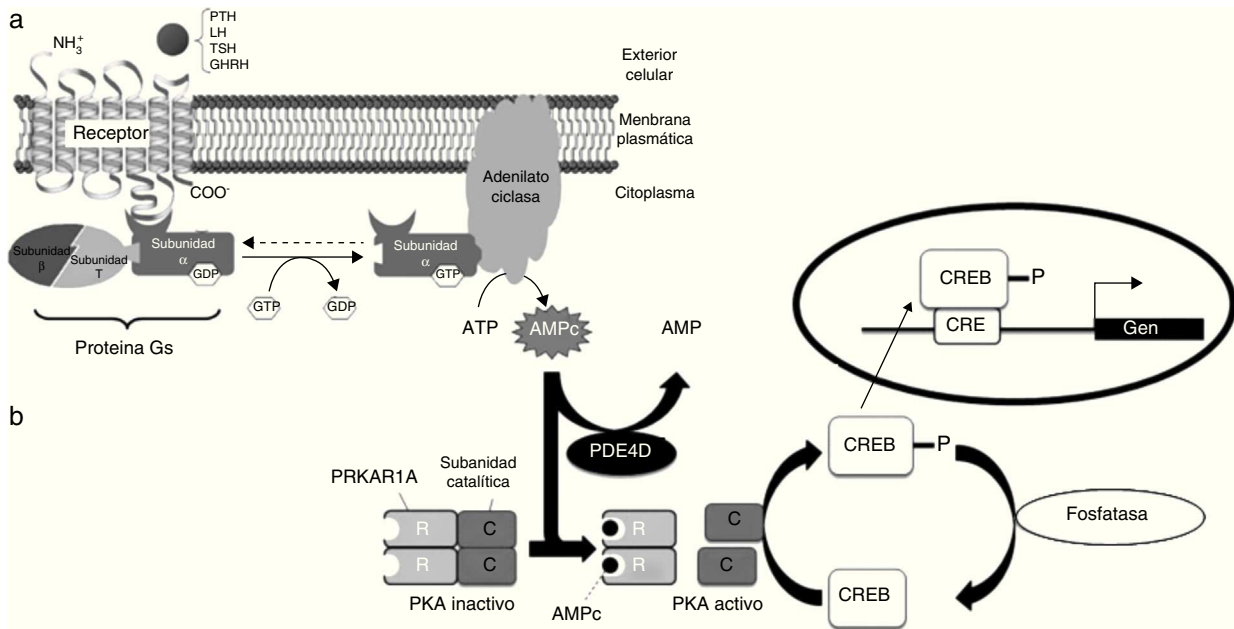


Figura 1 Esquema de la vía del AMPc/proteincinasa A. a) Mecanismo de acción de las hormonas cuyo receptor está acoplado a proteína $G_{s\alpha}$. Al unirse la hormona al receptor, se activa la subunidad α de la proteína G_s . Esta interacciona con la adenilato ciclasa, tras lo que se produce la síntesis de AMPc, que ejerce su función como segundo mensajero. Alteraciones a nivel de *GNAS* (gen que codifica para $G_{s\alpha}$) dan lugar a PHP, PPHP, AHO, etc. b) La unión del AMPc a PRKAR1A, la subunidad reguladora dependiente de AMPc, lleva a la disociación y activación de la proteincinasa A. CREB (proteína de unión a los elementos de respuesta al AMPc) se fosforila, con lo que se transloca al núcleo y modifica la expresión de los genes «aguas abajo» de la ruta. La actividad de la fosfodiesterasa PDE4D modula los niveles de AMPc. Alteraciones a nivel de *PDE4D* y *PRKAR1A* dan lugar a acrodisostosis, entidad clínicamente relacionada con la AHO.

analizadas y comparadas con la referencia del gen *GNAS* (Ensembl ENST00000371085) usando los software Sequencing Analysis v5.2 y SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

Se usó la técnica de methylation-specific multiplex-ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) para estudiar posibles deleciones, duplicaciones y la metilación del locus *GNAS*, mediante el kit ME031 (MRC-Holland, Holanda) en un secuenciador ABI3130xl, usando el software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).



Figura 2 Aspecto general del caso 1: obesidad, cara de luna llena, cuello corto y manos pequeñas.

Resultados moleculares

El caso 1 (PHP-1a) presentó una mutación en el exón 6 del gen *GNAS*: una duplicación en heterocigosis de 2 nucleótidos, con alteración de la pauta de lectura a partir del aminoácido 171 y aparición de un codón de parada prematuro (p.Leu171Serfs*2) (fig. 4a). Ninguno de sus progenitores presentaba dicha alteración.

El caso 2 (PHP-1b) presenta pérdida parcial de metilación en *XL α* s y completa para el exón A/B (fig. 4b). El estudio fue negativo para sus padres y hermana.



Figura 3 Radiografía de la mano izquierda del caso 1, que muestra braquimetacarpiya, osteoporosis generalizada y edad ósea acelerada.

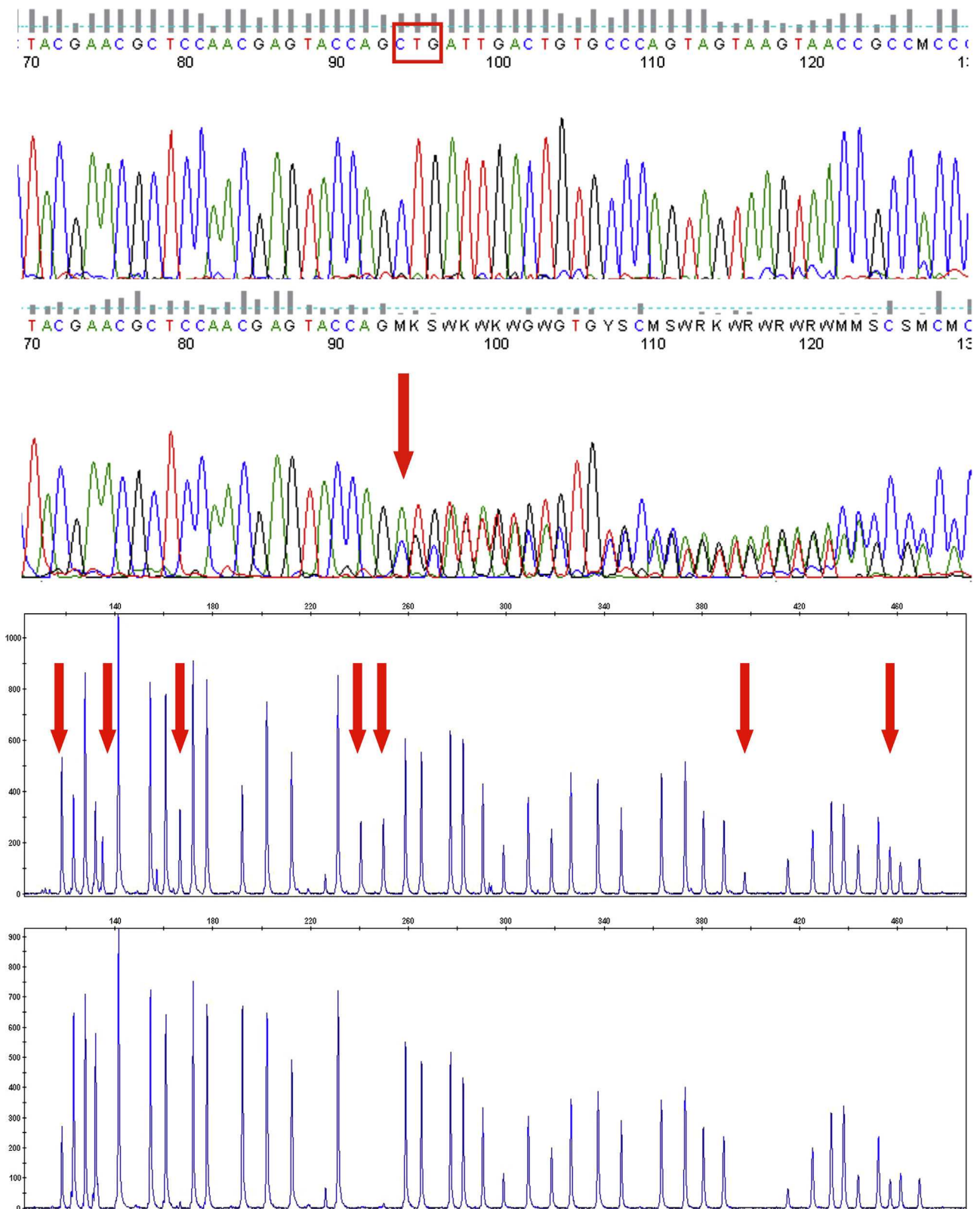


Figura 4 a) Electroferograma de la región del exón 6 del gen *GNAS*, para un control (panel superior) y el caso 1 (panel inferior). La flecha indica el lugar donde se produce la inserción en heterocigosis de 2 nucleótidos, que conlleva a nivel proteico la mutación p.Leu171Serfs*2. El recuadro en el panel superior indica los nucleótidos que codifican para el aminoácido leucina 171. b) Electroferograma que muestra el análisis por MS-MLPA del locus *GNAS*, para un control (panel superior) y el caso 2 (panel inferior). Las flechas indican las sondas que se pierden de manera total o parcial. Tras el análisis cuantitativo se demuestra que el paciente presenta pérdida parcial de metilación en XL α s y completa para el exón A/B.

Discusión

El locus *GNAS* está sometido a impronta, por lo que la expresión fenotípica de las alteraciones moleculares varía en función de su origen parental, así como del tejido donde se producen⁸⁻¹⁰. Los estudios moleculares han permitido caracterizar genéticamente los diferentes subtipos de PHP: el PHP-Ia se debe a mutaciones inactivantes en el alelo materno del gen *GNAS*, que codifica la proteína $Gs\alpha$ ^{2,10-12}. Clínicamente, se caracteriza por fenotipo AHO⁴ y resistencia hormonal, que cursa con una reducción de la actividad hormonal dependiente de la proteína $Gs\alpha$ (PTH, TSH, gonadotropinas, glucagón y somatotropina). La actividad de $Gs\alpha$ está reducida al 50%. El PHP-Ib se caracteriza por resistencia a la PTH, ausencia de fenotipo AHO y de resistencia plurihormonal^{2,6} (a veces hay moderada resistencia a TSH). La actividad de $Gs\alpha$ es normal o levemente baja. Molecularmente, el PHP-Ib se debe a cambios del patrón de metilación del locus *GNAS*¹³⁻¹⁵ (pérdida de metilación del exón A/B, a veces combinado con defectos epigenéticos de otras regiones del locus *GNAS*).

El caso 1 de este trabajo presenta PHP e hipotiroidismo, expresión de una resistencia hormonal variable en los tejidos periféricos, frecuente en el PHP-Ia. Además, la AHO orienta el diagnóstico hacia un PHP-Ia. En el caso 2, la ausencia de AHO y de resistencia plurihormonal dirige el diagnóstico hacia el PHP-Ib. En ambos casos, los resultados moleculares son los típicamente asociados: en el PHP-Ia, una mutación en heterocigosis en *GNAS*¹⁰⁻¹² y en el PHP-Ib, alteraciones en el patrón de metilación del locus *GNAS*¹³⁻¹⁵.

Trabajos recientes han descrito defectos de metilación en algunos pacientes con PHP y fenotipo AHO^{8,9,14,16}, solapamiento también referido en la actividad eritrocitaria de la proteína $Gs\alpha$ ¹⁷, indicando una posible superposición molecular y clínica entre los 2 subtipos¹⁸. Además, alteraciones de la vía AMPc/PKA a diferentes niveles (fig. 1) son responsables de una serie de síndromes endocrinos con fenotipos en ocasiones similares, aunque con ligeras diferencias¹⁹. Así, la acrodisostosis (OMIM #101800), que cursa con disostosis facial, estatura baja, braquidactilia severa, en ocasiones resistencia plurihormonal (PTH y tirotropina), posible retraso mental, etc., se asemeja a la AHO, aunque está causada por alteraciones en los genes *PPKAR1A* y *PDE4D*. De ahí la importancia del análisis molecular del locus *GNAS* en los pacientes con sospecha de PHP para establecer un diagnóstico diferencial frente a otras entidades de la misma vía metabólica, con fenotipos similares pero cuyas causas genéticas subyacen en otros genes, y poder realizar así un adecuado consejo clínico y genético²⁰. La ausencia de alteraciones en el locus *GNAS* en pacientes con fenotipo similar al fenotipo AHO y/o resistencia plurihormonal debe dirigir el estudio hacia *PPKAR1A* y *PDE4D*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Spiegel AM. Hormone resistance caused by mutations in G proteins and G protein-coupled receptors. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1999;12:303-9.
- Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocr Rev.* 2001;22:675-705.
- Stratakis CA. Cyclic AMP, protein kinase A, and phosphodiesterases: Proceedings of an international workshop. *Horm Metab Res.* 2012;44:713-5.
- Albright F, Burnett CH, Smith PH, Parson W. Pseudohypoparathyroidism-an example of "Seabright syndrome". *Endocrinology.* 1942;30:922-32.
- Mantovani G, Spada A. Mutations in the $Gs\alpha$ gene causing hormone resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006;20:501-13.
- Liu J, Erlichman B, Weinstein LS. The stimulatory G protein alpha-subunit $Gs\alpha$ is imprinted in human thyroid glands: implications for thyroid function in pseudohypoparathyroidism types 1A and 1B. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4336-41.
- De Nanclares GP, Fernandez-Rebollo E, Gaztambide S, Castaño L. Genética del pseudohipoparatiroidismo: bases para el consejo genético. *Endocrinol Nutr.* 2008;55:476-83.
- De Nanclares G, Fernandez-Rebollo E, Santin I, Garcia-Cuartero B, Gaztambide S, Menendez E, et al. Epigenetic defects of *GNAS* in patients with pseudohypoparathyroidism and mild features of Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:2370-3.
- Mariot V, Maupetit-Mehouas S, Sinding C, Kottler ML, Linglart A. A maternal epimutation of *GNAS* leads to Albright osteodystrophy and PTH resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:661-5.
- Aldred MA, Trembath RC. Activating and inactivating mutations in the human *GNAS1* gene. *Hum Mutat.* 2000;16:183-9.
- Weinstein LS, Gejman PV, Friedman E, Kadowaki T, Collins RM, Gershon ES, et al. Mutations of the $Gs\alpha$ -subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:8287-90.
- Patten JL, Johns DR, Valle D, Eil C, Gruppuso PA, Steele G, et al. Mutation in the gene encoding the stimulatory Gprotein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N Engl J Med.* 1990;322:1412-9.
- Bastepe M, Pincus JE, Sugimoto T, Tojo K, Kanatani M, Azuma Y, et al. Positional dissociation between the genetic mutation responsible for pseudohypoparathyroidism type 1b and the associated methylation defect at exon A/B: evidence for a long-range regulatory element within the imprinted *GNAS1* locus. *Hum Mol Genet.* 2001;10:1231-41.
- Mantovani G, De-Sanctis L, Barbieri AM, Elli FM, Bollati V, Vaira V, et al. Pseudohypoparathyroidism and *GNAS* epigenetic defects: clinical evaluation of Albright Hereditary Osteodystrophy and molecular analysis in 40 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:651-8.
- Liu J, Litman D, Rosenberg MJ, Yu S, Biesecker LG, Weinstein LS. A *GNAS1* imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type 1B. *J Clin Invest.* 2000;106:1167-74.
- Fernandez-Rebollo E, Garcia-Cuartero B, Garin I, Largo C, Martínez F, Garcia-Lacalle C, et al. Intragenic *GNAS* deletion involving exon A/B in pseudohypoparathyroidism type 1A resulting in an apparent loss of exon A/B methylation: Potential for misdiagnosis of pseudohypoparathyroidism type 1B. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:765-71.
- Zazo C, Thiele S, Martin C, Fernandez-Rebollo E, Martinez-Indart L, Werner R, et al., Spanish PHP Group. $Gs\alpha$ activity is reduced in erythrocyte membranes of patients with pseudohypoparathyroidism due to epigenetic alterations at the *GNAS* locus. *J Bone Miner Res.* 2011;26:1864-70.

18. Mantovani G, Elli FM, Spada A. *GNAS* epigenetic defects and pseudohypoparathyroidism: Time for a new classification? *Horm Metab Res.* 2012;44:716–23.
19. Assie G. One single signaling pathway for so many different biological functions: lessons from the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase: A pathway-related disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:4355–7.
20. Lecumberri B, Fernandez-Rebollo E, Sentchordi L, Saavedra P, Bernal-Chico A, Pallardo LF, et al. Coexistence of two different pseudohypoparathyroidism subtypes (Ia and Ib) in the same kindred with independent $Gs\alpha$ coding mutations and *GNAS* imprinting defects. *J Med Genet.* 2010;47:276–80.