UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DEL GEN IGFALS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ

Lina Patricia Buelvas Vega

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
BOGOTA, COLOMBIA
2015

EVALUACIÓN DEL GEN IGFALS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ

Autor:
Lina Patricia Buelvas Vega

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Genética Humana

Director:
Harvy Mauricio Velasco MD, MSc

Línea de Investigación:
Talla Baja Idiopática
Grupo de Investigación:
Genética Clínica

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
MAESTRIA EN GENETICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
BOGOTA, COLOMBIA
2015

Dedicatoria

Al futuro,

que me espera lleno de oportunidades y nuevos retos.

Agradecimientos

Agradezco a mi padre Jorge Luis Buelvas quien con su apoyo me ha permitido convertirme en la profesional que soy hoy en día. A mi hermana Ana Buelvas quien me ha acompañado tomada de la mano por todos los procesos más importantes de mi vida. A mi hermana Angelica Buelvas quien ha motivado en gran parte mi profesión.

Doy gracias a todos los docentes que orientaron mi formación durante la maestría, particularmente a la Dra. Clara Arteaga quien se convirtió día tras día en una inspiración y un ejemplo a seguir tanto a nivel profesional como personal. A mi director de tesis el Dr. Harvy Velasco por orientarme, estimular mi conocimiento y darme la oportunidad de trabajar bajo su tutoría.

Gracias al Dr. Domené, Paula Scaglia, Sabina Domené y todo el grupo de trabajo del laboratorio CEDIE de Buenos Aires, Argentina por aceptarme, abrir sus puertas y brindarme todos sus conocimientos para mi formación profesional.

Gracias a Mireya Sarmiento por su colaboración y acompañamiento durante este proceso y a Diana Mayorga quien con sus esfuerzos me permitió hacer realidad este sueño. Gracias a la DIB por la financiación de este trabajo. Gracias a los pacientes que me permitieron adquirir nuevos conocimientos para ponerlos a su servicio.

Gracias a mis amigos y a mi novio, que me acompañaron durante este proceso y siempre estuvieron a mi lado para darme fortaleza e impulsando cada paso de mi camino.

Resumen

La talla baja se ha descrito como una estatura por debajo de -2 desviaciones estándar para la edad y el sexo, respecto a la población general (o <P3) (J.M. Wit, et al, 2011; J.M Wit, et al 2008). Dentro de la clasificación de esta entidad se incluyen variantes patológicas y variantes no patológicas, estas últimas como diagnóstico de exclusión. Una vez que en el paciente se excluyen síndromes genéticos, endocrinos o desordenes psiquiátricos se considera una Talla Baja Idiopática (*Idiopathic Short Stature*- ISS) (J.M. Wit, et al, 2011). En aproximadamente el 80% de los niños que son referidos a una clínica pediátrica debido a la baja estatura, no es posible determinar una etiología, incluso después de una evaluación diagnóstica completa, incluyendo un amplio *screening* bioquímico e investigaciones radiológicas (J.M Wit.et al, 2012; Pedicelli et al, 2009; Lindsay et al, 1994).

Los factores de crecimiento insulinosímiles (IGF-I y II), son polipéptidos implicados en el crecimiento y el metabolismo, su acción endocrina es posible ya que circulan en un complejo ternario de aproximadamente 150 kDa; cerca del 80-90% de los IGFs se encuentra formando el complejo integrado por IGF-I o II, IGFBP-3 o IGFBP-5 (Proteínas Transportadoras) y una glicoproteína de aproximadamente 85 kDa conocida como Subunidad Ácido Lábil (ALS) (J.M Wit, et al 2008). Debido a la formación de este trímero, se incrementa la vida media de los IGFs y se modula su biodisponibilidad. Las mutaciones en el gen IGFALS (Subunidad Ácido Lábil del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina) se reflejan en Talla Baja con retardo del crecimiento y con o sin retardo puberal (Domené et al, 2011). En este trabajo se describe clínica, química y radiológicamente un grupo de pacientes con Talla Baja Idiopática procedentes de Bogotá y se emplea la técnica de secuenciación del gen IGFALS para determinar la frecuencia mutacional, encontrando 5 variantes sinónimas, 1 en el exón uno y 4 en el exón dos. Además se evalúan los niveles de la proteína ALS en los pacientes portadores de estas variantes sin encontrar niveles bajos o ausencia de la proteína en ninguno de los casos.

Palabras clave: IGFALS, ALS, Talla Baja Idiopática, IGF, IGFBP3.

Abstract

Short stature has been described as a height below - 2 SDS for age and sex, compared to the general population (J.M. Wit, et al, 2011; J.M Wit, et al 2008). Within the classification of this entity includes pathological variants and not pathological, the last one as a diagnosis of exclusion. Once in the patient is excluded the genetic syndromes, endocrine or psychiatric disorders should be considered as idiopathic short stature (*Idiopathic Short Stature*- ISS) (J.M. Wit et al, 2011). In approximately 80% of children who are referred to a pediatric clinic because short stature, is not possible to determine an etiology, even after a complete diagnostic evaluation, including an extensive biochemical screening and research radiológicas (J.M Wit.et al, 2012; Pedicelli et al, 2009; Lindsay et al, 1994).

Insulin-like growth factors (IGF-I and II) are polypeptides involved in the growth and metabolism, its action is possible because circulating in a ternary complex of approximately 150 kDa, about 80-90% of the IGFs is forming in composed of IGF-I or II, IGFBP-3 or -5 (binding protein) complex and around 85 kDa glycoprotein known as Acid Labile Subunit (ALS) (J.M Wit, et al 2008). Due to the formation of this trimer the half life of IGFs increases and his bioavailability is modulated. Mutations in the gene IGFALS (Insulin-Like Growth Factor Protein Acid Labile Subunit) are reflected in low height and growth retardation with or without puberal delay (Domené et al, 2011). In this work, a group of patients with idiopathic short stature from Bogotá are described clinical, chemical and radiological and IGFALS gene sequencing is used to determine the frequency of mutations, finding 5 synonymous variants, 1 in exon one and 4 in exon 2. In addition levels of protein ALS are assessed in patients carrying of these variants, without encountering low level or absence of the protein in either case.

Keywords: IGFALS, ALS, Idiopathic Short stature, IGF, IGFBP3.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN V
ABSTRACT VI
1. INTRODUCCIÓN 1
2. PROBLEMA 4
3. JUSTIFICACIÓN 7
4. MARCO TEÓRICO .....
4.1 Introducción 9
4.2 Epidemiología 10
4.3 Carga de la enfermedad 12
4.4 Fisiología del crecimiento. Eje GH-IGF I 12
4.5 Métodos para la valoración del crecimiento lineal 16
4.6 Talla Baja 17
4.7 Talla Baja Idiopática 24
4.8 Genómica de la Talla Baja 25
4.9 Talla Baja y el gen IGFALS 28
5. OBJETIVOS .....
5.1 Objetivo general 34
5.2 Objetivos específicos 34
6. METODOLOGÍA .....
6.1 Tipo de estudio 35
6.2 Muestra 35
6.3 Definición de Sujetos de Estudio 35
6.4 Procedimientos 36
6.5 Estadística 42
7. CONSIDERACIONES ÉTICAS 43
8. RESULTADOS .....
8.1 Descripción de la población estudio 44
8.2 Análisis Molecular 47
8.3 Medición de ALS 54
9. DISCUSIÓN 62

10. CONCLUSIONES 72
11. RECOMENDACIONES 74
12. ANEXOS 75
13. BIBLIOGRAFÍA 82

INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Comparación de Prevalencia en talla baja (porcentaje de individuos) en el ENSIN 2005 y el ENSIN 2010. Tomado del ENSIN 2010 5

Tabla 4-1: Frecuencia de motivos de consulta en genética. (Tomado de Acosta Guio, 2011) 9

Tabla 4-2: Factores involucrados en el crecimiento (Tomado de Pombo et al. 2011) 17

Tabla 4-3: Test de Laboratorios para la tamización del niño con baja talla (Tomado de Pedicelli, et al, 2009) 18

Tabla 4-4: Clasificación de Talla Baja, falla primaria del crecimiento, de acuerdo a la ESPE (Wit, 2007).....21

Tabla 4-5: Clasificación de Talla Baja Secundaria según la ESPE (Wit, 2007) 22

Tabla 4-6: Clasificación de Talla Baja Idiopática según la ESPE (Wit, 2007).....23

Tabla 4-7: Mutaciones reportadas en el gen IGFALS, (Tomado de Dómene, et al, 2011) 30

Tabla 8-1: Sitios de remisión de la población estudio 44

Tabla 8-2: Municipios de origen de la población estudio 45

Tabla 8-3: Datos de sexo, edad de ingreso al estudio, edad gestacional, peso y talla al nacer, talla, SDS y peso a ingreso al estudio. 45

Tabla 8-4: Media, mediana y moda de las SDS de la talla 47

Tabla 8-5: Variantes encontradas en cada paciente 50

Tabla 8-6: Frecuencia de la variante -19 A>G en estado homocigoto y heterocigoto 51

Tabla 8-7: Frecuencia de la variante c.210 T>C en estado homocigoto y heterocigoto ..51

Tabla 8-8: Frecuencia de las otras variantes además de la c.210 T>C en el exon 2 52

Tabla 8-9: Carpograma, IGF I, IGFBP3 y ALS.....54

Tabla 8-10: Media, mínimo y máximo de las desviaciones estándar de IGF I y IGBP3 y los niveles de ALS en mU/ml 55

Tabla 8-11: Niveles de ALS en mU/ml en el grupo de pacientes estudiados 56

Tabla 8-12: Correlación de Pearson entre los niveles de ALS mU/ml con la talla en niñas 57

Tabla 8-13: Correlación de Pearson entre los niveles de ALS mU/ml con la talla en niños 58

Tabla 8-14: Correlación de Pearson entre los niveles de ALS mU/ml e IGF-I en niñas .. 59

Tabla 8-15: Correlación de Pearson entre los niveles de ALS mU/ml e IGF-I en niños .. 60

Tabla 9-1: Niveles de IGF I en la población estudio 63

Tabla 9-2: Frecuencia de Mutaciones en el estudio de Campos Barros et al, 2011..... 64

Tabla 9-3. Identificación de los pacientes estudiados, con las variantes encontradas, la SDS de la talla del paciente y la talla en cm de los padres 66

INDICE DE FIGURAS

Figura 4-1: Prevalencia (%) de talla baja para la edad en encuestas nacionales (ENDS 1995, 2000 y ENSIN 2005), (Tomado de Neufeld L, 2014) 10

Figura 4-2: Prevalencia de Talla Baja según dos poblaciones de referencia. (Tomado de ENSIN 2010) 11

Figura 4-3: Factores involucrados en el eje GH-IGF I (Tomado de Giustina et al. 2008) .14

Figura 4-4: Formación del complejo ternario IGF I- IGFBP3- ALS (Tomado de Matthew M. Rechler et al.1998) 15

Figura 4-5: Algoritmo de la ACMG para estudio del paciente con Talla Baja (Tomado de J. M Wit, 2011) 24

Figura 4-6: Esquema de los exones del gen IGFALS (Transcrito IGFALS-001).....29

Figura 4-7: Mutaciones reportadas en el gen IGFALS. (Tomado de Dómene, et al, 2011) 31

Figura 4-8: Modelamiento de la proteína ALS. (Tomado de David, Alessia, 2012).....32

Figura 6-1: Gel de electroforesis, Agarosa al 1% con amplificados del exón 1 37

Figura 6-2: Gel de electroforesis, Agarosa al 1% con amplificados del exón 2 38

Figura 6-3: Ciclado de PCR 39

Figura 6-4: Diagrama de metodología 42

Figura 8-1: Electroesferograma de la variante c.-19 A>G 48

Figura 8-2: Electroesferograma de la variante c. 99G>A 48

Figura 8-3: Electroesferograma de la variante c.210 T>C 49

Figura 8-4: Electroesferograma de la variante c.915 G>A 49

Figura 8-5: Electroesferograma de la variante c.1500 C>T 49

Figura 8-6: Diagrama de frecuencia de las variantes del exón 2 53

Figura 8-7: Diagrama de dispersión de los valores de ALS por ELISA de los niños y niñas del subgrupo estudiado 56

Figura 8-8: Gráfica de dispersión de los datos entre las variables de Talla y Niveles de ALS en niñas 58

Figura 8-9: Gráfica de dispersión de los datos entre las variables de Talla y Niveles de ALS en niños 59

Figura 8-10: Gráfica de dispersión de datos entre las variables Niveles de ALS e IGF I en niñas 60

Figura 8-11: Gráfica de dispersión de datos entre las variables Niveles de ALS e IGF I en niños 61

Figura 9-1: Diagrama de barras que identifica el número de pacientes con 1, 2, 3 o ninguna variante en el exón 2. 67

INDICE DE ANEXOS

Anexo A: Curvas de relación Talla- Edad de Niñas y Niños de la OMS 75

Anexo B: Consentimiento Informado para la participación en el proyecto de Investigación 77

Anexo C: Formato de recolección de Datos 80

ABREVIATURAS

ACMG: American College of Medical Genetics. Colegio Americano de Genética Médica.

AKT: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase.

ALS: Acid Labile Subunit. Subunidad Ácido Lábil.

CENDEM: Centro Nacional de Endocrinología y Metabolismo.

CENPA: Centro Nacional de Endocrinología Pediátrica y del Adolescente.

CNV: Copy Number Variants. Variación en el número de copias.

DGH: Déficit de Hormona de Crecimiento.

DNA: Deoxyribonucleic Acid. Ácido desoxirribonucleico.

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

ENDS: Encuesta Nacional de Demografía y Salud.

ENSIN: Encuesta Nacional de Situación Nutricional en Colombia.

ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinases. Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares.

ESPE: European Society for Paediatric Endocrinology. Sociedad Europea de Endocriología Pediátrica.

GH: Growth Hormone. Hormona de Crecimiento.

GHBP: Growth Hormone Binding Protein. Proteína de Unión de Hormona de Crecimiento.

GHI: Insensibilidad a Hormona de Crecimiento.

GHR: Growth Hormone Receptor. Receptor de Hormona de Crecimiento.

GHRH: Growth-Hormone-Releasing Hormone. Hormona Liberadora de Hormona de Crecimiento.

GHSR: Growth hormone secretagogue receptor. Receptor de Grelina.

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis. Análisis de Enriquecimiento de Genes.

GWAS: Genome-Wide Association Studies. Estudios de Asociación del Genoma Completo.

IGFALS: Insulin-like Growth Factor Binding Protein Acid Labile Subunit Gene. Gen Subunidad Ácido Lábil Proteína de Unión del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina.

IGFBP: Insulin-like Growth Factors Binding Protein. Proteína de Unión del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina.

IGF I: Insulin-like Growth Factors I. Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I.

IGF II: Insulin-like Growth Factors II. Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo II.

IGF IR: Insulin-like Growth Factors I Receptor. Receptor del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I.

IRS: Insulin *Receptor* Substrate. Receptor del Sustrato Insulina.

ISS: Idiopathic Short Stature. Talla Baja Idiopática.

Kg: Kilogramos.

LIH: Laboratorio de Investigación Hormonal.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases. Proteínas Quinasas Activadoras de Mitogénesis.

MGRS: Multicentre Growth Reference Study. Estudio Multicéntrico de Patrón de Crecimiento.

MLPA: Multiplex ligation-dependent probe amplification. Amplificación Múltiple de Sondas Dependientes de Ligación.

NCHS: National Center for Health Statistics. Centro Nacional de Estadísticas de Salud.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena Polimerasa.

PEG: Pequeño para la Edad Gestacional.

PTH: Hormona Paratiroidea.

RCCD: Retardo Constitucional del Crecimiento y Desarrollo.

RRL: Repeticiones Ricas en Leucina.

SDS: Standard Deviation. Desviación estándar.

SHOX: Short Stature Homeobox Gene. Gen Homeobox Baja Estatura.

SNP: Single Nucleotide Polymorphisms. Polimorfismo de Nucleótido Único.

STAT: Activator of Transcription. Proteínas Activadoras de Transcripción.

TBF: Talla Baja Familiar.

cm: Centímetros.

g: Gramos.

kDa: Kilodalton

Kg: Kilogramo.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

mU: Miliunidades.

ng: Nanogramos.

rhGH: Hormona de Crecimiento Recombinantre.

rpm: Revoluciones por minuto.

µg: Microgramos.

µl: Microlitros.

1. Introducción

La Talla Baja Idiopática se define como una estatura inferior a -2 desviaciones estándar (SDS) o menor al percentil 3 para las curvas de crecimiento de acuerdo al sexo y la edad, respecto a la población general, con armonía entre los segmentos corporales; además deben ser excluidos síndromes genéticos, endocrinos y trastornos psiquiátricos (Cohen et al, 2008; Pombo M et al, 2011).

La talla baja es uno de los motivos más comunes de remisión a endocrinología pediátrica (Dauber et al, 2014) y es unas de las consultas más frecuentes en genética constituyendo el 8% en Colombia (Acosta et al, 2011), lo que ha llevado a proponer un abordaje complejo de una serie de patologías y causas de esta condición y han motivado la difusión de algunos algoritmos que permiten una aproximación adecuada al paciente, manteniendo un costo aceptable y evitando procedimientos innecesarios para el mismo (J.M. Wit, 2011). Dentro del estudio de estos pacientes deben descartarse causas orgánicas de la Talla Baja como disfunción renal, desordenes acido-base, hipotiroidismo, enfermedad celiaca, etc (Dauber, 2014). Sin embargo, se estima que la evaluación médica completa del paciente identifica la causa patológica en 1-40% de los casos y recientemente se ha determinado que el rendimiento diagnóstico de esta evaluación es del 1,3% (Sisley, 2013).

Con el advenimiento de los GWAS (*genome-wide association studies*), se ha demostrado que el número de *loci* implicados en la regulación del crecimiento es aproximadamente de 423 pero probablemente sea mucho mayor, puesto que esta cantidad solo determina una quinta parte de la variabilidad en la talla (Wood et al, 2014). Por lo tanto, es esperable que en pacientes con Talla Baja se encuentren muchas variantes y múltiples genes involucrados, se han identificado variantes comunes en la población (con una frecuencia

>5%) que tienen un efecto sobre la talla (Lango Allen, 2010). Existen otros estudios como identificación de CNV´s y Exoma que han ampliado la búsqueda de genes candidatos. Debido a que no es posible realizar un abordaje tan complejo, el estudio de estas variantes se ha centrado en el "enfoque del gen candidato", extrapolando los datos emitidos en estudios sobre una Talla Baja de origen monogénico (J.M. Wit, 2011). Por tal motivo además de la evaluación diagnóstica del paciente con Talla Baja, mediante el examen físico, radiográfico y de laboratorio (Cohen, 2008), existe la posibilidad de un abordaje genético a través de estudios moleculares de genes específicos como el gen SHOX, paneles para etiologías de acuerdo a la impresión diagnostica como en el síndrome Noonan, estudio microArray y secuenciación de exoma (Dauber, 2014).

En medio del estudio de estas causas monogénicas de Talla Baja, en el 2004 se reportó el primer caso de un paciente de 17 años con Talla Baja Idiopática causada por deficiencia total de la proteína ALS (Subunidad Ácido Lábil) debida a una mutación en el gen IGFALS (Domené, 2004). Los Factores de Crecimiento Insulinosímiles (IGF-I y II), son polipéptidos implicados en el crecimiento y el metabolismo, su acción endocrina es posible ya que circulan en un complejo ternario de aproximadamente 150 kDa formado por IGF-I o IGF-II, IGFBP-3 o IGFBP-5 (proteínas transportadoras) y una glicoproteína de aproximadamente 85 kDa conocida como ALS (Domene, 2005). La inadecuada o insuficiente función de esta última conlleva a una disminución de la vida media y por tanto de la actividad endocrina del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF-I) sobre los tejidos blanco de crecimiento; hasta el momento se han realizado modelos en ratón que demuestran este efecto (Courtland, 2010), y en humanos se han descrito 20 mutaciones en el gen que comprometen la Talla (Domene, 2011; Hess, 2013; Poukoulidou, 2014; Schreiner, 2013). Hasta 2009 se habían reportado 16 mutaciones en individuos de diferente etnia y origen demográfico, y con una amplia variedad debido a que la mayoría (56%, 9 de 16) fueron *missense*, cuatro (25%) *frameshifts* con codones de parada prematura, dos (13%) eran inserciones *in frame*, y uno (6%) era *Nonsense* (Fofanova-Gambetti, 2010).

El estudio molecular de los pacientes y la identificación de una causa monogénica de Talla Baja ofrecen posibilidades, diagnósticas, y terapéuticas que van a determinar el pronóstico. Los beneficios que ofrece el estudio genético son: Primero, la identificación molecular de la etiología permite el diagnóstico y provee a la familia de respuestas por las cuales el niño no presenta un crecimiento normal; segundo, puede alertar de la clínica y de otras comorbilidades a las que el paciente puede estar en riesgo; tercero, permite realizar una asesoría genética adecuada a las familias; y por último la etiología puede tener implicaciones en la terapéutica, principalmente a la hora de definir el uso de la hormona de crecimiento (Dauber, 2014).

Debido a la identificación del rol de IGFALS en el crecimiento, la escasa información en la literatura sobre el comportamiento de las variantes genéticas en población mezclada, y los datos limitados en población colombiana, han motivado al estudio de este gen en un grupo de pacientes colombianos con diagnóstico de Talla Baja Idiopática, de modo que se pudiera establecer cuál es el comportamiento de dicho gen en nuestra población con relación a esta enfermedad. En este trabajo se caracteriza molecularmente el gen IGFALS a través del método de secuenciación en un grupo de pacientes con Talla Baja Idiopática en Bogotá y se cuantifican los niveles de la proteína ALS para evaluar el efecto de los hallazgos moleculares sobre la disponibilidad de la proteína circulante.

2. Problema

La Talla Baja tiene una prevalencia en la población general del 2,3% (J.M. Wit et al, 2008), y en algunos estudios el porcentaje de la patología asciende aproximadamente a 5%; considerando que en el 15% se encuentra una historia de bajo peso o longitud al nacer, para la edad gestacional (PEG) (Pedicelli, 2009). Esto significa que en aproximadamente 75 a 80% de los niños con Talla Baja presentados en una clínica pediátrica no tienen antecedentes de bajo peso y / o longitud al nacer. La gran mayoría de ellos tienen variantes normales de crecimiento (Talla Baja Familiar o Retardo Constitucional del Crecimiento y Desarrollo) y alcanzará una altura adulta dentro del rango de tallas de referencia (Pedicelli, 2009). De acuerdo con un boletín de la Organización Mundial de la Salud publicado en 2000, la prevalencia de niños con déficit de altura, ha disminuido en los últimos 20 años. En los países en desarrollo, se encuentra que el 32,5% de los niños presentan Retraso del Crecimiento; más específicamente en América del Sur, hubo una caída de esta prevalencia del 25,1% al 9,3%, en el período 1980-2000 (Strufaldi, 2005). En Colombia se reportó en el 2005, una prevalencia de Talla Baja aproximada del 13,9% de la población, sin discriminar etiología (Neufeld L, 2010), siendo la desnutrición la primera causa y en 2010 esta cifra disminuyó al 10% (Organización Mundial de la Salud OMS, 2014). La comparación de acuerdo a la edad en ambos estudios se puede observar en la tabla 2-1.

	2005	2010
TOTAL	**13,9**	**10**
EDAD (Años)		
5	13,7	12,9
6	12,1	9,5
7	13,2	8,0
8	10,9	7,7
9	12,7	6,9
5-9	12,5	9,0
10	14,7	7,9
11	16,3	9,1
12	17,3	11,3
13	16,7	12,1
14	15,1	11,8
15	12,8	8,9
16	11,8	12,5
17	12,3	12,0
10-17	14,8	10,7

Tabla 2-1. Comparación de Prevalencia en Talla Baja (porcentaje de individuos) en el ENSIN 2005 y el ENSIN 2010. Tomado del ENSIN 2010.

Respecto a la carga de esta enfermedad, la Talla Baja puede ser un factor de riesgo para problemas psicosociales, como la inmadurez social, la infantilización, la baja autoestima, y la intimidación (Sandberg, 2002). La Talla Baja durante los primeros tres años de vida está correlacionada negativamente con los resultados educativos de los niños, y a largo plazo está asociada negativamente a los niveles de ingresos y salarios obtenidos a futuro y la posibilidad de contraer enfermedades durante la niñez y la edad adulta (Gaviria, 2006).

Recientemente se han evaluado cuáles son los estudios bioquímicos necesarios para la valoración de niños con Talla Baja y a partir de estos se han realizado flujogramas que permiten una aproximación diagnóstica (Oostdijk, 2009) y descartar trastornos secundario del crecimiento. Dentro de estos laboratorios se incluyen los niveles de Hormona de Crecimiento, bajo una prueba de estímulo de producción, en la cual se ha encontrado que el 80% de los pacientes con un diagnóstico de Talla Baja son respondedores al *Test* (Strufaldi, 2005; Clayton, 2013). Además se evalúan los niveles séricos de IGF-I e IGFBP-3 los cuales son esenciales para el enfoque diagnóstico en relación con el eje GH- IGF I (Mezquita, 2003); de esta manera la proteína ALS participa de este eje, prolongando la vida media de IGF-I y mediando su función en los órganos blanco de crecimiento. Por definición, los niños con ISS tienen una secreción normal de GH, que casi siempre es

investigado por un test de estimulación farmacológica, la evaluación de la secreción de GH espontánea es rara vez incluida en la evaluación clínica de baja estatura. La deficiencia de hormona de crecimiento (DGH), representa una de las causas más frecuentes del hipocrecimiento armónico postnatal, estimando una incidencia entre el 5-20%, de los cuales el 20% de los casos de DGH se deben a factores ambientales o a anomalías anatómicas del eje hipotálamo-hipofisario lo que sugiere, la posibilidad de que una fracción significativa de los casos esporádicos tenga una base genética (Barros, 2012).

En el gran grupo de niños con ISS se incluye aquellos que presentan diversos grados de secreción de Hormona de Crecimiento (GH). En algunos de ellos se ha encontrado bajas concentraciones de Proteína de Unión de la Hormona de Crecimiento (GHBP) y niveles aún más bajos de IGF-I, lo que sugiere una Insensibilidad parcial a Hormona de Crecimiento (GHI). Por lo tanto, se considera existe una superposición entre los pacientes de ISS y aquellos con GHI parcial; la gran mayoría de niños con ISS tiene IGF-I en el rango bajo- normal y concentraciones normales de GH (Pedicelli, 2009). Se ha reportado deficiencia de IGF-I el 25-53% de los pacientes con Talla Baja (Clayton, 2013; Campos, 2011).

La importancia de la detección de mutaciones en genes asociados a la Talla Baja, como IGFALS, está relacionada por una parte con determinación de la etiología, lo cual permite proporcionar un asesoramiento genético y pronóstico a los pacientes y familiares, basados en los principios de la medicina personalizada (Dauber, 2014); y por otro lado, como publica Domené en el 2005 en el artículo denominado “Consecuencias endocrinas y metabólicas de la deficiencia de la subunidad ácidolabil del complejo circulante de los factores de crecimiento insulinosímiles”: la importancia de la detección de mutaciones en el gen IGFALS radica, principalmente, en evitar el tratamiento con rhGH, prácticamente inefectiva en producir aceleración del crecimiento y potencialmente perjudicial por el agravamiento de la insulinorresistencia. Además, en estos pacientes estaría indicado un seguimiento longitudinal prolongado para prevenir los efectos a largo plazo de la adquisición de una masa ósea insuficiente (Domene, 2005).

El gen IGFALS ha sido escasamente evaluado en población latinoamericana y no hay reportes sobre el estado, la frecuencia y su contribución en los pacientes con Talla Baja Idiopática en población colombiana.

3. Justificación

La Talla Baja Idiopática es una patología que afecta el desempeño del individuo en múltiples ámbitos, social, laboral e interpersonal. El diagnóstico etiológico de esta entidad puede permitir el asesoramiento adecuado y en muchas oportunidades el tratamiento más apropiado, para generar igualdad de condiciones del afectado frente a un individuo sano. La Talla Baja puede ser un factor de riesgo para problemas psicosociales, como la inmadurez social, la infantilización, la baja autoestima, y la intimidación (Sandberg, 2002; Wit, 2008).

La Talla Baja es una de las preocupaciones más frecuentes en los endocrinólogos pediátricos y otros especialistas (Cohen, 2008). A pesar de los estudios disponibles para realizar a estos pacientes hay un gran número de estos niños que permanecen sin diagnóstico definitivo y se diagnostican como Talla Baja Idiopática. Se estima que aproximadamente el 60 - 80% de todos los niños con Talla Baja se ajustan a la definición de ISS (Cohen, 2008).

En los últimos 10 años, con el empleo de nuevas tecnologías que ofrece la biología molecular se han caracterizado a nivel mundial, diversas mutaciones en el gen IGFALS, en niños y adolescentes de etnia diversa con Talla Baja Idiopática, por lo que esta enfermedad parece ser más frecuente de lo esperado (Domene, 2011). El estudio de Helen Storr (2015) reportó 23% de mutaciones en el eje GH-IGF (en el gen GHR, IGF1R y el 18,7% en el gen IGFALS). La disponibilidad del estudio molecular del gen IGFALS, permite caracterizar más pacientes con ISS causados por deficiencia de IGF-I circulante como consecuencia de la deficiencia de la proteína ALS. Las ventajas de este diagnóstico son las de proveer al paciente y a la familia de respuestas por la cual el niño no presenta un crecimiento normal y realizar una asesoría genética adecuada; pueden alertar de la clínica y de otras comorbilidades a las que el paciente puede estar en riesgo como la insulinoresistencia y la disminución de la masa ósea a largo plazo; y por último la etiología

puede tener implicaciones en la terapéutica, principalmente a la hora de definir el uso de la Hormona de Crecimiento Recombinante (rhGH), debido a la pobre respuesta evidenciada en estos pacientes y de las complicaciones que se pueden presentar a largo plazo dadas por la insulinoresistencia (Dauber, 2014; Domene, 2005).

ALS es el principal modulador de IGF I y a pesar de ello, es la proteína transportadora que ha recibido menos atención; su empleo reciente como marcador de la función de la GH, junto a IGF-I e IGFBP-3, en el diagnóstico de la insuficiencia somatotrófica del niño y el adulto, han hecho posible su determinación en el laboratorio clínico hormonal (Domene, 2005). Actualmente se desconoce el comportamiento de esta proteína en los pacientes con talla baja idiopática en Colombia y la presencia de las mutaciones en el gen IGFALS en el país.

4. Marco Teórico

4.1 Introducción

La talla baja es uno de los motivos de consulta más frecuentes de endocrinología pediátrica (J.M. Wit, 2011) y es la segunda causa de consulta en genética, constituyendo el 8% en Colombia (Acosta Guio, 2011) como lo muestra la tabla 4-1, lo que ha conllevado a la necesidad de generar algoritmos que permitan un abordaje y estudio diagnóstico de esta condición.

Diagnóstico	**Total**	**%**
Asesoría por antecedente de enfermedad genética	17	10
Baja Talla	14	8
Síndrome Down	14	8
Labio y paladar hendido	7	4
Retardo del desarrollo psicomotor	7	4
Microtia	6	4
Retardo mental	6	4
Apéndice preauricular	4	2
Braquidactilia	4	2

Tabla 4-1: Frecuencia de motivos de consulta en genética. (Tomado de Acosta Guio, 2011)

La evaluación genética de estos pacientes se ha enfocado hacia los genes que por estudios GWAS han demostrado que están relacionados con la talla, hasta el momento se han descrito 9500 SNP´s, pero se estima que son muchos más (Wood, 2014). El estudio genético molecular se debe realizar después de una adecuada anamnesis, examen físico,

estudios hormonales e imagenológicos que permitan orientar hacia una patología particular o clasificarse como una Talla Baja Idiopática (J.M. Wit, 2011).

4.2 Epidemiología

La Talla Baja se presenta con una prevalencia del 2-5% en la población mundial (Zahnleiter, 2013). Respecto a la población colombiana en específico, el porcentaje de niños con Talla Baja está alrededor del 13% (Figura 4-1). Tenemos datos de la prevalencia reportados en la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2005 (ENSIN 2005) y la Encuesta Nacional de Demografía y Salud (ENDS).

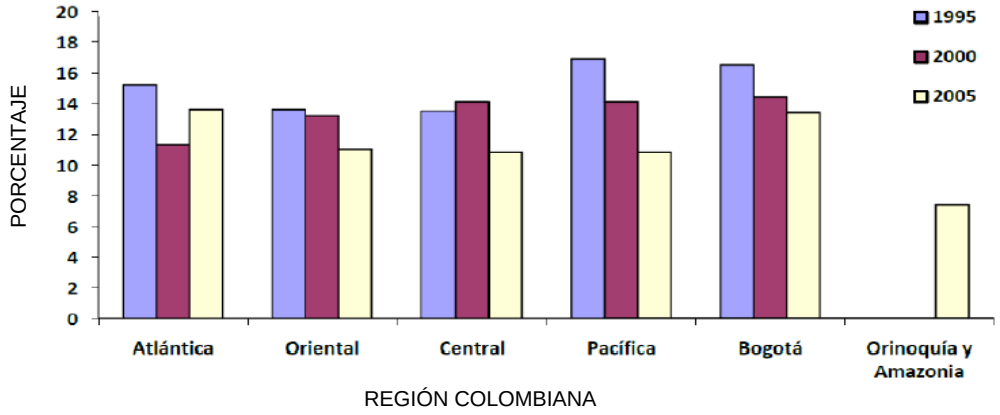


Figura 4-1: Prevalencia (%) de Talla Baja en encuestas nacionales (ENDS 1995, 2000 y ENSIN 2005), (Tomado de Neufeld L, 2014).

Los datos más recientemente reportados son de la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 (ENSIN 2010), acerca de la población residente en área urbana o rural de las 6 regiones, 14 subregiones, 32 departamentos de Colombia incluyendo Bogotá, comprendiendo una totalidad de 50.000 hogares. Se hizo un análisis de los datos con el patrón de crecimiento del Nacional Center for Health Statistics de los Estados Unidos (NCHS) de 1977 y el patrón de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2006, teniendo en cuenta como punto de corte para Talla Baja -2 SDS según las tablas.

Además de la valoración antropométrica y de la seguridad alimentaria, en esta encuesta se tomaron en cuenta marcadores bioquímicos como los niveles de hemoglobina, ferritina, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de ácido fólico, deficiencia de Zinc, deficiencia de vitamina A y deficiencia de Calcio.

La encuesta reporta una disminución progresiva en la prevalencia de la Talla Baja a nivel nacional como se observa en la figura 4-2.

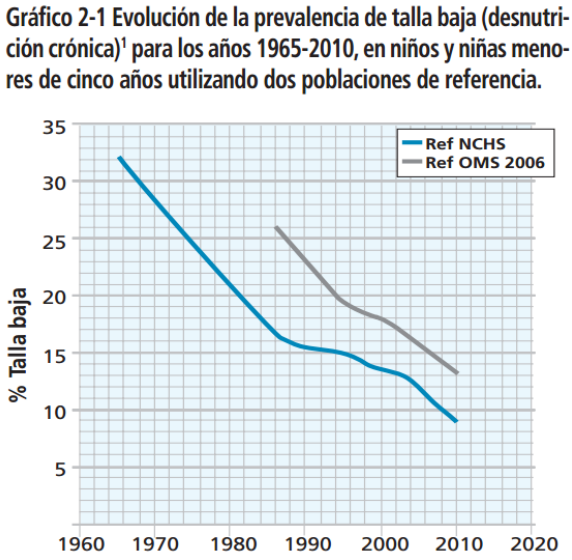


Figura 4-2: Prevalencia de Talla Baja según dos poblaciones de referencia. (Tomado de ENSIN 2010).

En comparación con los datos de 2005 la desnutrición crónica en Colombia se redujo de 15.9% a 13.2% y la desnutrición global paso de un 4.9 a 3.4%. Se estima que 1 de cada 10 niños y adolescentes tiene retraso en el crecimiento. Se encontró mayor prevalencia en el nivel del SISBEN 1 (13,4%), en niños con madre sin educación (24,1%) y en la población indígena (29%). Los departamentos, en donde es más alta la prevalencia de niños desnutridos son la Guajira (11,2%), Magdalena (6,8%), Chocó (6,3%) y Amazonas (5,8%) (ENSIN 2010).

4.3 Carga de la enfermedad

La Talla Baja puede ser un factor de riesgo para problemas psicosociales, como la inmadurez social, la infantilización, la baja autoestima, y la intimidación (Wit, 2008; Sandberg, 2002). La Talla Baja está correlacionada negativamente con (Sandberg, 2002):

- Los resultados educativos de los niños
- Los niveles de ingresos y salarios obtenidos a futuro
- La posibilidad de contraer enfermedades durante la niñez y la edad adulta

Los costos médicos directos que genera un paciente con Talla Baja son (calculados en dólares en Estados Unidos) (Lee, 2006):

- Costo de GH por miligramo $ 52
- Costo de la visita al médico $ 58
- Radiografía de edad ósea $ 17
- Tiroxina libre y la medición de tirotropina $ 74
- Determinación Factor de crecimiento similar a la insulina I $ 27
- Adicionalmente costos indirectos

4.4 Fisiología del Crecimiento según el eje GH- IGF I

El crecimiento lineal está influenciado por múltiples factores genéticos y ambientales que determinan la talla final del paciente. El crecimiento longitudinal está determinado por la proliferación y diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento epifisiaria de los huesos largos (Giustina, 2008). Este proceso está regulado por factores genéticos y hormonales que varían de acuerdo a las etapas del desarrollo. Estas etapas se pueden dividir en prenatal, lactante, infancia y adolescencia; durante las 2 primeras etapas, el crecimiento está determinado por acción del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF I e II), mientras que en la infancia y adolescencia el crecimiento está determinado por la Hormona de Crecimiento (GH) (Domene, 2005; Wood, 2014).

El crecimiento inicialmente puede ser muy rápido, a un ritmo de 25 cm / año desde el nacimiento hasta el primer año de edad, y luego moderada, con un promedio de 10 cm / año, desde la edad de 1 a 4 años. En particular, los niños normalmente crecen 12 cm

desde la edad de 1 a 2 años y 8 cm desde la edad de 2 a 3 años. La regla de los cinco años luego sugiere que disminuye la velocidad de crecimiento, entre 5-7 cm / año a partir de la edad de 4 a 8 años. Un segundo pico de velocidad de crecimiento se observa a los 11,5 años de edad de las niñas y 13,5 años de edad para los niños Norteamericanos, que se asocia con la pubertad con un crecimiento de 8 a 12 cm al año. El efecto de la Hormona del Crecimiento (GH) se produce en estas últimas 3 etapas de desarrollo y, junto con otros factores (por ejemplo, la hormona tiroidea, la nutrición, factores genéticos, estado general de salud), es fundamental para el crecimiento, mientras que las hormonas esteroides sexuales (es decir, la testosterona en los varones y los estrógenos en las niñas) contribuyen mayormente al crecimiento durante la pubertad (Pombo, 2011; Rogol, 2015).

El eje GH-IGF I juega un papel muy importante en el crecimiento humano, y la afección de cualquiera de sus componentes generará un retardo en el crecimiento (Walenkamp, 2006). La síntesis de la Hormona de Crecimiento está a cargo del Sistema Nervioso Central, por las células somatotropas de la adenohipófisis, las cuales son estimuladas por la Hormona Estimulante de Hormona De Crecimiento (GHRH) y Grelina e inhibidas por la Somatostatina (Giustina, 1998). Existen otras hormonas que influencian la secreción de GH como son esteroides sexuales, hormonas tiroideas y glucocorticoides (Takaya, 2000).

La GH viaja por el torrente sanguíneo ligada a la Proteína de Unión de GH (GHBP) y se une a su receptor específico (GHR) en los órganos blanco donde actuará (Amit, 2000) como el hígado, tejido adiposo, corazón, riñón intestinos, pulmones, páncreas, músculo esquelético y cartílago. Esta interacción de GH con su receptor específico, hace que se forme un dímero y se internalice el receptor, activando *Janus Tirosine Kinase* y las Proteínas Activadoras de Transcripción (STAT) (Fisker, 2006). El receptor de GH (GHR) se expresa en los condrocitos y osteoblastos y al activar ERK1 o 2 y MAPKs regula el crecimiento osteoblástico (Figura 4-3) (Huang, 2001; Giustina, 2008).

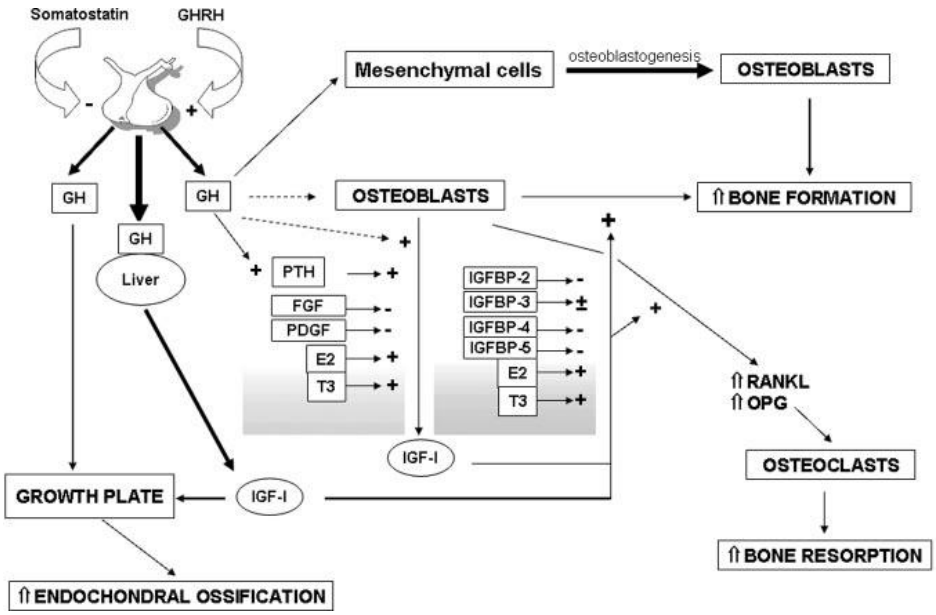


Figura 4-3: Factores involucrados en el eje GH-IGF I (tomado de Giustina et al. 2008)

En el hígado, la GH induce la síntesis de IGF I, por medio de la activación de STAT5, y aunque IGF I también se puede sintetizar en otros tejidos extrahepáticos (Morrison, 2007); más del 75% de la concentración sérica del IGF-I es producida por el hígado (Mezquita, 2003). En los condrocitos, IGF I es sintetizado bajo el control de GH, mientras que en osteoblastos es sintetizada bajo el control de la PTH (Giustina, 2008). IGF- I es trasportado en sangre periférica por las Proteínas de Unión de IGF (IGFBP) en su mayoría de tipo 3 y con la Subunidad Ácido Lábil (ALS) en un complejo de 150 KDa (Boisclair, 2001). Las IGFBPs tienen una afinidad diferencial por IGF-I e IGF-II y modulan el efecto celular de estas (Giustina, 2008). La IGFBP3 y la ALS son sintetizadas a nivel hepático y estimuladas por acción de la GH. Este complejo ternario permite prolongar la vida media de IGF y que este desarrolle su actividad endocrina (Figura 4-4). Solo el 1% de IGF se encuentra libre en sangre periférica (Boisclair, 2001).

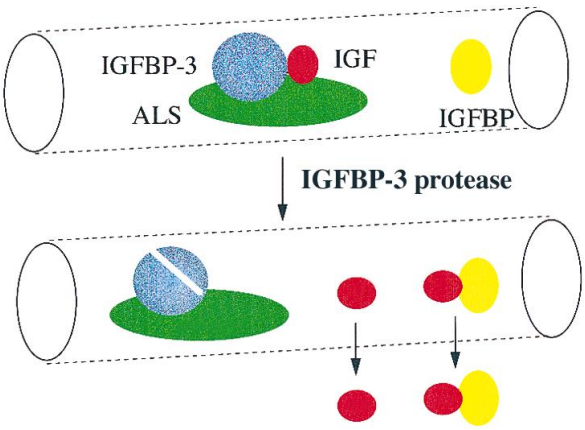


Figura 4-4: Formación del complejo ternario IGF I- IGFBP3- ALS (Tomado de Matthew M. Rechler et al.1998).

Una vez que IGF I llega a su órgano blanco, ya sea por efecto autocrino, paracrino o endocrino, es reconocido por su receptor específico IGF-IR, un receptor *Tirosin kinasa*. IRS-1 e IRS-2 median los efectos de IGF-I en los osteoblastos. IGF-I usa la vía del fosfatidilinositol-3 kinasa e induce la activación de AKT, y MAPK los cuales activan p38, *Jun-N-terminal kinases*, y ERK. En osteoblastos el IGF-IR es modulado por glucocorticoides y 1,25-dihidroxivitamina D3 (Domene, 2011). A nivel molecular, IGF-1 aumenta el factor de transcripción asociado a los osteoblastos, el Osterix, pero no el Cbfa-1/Runx-2. Además, el IGF-I, en combinación con las BMP-2, actúa de forma sinérgica sobre la expresión de Osterix (Francis, 2007).

IGF I actúa de forma bimodal, en una primera fase es un mitógeno autocrino preosteoblástico que estimula la proliferación y diferenciación y posteriormente se produce un segundo pico en el que estimula la acción del osteoblasto diferenciado, potenciando la formación y mineralización de la matriz y disminuyendo la degradación del colágeno (Mezquita, 2003). Estos efectos se dan por la activación del receptor de IGF I (IGF-IR) el cual genera una variedad de eventos celulares como (1) Enviar una señal mitogénica, (2) Proteger a las células de una variedad de lesiones de apoptóticas, (3) Promover el crecimiento del tamaño celular, (4) Desempeñar un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo transformado (5) Regular la adhesión celular y la motilidad celular (6) Inducir diferenciación terminal (Valentinis, 2001).

La proteína ALS circula a nivel periférico como una glicoproteína, perteneciente a la superfamilia de Repeticiones Ricas en Leucina (RRL), constituida por 605 aminoácidos y 7 motivos que son blanco de glicosilación, con un peso molecular de 85 KDa. Es sintetizada a nivel hepático por estímulo positivo de la GH (Domene, 2011). Esta proteína está

encargada de prolongar la vida media de IGF I para que sea posible su función endocrina. Cuando IGF I se encuentra de forma libre en sangre periférica, solo tiene una vida media de 10 a 12 minutos; la función de ALS conjunta con IGFBP3 es prolongar la vida media de IGF I, para favorecer su acción endocrina, por lo tanto la formación del complejo ternario IGF I - IGFBP3 - ALS prolonga la vida media de IGF I a más de 12 horas (Guler, 1989).

4.5 Métodos para valoración de crecimiento lineal

La evaluación del crecimiento lineal se realiza mediante toma de parámetros antropométricos como la talla, el peso, perímetro cefálico, relaciones de segmentos (envergadura, segmento superior e inferior), los cuales se ajustan de acuerdo a la edad y el género (Organización Mundial de la Salud OMS, 2014). Tal como se dicta en la Resolución N°2121 del 9 de Junio de 2010 de Colombia, se adoptan los patrones de crecimiento publicados por la Organización Mundial de la Salud en el 2006 -2007, para los niños, niñas y adolescentes de Colombia, de 0 a 18 años de edad (http://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_mintrabajo_rt240079.htm), por lo tanto para este estudio se tuvieron en cuenta estas tablas de crecimiento.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) presentaba patrones de crecimiento en 1977 de niños estadounidenses, las cuales se usaban como referencia para crecimiento de los niños independiente de su etnia; pero en 1997 surgió la idea de recomendar un enfoque que describiera cómo debían crecer los niños, en lugar de describir cómo crecían los niños y que se usara una muestra internacional para resaltar la similitud del crecimiento durante la primera infancia entre diversos grupos étnicos. Por tal motivo la OMS junto con *The National Center for Health Statistics*, llevaron a cabo el Estudio Multicéntrico sobre el patrón de Crecimiento (MGRS) entre 1997 y 2003, en Brasil, Estados Unidos, Ghana, India, Noruega y Omán, a fin de generar nuevas curvas para evaluar el crecimiento y el desarrollo de los niños a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud OMS, 2014).

“Los nuevos patrones de crecimiento infantil de la OMS proporcionan ahora información sobre el crecimiento idóneo de los niños: demuestran, por vez primera, que los niños nacidos en regiones diferentes del mundo a los que se ofrecen unas condiciones de vida óptimas cuentan con el potencial de crecer y desarrollarse hasta estaturas y pesos para la edad similares” (Organización Mundial de la Salud OMS, 2014).

La asociación Colombiana de Endocrinología, en conjunto con la Fundación Cardioinfantil y el Instituto *Karolinska* de Suecia, financiados por Colciencias, desarrollaron curvas de crecimiento específicas para la población colombiana, basados en el crecimiento de 27210 niños, entre 0 a 20 años, en las ciudades de Bogotá, Barranquilla, Medellín y Cali, las cuales se dieron a conocer en octubre de 2013 (Curvas Colombianas de Crecimiento ¿Cómo crecen los niños en Colombia), pero aún no está normatizado su empleo. Pero como se mencionó previamente la Resolución N°2121 del 9 de Junio de 2010 de Colombia dicta que se deben adoptar los patrones de crecimiento publicados por la Organización Mundial de la Salud en el 2006 -2007, para los niños, niñas y adolescentes de Colombia.

4.6 Talla Baja

La Talla Baja está definida como una estatura que se encuentra debajo de -2 desviaciones estándar, o menor al percentil 3, para la edad y el sexo, respecto a la población general (J.M. Wit et al, 2008; Pombo, 2011). Se estima que entre el 50 al 80% de los pacientes que tiene una talla entre las desviaciones -2 y -3 presentan una Talla Baja Familiar o un Retardo Constitucional del Desarrollo (J.M. Wit et al, 2008).

Para el abordaje de estos individuos es necesario realizar una adecuada anamnesis teniendo en cuenta el estado nutricional, psicosocial, historia de medicamentos o drogas, y todos aquellos factores medioambientales que puedan estar influenciando en el crecimiento. Los factores que intervienen en el crecimiento se pueden dividir en exógenos y endógenos como se muestra en la tabla 4-2.

Exógenos	Endógenos
Nutricionales Afectivos Ejercicio (la práctica regular de ejercicio adecuado es beneficioso, no así el de competición o alto rendimiento)	Genéticos (talla diana y patrón de desarrollo y maduración) Hormonales Étnicos Metabólicos Receptividad de los tejidos diana

Tabla 4-2: Factores involucrados en el crecimiento (tomado de Pombo et al. 2011)

Es necesario aclarar todos los antecedentes con énfasis en los perinatales, y siempre de manera dirigida en búsqueda de posibles síndromes asociados a Talla Baja. Es necesario indagar si el peso fue bajo al nacer (Pequeño para la Edad Gestacional) con Talla Baja que ha persistido, dado que mutaciones en los genes IGF1, IGFALS, IGF2 e IGF1R pueden tener como hallazgo clínico el Bajo Peso al Nacer (J.M. Wit, 2011).

La realización de pruebas complementarias será determinada de acuerdo a los hallazgos en la anamnesis y al examen físico que debe incluir todas las medidas antropométricas estandarizadas en tablas de normalidad para distintas poblaciones por edad y sexo además de una búsqueda activa de estigmas o dismorfias que orienten a un síndrome determinado (Pombo, 2011).

Algunos de los exámenes de laboratorio que se deben realizar como primera medida son descritos en la tabla 4-3.

Laboratorio	**Significado**
Sangre	
Hemoglobina	Anemia crónica
Ceatinina, albumina, sodio, potasio, calcio, fosfato, fosfatasa alcalina	Enfermedad renal, malabsorción, Raquitismo
IgA anti-endomisio, IgA anti-transglutaminasa, IgA Total	Enfermedad Celiaca
TSH y T4 Libre	Hipotiroidismo
Cariotipo, FSH	Síndrome Turner en Niñas
IGF-I, IGFBP-3	Primera tamización para deficiencia o resistencia a GH
Balance Acido-Base	Acidosis Renal Tubular
Orina	
pH, Glucosa, Proteínas, sangre	Enfermedad Renal

Tabla 4-3: Test de Laboratorios para la tamización del niño con Talla Baja (Tomado de Pedicelli, et al, 2009)

En la práctica clínica se continúan utilizando los términos de Talla Baja Familiar (TBF) y Retraso Constitucional del Crecimiento y Desarrollo (RCCD) para abordar de una forma práctica la Talla Baja Idiopática (Pedicelli, 2009).

El diagnóstico de Talla Baja Familiar se realiza por exclusión, debe considerarse que un paciente presenta Talla Baja Familiar cuando su peso y longitud son normales al nacimiento, tiene talla por debajo de –2 SDS para edad, sexo y población de referencia, antecedentes familiares de Talla Baja, proporciones corporales normales, velocidad de crecimiento normal, pubertad normal, edad ósea concordante, pronóstico de talla adulta semejante a talla diana, talla final baja y ausencia de enfermedad orgánica, endocrina, nutricional o carencia afectiva (Pombo, 2011).

Por otra parte, el Retardo Constitucional del Crecimiento y Desarrollo se ha descrito como un enlentecimiento en el ritmo de maduración, la clínica viene marcada por una longitud y peso neonatal normales, con una velocidad de crecimiento adecuada durante un periodo de tiempo variable, seguida de una desaceleración a partir de los 7-8 años con una ganancia anual que no supera los 3 cm/año, posteriormente el estirón y desarrollo, propios del periodo puberal, se retrasan 2-4 años con respecto a lo habitual, debutando con un retraso similar al de la edad ósea, la presentación de la pubertad se corresponde mejor con la edad ósea que con la edad cronológica. Una vez que se inicia la pubertad, la progresión de los caracteres sexuales y del crecimiento lineal sigue un ritmo normal (Pombo, 2011).

Al examen físico se deben considerar la desviación standard de la talla según la población, la velocidad de crecimiento, la talla respecto a la de los padres y todas las medidas antropométricas mencionadas previamente. Además al igual que la anamnesis el examen físico debe estar dirigido a buscar posibles signos asociados a síndromes específicos relacionados con la talla baja. También se debe calcular la talla medio parental, la cual se determina mediante la siguiente fórmula (Tanner, 1970)

$$\text{Talla diana Niños} = \frac{(\text{Talla padre} + \text{Talla madre}) + (13)}{2}$$

$$\text{Talla diana Niñas} = \frac{(\text{Talla padre} + \text{Talla madre}) - (13)}{2}$$

Existe otro método para predecir la estatura adulta, que es más preciso pero requiere pruebas paraclínicas. La estimación de la edad ósea a través del carpograma permite que se calcule la edad del paciente y de acuerdo a este valor ubicarlo en las tablas de crecimiento y seguir el carril correspondiente para predecir la talla final; este enfoque es más útil en niños con Talla Baja proporcional. En los niños con displasia esquelética y otras

formas de baja estatura desproporcionada, un extenso estudio del esqueleto puede ser necesario para la evaluación radiológica y diagnóstico preciso (Kant, 2007).

Entre alguna de las muchas clasificaciones de Talla Baja, en el artículo de Del Toro, et al, (2008) se encuentra la siguiente:

Talla Baja no patológica

- Familiar
- Constitucional

Talla Baja patológica

- Proporcional
  - Prenatal: Retardo en el Crecimiento Intrauterino, malformaciones genéticas.
  - Posnatal: factores endógenos.
  - Enfermedad orgánica (hormonal y no hormonal).
- Desproporcionada
  - Displasias esqueléticas
  - Cromosomopatías

La ESPE presenta una clasificación de la Talla Baja que parte de tres categorías que son; en primer lugar la falla primaria del crecimiento, en segundo lugar la falla secundaria del crecimiento y en último lugar la Talla Baja Idiopática. Las tablas a continuación representan la clasificación de la Talla Baja de acuerdo a la ESPE (Wit, 2007).

Síndromes clínicamente definidos:	**Pequeño para la edad gestacional (SGA) con falla en el catch-up**	**Displasias esqueléticas:**
1. Síndromes clasificados en otra parte: • 45,X/46,XY Trastornos del desarrollo sexual • 45,X Variantes de Síndrome Turner • Fenotipo de hombre con mosaico X/XY • Síndrome de deleción 18q • Síndrome Aarskog-Scott • Síndrome Bloom • Síndrome Cornelia de Lange • Síndrome DiGeorge y velocardiofacial • Síndrome Down • Síndrome Kabuki • Síndrome Noonan • Síndrome Prader-Willi-Labhart • Enfermedad neurofibromatosis tipo 1 • Síndrome Rubinstein-Taybi • Síndrome Silver-Russell • Síndrome Williams-Beuren • Otros síndromes específicos • Otros síndromes asociados con talla baja, inespecíficos	1. Desordenes clasificados en otra parte: • Deficiencia IGF-I • Resistencia a IGF 2. Debido a una causa conocida. Por ejemplo infección prenatal, drogas, tabaquismo, alcohol 3. Idiopática	1. Grupo de Acondroplasias • Acondroplasia • Hipocondroplasia • Otros desordenes específicos incluidos en este grupo (displasia tanatoforica, SADDAN) 2. Colagenopatias tipo II (defectos de COL2A1) • Displasia espondiloepifisiaria congénita • Otros desordenes específicos en este grupo 3. Displasia Mesomelica • Discondrosteosis (Leri-Weill y otros defectos en el gen SHOX. • Discondrosteosis Tipo Langer type • Otros desordenes específicos incluidos en este grupo 4. Grupo de Disostosis múltiple • Mucopolisacaridosis (tipo IH, IS, II–VII) • Mucolipidosis (tipo II y III) • Otros desordenes específicos incluidos en este grupo 5. Grupo de Displasias con disminución de la densidad ósea • Osteogenesis imperfecta • Otros desordenes específicos incluidos en este grupo 6. Grupo de Displasias con defecto de la mineralización • Hipofosfatasia • Raquitismo Hipofosfatemico • Otros desordenes específicos incluidos en este grupo 7. Desordenes incluidos en otros grupos 8. Otras displasias esqueléticas inespecíficas

Tabla 4-4: Clasificación de Talla Baja, falla primaria del crecimiento, de acuerdo a la ESPE (Wit, 2007).

Consumo insuficiente de nutrientes (malnutrición)	**Trastornos en sistemas y órganos**	**Deficiencia de hormona de crecimiento (secundario a deficiencia de IGF)**	**Otros desordenes del eje Hormona de crecimiento/ IGF (Deficiencia primaria de IGF-I y resistencia)**
	1. Desorden cardiaco 2. Desorden pulmonar 3. Desorden Hepático 4. Desorden Intestinal 5. Desordenes Renal 6. Anemia crónica 7. Desorden Multiorganico 8. Desordenes Muscular y neurológico 9. Enfermedades del tejido conectivo 10. Otros desordenes de órganos y sistemas específicos	1. Deficiencia congénita de Hormona de Crecimiento • Desordenes clasificados en otra parte: Síndrome de Fanconi renotubular, Síndrome Rieger y Kabuki • Asociado a otros síndromes complejos: displasia ectrodactilia-ectodermica, • Defectos genéticos conocidos: HESX1, LHX3, LHX4, PROP1, POU1F1, GHRHR, GH, otros defectos genéticos específicos • Asociados a malformaciones cerebrales o faciales • Asociado con infección • Asociado con otro desorden específico • Idiopática 2. Deficiencia de hormona de crecimiento adquirida • Craniofaringioma • Otros tumores de pituitaria. (Germinoma, hamartoma) • Tumores Craniales distantes del área pituitaria/hipotálamo • Tumores fuera del cráneo • Trauma de cabeza • Infección de sistema nervioso Central • Enfermedad Granulomatosa • Anomalía vascular • Otras causas inespecíficas	• Hormona de crecimiento bioinactiva • Anormalidades del receptor de GH • Anormalidades en las señales de transducción • Deficiencia de ALS (subunidad ácido-labil) • Deficiencia de IGF-I • Resistencia de IGF • Otros desordenes inespecíficos

Tabla 4-5: Clasificación de Talla Baja Secundaria según la ESPE (Wit, 2007)

Tabla 4-5: (Continuidad)

Otros desordenes endocrinos	Desordenes metabólicos	Psicosocial	Iatrogénica
1. Desordenes clasificados en otra parte: Cushing, Hipotiroidismo Leprechaunismo, DM 2. Estatura baja del adulto causada por aceleración en la maduración ósea 3. Otros desordenes específicos	1. Desordenes clasificados en otra parte: • Desorden en el metabolismo del calcio y fosforo 2. Desorden del metabolismo de los carbohidratos 3. Desorden en el metabolismo de los lípidos 4. Desorden en el metabolismo de las proteínas 5. Otros desordenes metabólicos específicos 6. Otros desordenes metabólicos inespecíficos	1. Deprivación psicosocial (emocional) 2. Anorexia nerviosa 3. Depresión 4. Otras causas psicosociales específicas	1. Terapia sistémica con glucocorticoides 2. Terapia local con glucocorticoides 3. Otra medicación 4. Tratamiento de malignidad de la infancia 5. Irradiación del cuerpo total 6. Otras causas iatrogénicas específicas

Talla baja Idiopática Familiar	Talla Baja Idiopática No Familiar
1. Con pubertad normal 2. Con retardo de la pubertad 3. El inicio de la pubertad aún no se conoce	1. Con pubertad de inicio normal 2. Con retardo del inicio de la pubertad (retardo constitucional del crecimiento) 3. El inicio de la pubertad aún no se conoce

Tabla 4-6: Clasificación de Talla Baja Idiopática según la ESPE (Wit, 2007)

Para poder evaluar estos pacientes dentro de un signo clínico tan inespecífico como es la Talla Baja, se han generado varios algoritmos, para abordar su estudio. La evaluación más aceptada actualmente es la propuesta por el American College of Medical Genetics (ACMG) (J.M. Wit et al, 2011) como se muestra en la figura 4-5.

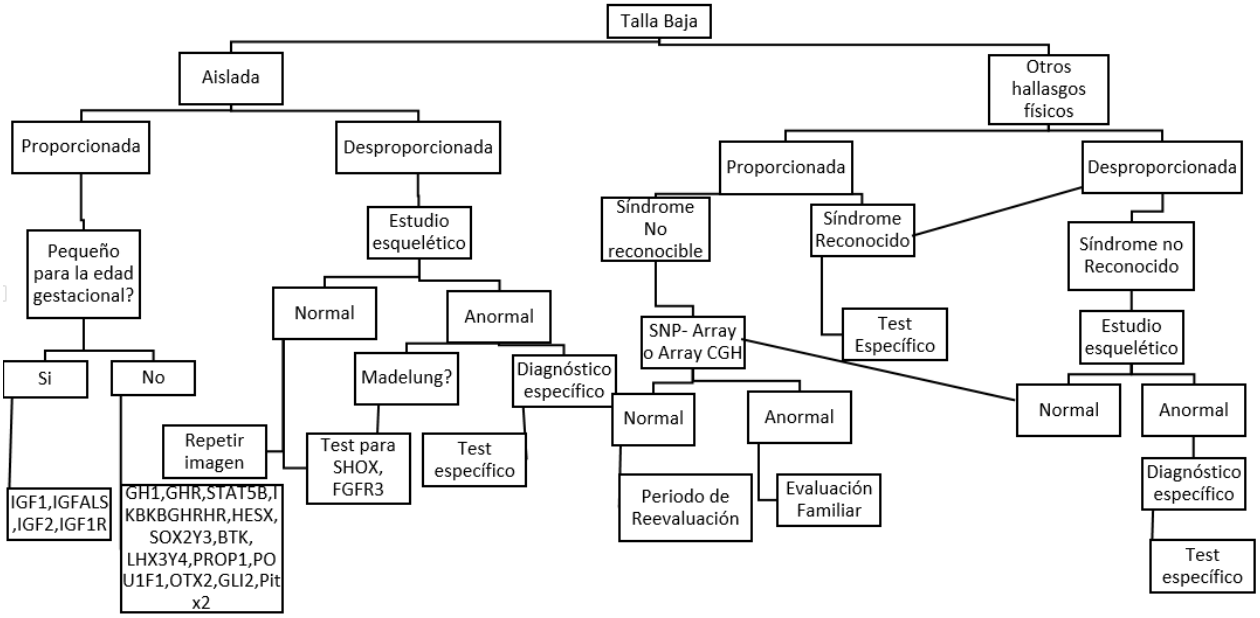


Figura 4-5: Algoritmo de la ACMG para estudio del paciente con talla baja (tomado de J. M Wit, 2011).

4.7 Talla Baja Idiopática

La Talla Baja Idiopática está definida como una estatura por debajo de - 2 Desviaciones Estándar en relación con la edad y ajustado para el género y población; además debe presentar armonía entre los segmentos corporales, exclusión de Síndromes genéticos, endocrinos y no presentar desordenes psiquiátricos (J.M. Wit et al, 2008).

ISS describe un grupo heterogéneo de niños que consiste en muchas causas no identificados de baja estatura (Lindsay, 1994). En aproximadamente el 80% de los niños que son referidos a una clínica pediátrica debido a la baja estatura, no es posible definir una causa establecida, incluso después de una evaluación diagnóstica completa, incluyendo un amplio screening bioquímico e investigaciones radiológicas (Wit, 2012; Lindsay, 1994)

La ISS debe subcategorizarse, principalmente sobre la base de criterios auxológicos. La distinción principal es entre los niños con historial familiar de baja estatura, cuyas alturas se encuentran dentro del rango de la talla final esperada por la talla de los padres y los

niños que tienen una talla baja de acuerdo a la talla de sus padres. ISS también debe clasificarse por la presencia o ausencia de retraso de la edad ósea, lo que indica la probabilidad de retraso en el crecimiento y la pubertad (Cohen, 2008).

La Investigación del eje GH-IGF I es muy importante en estos pacientes, y se requiere descartar la deficiencia de GH para realizar el diagnóstico de Talla Baja Idiopática (Growth Hormone Research Society, 2000). En un niño con criterios clínicos de deficiencia de GH y un pico de concentración de GH menor a 10 ng/ml es suficiente para el diagnóstico de Deficiencia de GH, y será excluido de Talla Baja Idiopática; además la medición de IGF I e IGFBP3 pueden ayudar en este diagnóstico, por lo cual también está indicado su estudio (Cianfarani, 2005). La Deficiencia de Hormona de Crecimiento (DGH), representa una de las causas más frecuentes del hipocrecimiento armónico postnatal (Barros, 2012). Aunque su frecuencia es difícil de establecer y puede variar en función de los criterios diagnósticos y origen étnico de la población, se ha estimado una prevalencia de al menos 1/3.480 niños (Lindsay, 1994). Estudios recientes han estimado una incidencia variable del 5-20% de DGH en una cohorte multiregional de 7.022 casos (edad 2-14 años) de Talla Baja (Giovenale, 2006; Barros, 2012).

Sin embargo existen autores como Waldman y Chia, quienes consideran que, las evaluaciones de crecimiento por endocrinólogos pediátricos tienen un sesgo inherente para la determinación de causas hormonales, particularmente del eje GH-IGF I, mientras que los estudios *GWAS* de estatura han revelado que los genes conocidos de este eje representan sólo una pequeña fracción de los *loci* donde las variantes comunes influyen en la altura; de ello se desprende que los defectos raros en un único gen, que se presentan con un pobre crecimiento, probablemente incluirá una proporción sustancial de genes que generalmente no se consideran (Waldman, 2013).

4.8 Genómica de la Talla Baja

Las pruebas genéticas juegan un rol muy pequeño en la evaluación estándar del endocrinólogo pediatra, con excepción de la evaluación de Síndrome Turner en mujeres y consideración de Deficiencia de SHOX o síndrome Russell- Silver (Dauber, 2014). Algunos autores como J Wit et al (2011) han propuesto algoritmos para el diagnóstico de subgrupos de pacientes con Talla Baja.

La estatura humana es un rasgo fuertemente genético, hasta el 90% de la variación en la altura dentro de una población está determinada por una combinación de múltiples factores heredados (Hirschhorn, 2009). Por este motivo se ha generado un interés en buscar cuales son las variantes genéticas determinantes de la estatura, cuáles genes están involucrados en este rasgo y pueden estar afectados en la Talla Baja Idiopática (Hirschhorn, 2009).

Algunas mutaciones resultantes en los extremos de la estatura han sido identificadas, pero son raros y no pueden explicar la variación normal de la estatura adulta (Palmert, 2003). Por lo tanto en el 2008 se iniciaron los estudios de *GWAS (Genome-Wide Association Study)*, Michael Weedon y colaboradores llevaron a cabo este estudio en 16.482 individuos, encontrando 20 variantes robustamente asociadas a la altura, con una contribución de ~ 0,2 y 0,6 cm por alelo, pero explican sólo ~ 3% de la variación en altura dentro de la población, de lo cual se concluyó que hay muchos más *SNPs* asociados a la altura que aún no se identificaron a partir de los estudios de asociación y aunque los *SNPs* explicarán algo de la variación residual, es posible que gran parte de la heredabilidad de altura se explicara por variantes raras o polimorfismos en el número de copias, que no se reconocen con este Método *GWAS* (Weedon, 2009). En el 2008 dos grupos más publicaron sus resultados, documentando en total más de 40 *loci* asociados con la altura (Gudbjartsson, 2008, Lettre, 2008).

En el 2010 la *GIANT Consortium* encabezado por Lango y un grupo extenso de expertos realizaron un meta-análisis de 46 estudios *GWAS* con un total de 133,653 individuos de ancestría europea, para identificar variantes genéticas comunes asociadas a la estatura; reportan un total de 180 *loci* que están asociados a este rasgo. Adicionalmente bajo un enfoque para encontrar conexiones biológicas, aplicaron el análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (*GSEA*) para evaluar las vías revelando 17 diferentes vías biológicas y 14 funciones moleculares para los genes asociados. Los 180 *loci* identificados tan solo explicaban el 10% de la variación de la talla en la población general. Una posible explicación, de este bajo porcentaje que determina la variación de la talla, es que muchas variantes comunes de pequeño efecto contribuyen a la variación fenotípica, y los estudios actuales (2010) *GWAS* tenían poco poder para detectar la mayoría de las variantes comunes (Lango Allen, 2010).

Una de las publicaciones más recientes en los estudios *GWAS* es del 2014, Andrew R Wood y colaboradores realizaron un meta-análisis de 79 *GWAS* en 253.288 individuos de ancestría europea encontrando 697 variantes con asociación genómica significativa que representan una quinta parte de la heredabilidad. Las variantes estaban agrupadas en 423 loci, los cuales se encuentran enriquecidos por genes, vías y tipos de tejidos que se sabe están involucrados en el crecimiento y se identificaron varios genes y vías que no estaban conectados previamente con el crecimiento del esqueleto humano, incluyendo mTOR, Osteoglicina y Fijación del Ácido Hialurónico. Este trabajo además evidenció que usando numerosas variantes se obtenía mayor asociación, así, ~2,000, ~3,700 y ~9,500 SNPs

explicaban ~21%, ~24% y ~29% de la varianza del fenotipo. Así mismo, todas las variantes comunes juntas podrían capturar hasta un 60% de heredabilidad de la estatura. Como conclusión de este estudio los autores proponen que la identificación de muchos cientos e incluso miles de variantes asociadas puedan seguir proporcionando información biológicamente relevante, y pueden identificar muchos genes nuevos y relevantes adicionales para las vías pertinentes en el crecimiento esquelético (Wood, 2014).

Partiendo de la premisa que existen diferencias en la distribución de altura entre diferentes poblaciones, además de los estudios realizados en ancestría europea, existen otros *GWAS* en otros grupos poblacionales como el publicado por Yukinori Okada y su equipo de trabajo (Okada, 2010). Evaluaron un grupo de 19,633 individuos Japoneses, identificando ocho *loci* asociados a la altura, entre ellos, el *locus* LHX3-QSOX2 era nuevo, además fue el primer estudio en reportar una asociación significativa de IGF-I con la altura mediante *GWAS*, lo cual en estudios previos en poblaciones caucásicas no se encontró. Esta observación, sugiere la presencia de diferentes orígenes genéticos de la altura humana en las distintas poblaciones y sería uno de los elementos de prueba de que existen numerosas variaciones de altura asociada con diferentes frecuencias de alelos entre poblaciones (Okada, 2010).

Meian He y un grupo científico del este de Asia realizaron, en 2015, un meta-análisis de *GWAS* en 93 926 individuos del este de Asia, basados en que los *loci* específicos de la población pueden existir debido a los patrones de desequilibrio de ligamiento diferentes. Identificaron 98 *loci*, incluidos 17 nuevos, asociados a la estatura, de estas variantes nuevas, 10 estaban comúnmente distribuidas en la población europea, y 7 eran de baja frecuencia en esta misma. En conjunto los *loci* encontrados explican el 8,89% de la varianza del fenotipo de la estatura de la población del Este de Asia (He, 2015).

Otro abordaje para el estudio y determinación de genes candidatos en la Talla Baja es el estudio de CNV´s patógenos por cariotipo molecular, los cuales han brindado nuevas oportunidades para identificar la base genética de varias enfermedades humanas monogénicas (Sharp, 2006). Zahnleiter realizó en 2013 el estudio 200 pacientes y sus familias afectados por ISS, identificando que el 10% de los pacientes portaban CNV´s con significancia patológica, localizados previamente por su participación en síndromes genéticos asociados a Talla Baja por estudios *GWAS* y otros identificados de Novo en el estudio. Los autores concluyen que sus resultados no sólo confirman la importancia de los resultados de los *GWAS* publicados, sino también sugieren un posible vínculo funcional entre las variantes comunes en la variación de crecimiento y las variantes raras que participan en el retraso grave del crecimiento, destacando un mayor efecto génico en la baja estatura (Zahnleiter, 2013).

Van Duyvenvoorde y colaboradores en el 2014 publicaron los resultados del análisis de 162 pacientes con Talla baja a quienes se les realizó *SNP array* en busqueda de *CNV´s.* Se identificaron *CNV´s* en 43 pacientes estudiados, 3.7% eran patogénicos conocidos, 23.5% potencialmente patogénicos, 0.6% en regiones no codificantes de comportamiento incierto, y el 73.5% de los pacientes tenían polimorfismos conocidos o no tenían ningún *CNV*. Estos hallazgos incluían 2 microdeleciones y 2 microduplicaciones en SHOX, y dos deleciones en 15q terminal que contenían a IGF1R. De los *CNV´s* potencialmente patogénicos se encontraron cinco que se encuentran cerca de *loci* asociados con la altura en *GWAS*: ADAMTS17, Prkg2 / BMP3, pappa,TULP4 y MKL2. Se les realizó modelamiento bioinformatico encontrando que podían estar relacionados con el fenotipo de la placa de crecimiento, lo cual incrementa el espectro de genes potencialmente involucrados en el crecimiento esquelético y que aún no han sido asociados (VanDuyvenvoorde, 2014).

Por último, lo más reciente en el estudio de pacientes con Talla Baja Idiopática, bajo la hipótesis de que las variantes genéticas no sinónimas raras pueden explicar algunos de estos casos, es el estudio de exoma o secuenciación exómica (Kim, 2012). Guo, Michael H. y su equipo de trabajo seleccionaron 14 pacientes con Talla Baja severa y a sus familias para el estudio de secuenciación exómica. Encontraron la causa genética en 5 pacientes debido a que presentaban estudio molecular compatible con Síndrome *Floating-harbor, Kenny-Caffey*, una forma progeroide de *Ehlers-Danlos* y 2 casos de síndrome 3-M. Además se propusieron variantes candidatas en los otros 9 pacientes, pero no se tenía información suficiente para justificar estas variantes como la causa de Talla Baja. De esta manera los autores afirman que la secuenciación del exoma proporciona la oportunidad de evaluar rápidamente las variantes de codificación en todo el genoma y puede ser muy ventajoso para el diagnóstico de síndromes raros monogénicos que son difíciles de diagnosticar clínicamente; mas sin embargo aclaran que este enfoque es eficaz en el contexto de síndromes genéticos definidos, pero en familias aisladas puede ser menos eficaz en la identificación de nuevas causas genéticas de baja estatura. Aplicado en la clínica, la secuenciación del exoma tiene el potencial de reducir la odisea del diagnóstico de los pacientes con Talla Baja severa, especialmente en los que tienen otras anomalías clínicas y / o bioquímicos indicativos de un síndrome genético (Kim, 2012).

4.9 Talla baja y el gen IGFALS

Se han identificado como causa de pacientes con Talla Baja asociado a IGF baja y GH normal o alta, alteraciones monogénicas en GH1 (GH bioinactiva) (Millar, 2003), GHSR (Receptor de Grelina) (Inoue, 2011), GHR (Receptor de GH) (Godowski, 1989), STAT5B (Kofoed, 2003), IGF1 (With, 1996), IGF1R (Abuzzahab, 2003) e IGFALS (Domene, 2004). Otras características que distinguen a estos casos son la falla de crecimiento prenatal,

microcefalia y retraso en el desarrollo tanto con IGF1 (With, 1996) e IGF1R (Abuzzahab, 2003), sordera neurosensorial con IGF1 (With, 1996), y la inmunodeficiencia con STAT5B (Kofoed, 2003). La deficiencia primaria de IGF-I también puede estar asociada con el efecto acumulativo de defectos digénicos u oligogénicos (J.M. Wit et al, 2008).

El gen IGALS, se encuentra localizado en la región 16p13.3 en sentido inverso y cuenta con 2 exones. El exón 1 consta de 97 pb que codifican para los primeros 5 aminoácidos de la proteína y aporta las dos primeras bases para la tripleta del sexto aminoácido de la proteína ALS; el exón 2, de 2019 pb, aporta el tercer nucleótido para la tripleta del sexto aminoácido y trascribe para los otros 599 aminoácidos conformando así una proteína total de 605 aa. Estos dos exones se encuentran separados entre sí por 1230 pb (Domené, 2011) (Figura 4-6).

Figura 4-6: Esquema de los exones del gen IGFALS transcrito IGFALS-001 ENST00000215539 recuperado de http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000007372;r=11:31806340-31839509;t=ENST00000419022

Hasta la fecha se han reportado 20 mutaciones del gen IGFALS en pacientes con Talla Baja Idiopática, de las cuales 17 están referenciadas en la Tabla 4-7 y en la figura 4-7. Otras mutaciones encontradas recientemente son la p.L127P (Hess, 2013), p.W431GfsX10 (Poukoulidou, 2014) y p.T145K (Schreiner, 2013).

Proteína	**Tipo de Mutación**	**Homocigoto/heterocigoto**	**Origen étnico**
p.E35KfsX87	*Frameshift,* codón de parada prematuro	Homocigoto	Argentino
p.D440N	*Missense*	Homocigoto	Turco
p.C540R	*Missense*	Compuesto	Noruego/Aleman
p.S195_R197dup	*In- Frame* Duplicación de 3 aminoácidos SLR	Heterocigoto	
p.N276S	*Missense*	Homocigoto	Español
p.Q320X	*Nonsense*	Homocigoto	Español
p.L497FfsX40	*Frameshift,* codón de parada prematuro	Homocigoto	Kurdo
p.L437_L439dup	*In- Frame* Duplicación de 3 aminoácidos LEL	Homocigoto	Maya
p.C60S	*Missense*	Compuesto	Judio/oriente
p.L244F	*Missense*	Heterocigoto	Polaco, Ruso, Australiano, Hungaro, Islandés, Francés, Ingles
p.L134Q	*Missense*	Homocigoto	Indio/Pakistaní
p.P73L	*Missense*	Compuesto	Judio Ashkenazi
p.L241P	*Missense*	Heterocigoto	
p.L134Q	*Missense*	Compuesto	Británico asiático
p.A183SfsX149	*Frameshift,* codón de parada prematuro	Heterocigoto	
p.P73L	*Missense*	Homocigoto	Británico asiático
p.L172F	*Missense*	Homocigoto	Sueco
p.L172F	*Missense*	Compuesto	Sueco
p.S195_R197dup	*In- Frame* Inserción de 3 aminoácidos SLR	Compuesto Heterocigoto	
p.N276S	*Missense*	Compuesto	Español
p.E35GfsX17	*Frameshift,* codón de parada prematuro	Heterocigoto	

Tabla 4-7: Mutaciones reportadas en el gen IGFALS, (tomado de Dómene, et al, 2011).

La frecuencia de las mutaciones se organiza así: Missense (56%), Frameshifts con codón de parada prematuro (25%), In-frame inserción (13%) y Nonsense (6%) (Domene, 2011).

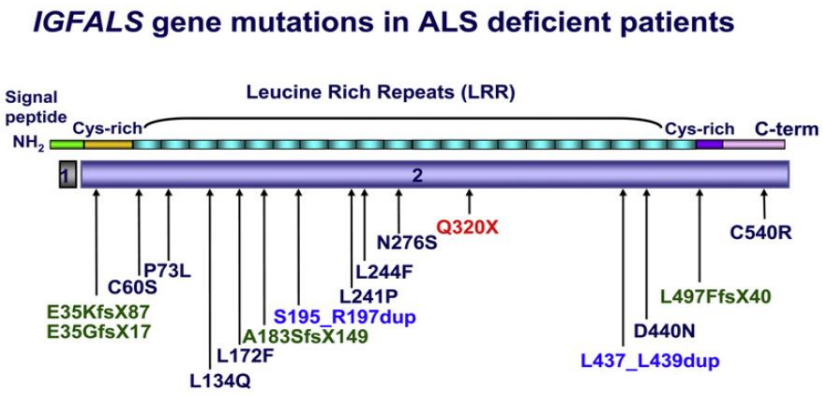


Figura 4-7: Mutaciones reportadas en el gen IGFALS. (Tomado de Dómene, et al, 2011).

En los pacientes que presentan estas mutaciones se encuentran niveles de IGF I; IGFBP3 y ALS por debajo de la media para la población general, habitualmente por debajo de -2 SDS (J.M. Wit et al, 2008; Domene, 2011).

Se han reportado niveles bajos de IGF-I en aproximadamente el 25-50% de los pacientes con ISS, lo que ha conllevado a proponer que IGFALS podría estar implicado en la etiología de la baja estatura en un subconjunto de estos niños con ISS (J.M. Wit et al, 2008, Domene, 2011). Attie, Kenneth M., et al, en 1995, realizaron el estudio en 511 pacientes con Talla Baja Idiopática (con test de estímulo de GH normal, es decir, mayor a 10µg/L) midiendo los niveles de la Proteína de Unión de Hormona de Crecimiento (GHBP) y los niveles de IGF I. De los 511 pacientes, 101 (20%) estaban sobre la línea o menor a -2 SDS de GHBP y además este mismo grupo de pacientes tenían valores de IGF menores a la media. Demostrando así que los niveles de GHBP están disminuidos en el 20% de los pacientes con Talla Baja Idiopática y estos niveles bajos están asociados a una insensibilidad a GH (David, 2011).

Partiendo de estos datos como antecedentes, Campos Barros en el 2011 valoró un grupo de 80 pacientes con ISS y con niveles bajos de IGF I y realizó estudio de secuenciación de los genes IGFALS, GHR, IGFBP3 e IGF1, encontrando que el 11,25% de los pacientes presentaban mutaciones en el gen de IGFALS indicando a este como el defecto molecular más frecuente en los pacientes con Talla Baja y déficit idiopático de IGF-I (Campos, 2011).

La proteína ALS hace parte de la familia de proteínas con Repeticiones Ricas en Leucina (LRR), contando con un total de 19 LRR además de 2 LRR ubicada en los dominios N-Terminal (LRRNT) y C- Terminal (LRRCT). Cuenta con 7 sitios susceptibles de glicosilación, formando así una glicoproteína en forma de herradura con una cara interna hidrofóbica (David, 2012).

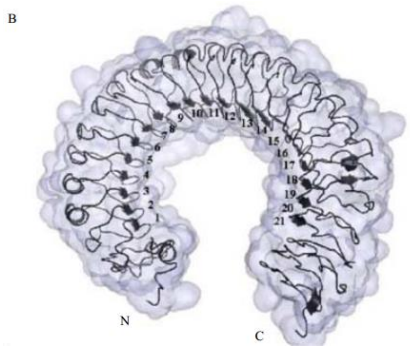


Figura 4-8: Modelamiento de la proteína ALS. Tomado de David, Alessia, 2012.

La proteína ALS es sintetizada a nivel hepático por estímulo de los Receptores de la Hormona de Crecimiento (GHR), al igual que ocurre con la Hormona de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF I) y sus Proteínas de Unión, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5 y IGFBP6 (Morrison, 2007). En la etapa perinatal IGF-I forma un dímero con IGFBP2, en la mayoría de las ocasiones, permitiendo el transporte de IGF-I a los órganos blancos, particularmente a la placa de crecimiento óseo. En etapas posteriores del crecimiento van aumentando progresivamente los niveles plasmáticos de estas proteínas (Wit, 2012), junto con la ALS, promoviendo que cerca del 80-90% de la proteína IGF-I se una a IGFBP3, el cual ha aumentado su afinidad por interacción con ALS (Wit, 2012), para formar un trímero de un peso de 150 KDa que permite prolongar la vida media de IGFI (Barrios, 2000), para que llegue a su blanco de interés y promueva el crecimiento y diferenciación celular.

Herbert Yu y colaboradores, en 1999, reportaron en una gran cohorte los rangos de referencia de IGF I, IGFBP-2, IGFBP-3 e IGFBP-6 y ALS en población normal, evaluando estas moléculas en el suero y plasma. Se observó un patrón similar de cambio asociado con la edad; los niveles de estas moléculas eran bajos al nacer y aumenta con la edad, con una mayor expresión en la pubertad, después de esta etapa los niveles disminuyen lentamente. Además, IGF-I, IGFBP-3 y ALS fueron ligeramente superiores en mujeres que en hombres (Yu, 1999). Esta información debe tenerse en cuenta para la evaluación de los pacientes de acuerdo a su edad y género.

Los niveles de ALS en pacientes con deficiencia de GH son menores respecto a los controles normales y se incrementan con el uso de terapia de hormona de crecimiento (Leung, 2001). La cuantificación de esta proteína presentó inconvenientes durante varios años debido a la interacción con otras proteínas similares en sangre, pero este problema se ha venido resolviendo con el uso de nuevas técnicas como ELISA, el cual ha permitido la detección de la proteína libre y conjugada en sangre circulante (Barrios, 2000). Además debe tenerse en cuenta que los niveles de ALS pueden estar disminuidos según el estado nutricional del paciente o en estados patológicos como diabetes, falla hepática o falla renal (Baxter, 1997).

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente el gen IGFALS y cuantificar los niveles de la proteína ALS en pacientes con Talla Baja Idiopática en Bogotá.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar las mutaciones en el gen IGFALS en una muestra pacientes con Talla Baja Idiopática ISS.
   1.1. Determinar la frecuencia de las mutaciones en los pacientes con ISS
   1.2. Comparar las mutaciones encontradas en Bogotá respecto a las descritas previamente en otras poblaciones
2. Caracterizar fenotípicamente una muestra de pacientes con ISS y mutaciones en el gen IGFALS
   2.1. Medir los niveles de ALS en sangre periférica y relacionarlos con las mutaciones encontradas en el gen IGFALS

6. Metodología

6.1. Tipo de estudio

Estudio descriptivo de corte transversal con base hospitalaria multicéntrico, de caracterización epidemiológica (prevalencia) y molecular (mutaciones) del gen IGFALS.

6.2. Muestra

A conveniencia se incluyeron en el estudio 53 individuos con diagnóstico de Talla Bbaja Idiopática, que decidieron voluntariamente participar en el estudio y quienes cumplen los criterios de inclusión, contando aquellos en quienes previamente se les descartó mutación en el gen SHOX por MLPA como otra causa de Talla Baja.

6.3. Definición de sujetos de estudio (muestra)

Los pacientes incluidos en el presente estudio tuvieron diagnóstico de Talla Baja Idiopática.

El origen de estos pacientes fue por remisiones de centros hospitalarios, Hospital Militar, Hospital La Misericordia, Centro Nacional de Endocrinología Pediátrica y del Adolescente (CENPA), Hospital Universitario San Ignacio, Centro Nacional de Endocrinología y Metabolismo (CENDEM), Laboratorio de Investigación Hormonal (LIH), Consulta

especializada en genética clínica del Instituto de Genética de la Universidad Nacional y un grupo de individuos que previamente fueron evaluados en el estudio de "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN SHOX Y SUS REGIONES REGULADORAS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ" y fueron negativos para mutaciones por MLPA en este gen.

Deberá diligenciarse un formato que contengan los datos relevantes del paciente para poder desarrollar la correlación de estos parámetros con mutaciones del gen IGFALS. (Ver anexo C).

Los criterios de inclusión son:

- Niños entre 2 y 16 años.
- Talla por debajo de - 2,0 desviaciones estándar (SD) ajustado para edad cronológica, género y población (Tablas de Crecimiento y Desarrollo estandarizada por los clínicos asociados al proyecto- Curvas de la OMS).
- Cariotipo convencional normal en pacientes de sexo femenino.
- Secreción normal de Hormona de Crecimiento (GH), valorada por un test de estímulo, adecuado para la edad.
- Estudio Molecular por MLPA en el gen SHOX con resultado negativo.

Los criterios de exclusión son:

- Cualquier tipo de displasia esquelética.
- Enfermedades crónicas (cardiopatías, nefropatías, neumopatías, DNT, enfermedades genéticas, enfermedades gastrointestinales, hipotiroidismo, cánceres, inmunodeficiencias).
- Deformidad de Madelung.

Todos los individuos que ingresaron al estudio dieron su asentimiento y sus padres o representantes diligenciaron y firmaron el consentimiento informado. (Ver Anexo B)

6.4 Procedimientos

1. Valoración antropométrica a partir de las curvas de crecimiento proporcionadas por la OMS en el 2006 (Ver Anexo A).

2. Toma de datos de acuerdo al formato de ingreso (Ver Anexo C)

3. Firma del consentimiento informado y asentimiento del paciente (Ver Anexo B)

4. Toma de muestra en sangre periférica, 7mL en un tubo con anticoagulante EDTA a cada uno de los pacientes.

5. Extracción de DNA con el kit UltraClean® Blood DNA Isolation Mo-Bio, según instrucciones del fabricante.

6. Amplificación de los exones del gen IGFALS y las zonas flanqueantes a estos, por PCR empleando los siguientes *primers* para el exón 1 diseñados por el Dr Domené (Domene, 2004), obteniendo un amplificado de 899 pb.

Exón 1:	*Forward*	GAGGCTTGTCTGAGGCACA
	Reverse	GTAGCCCCAAGGAAGCTCT

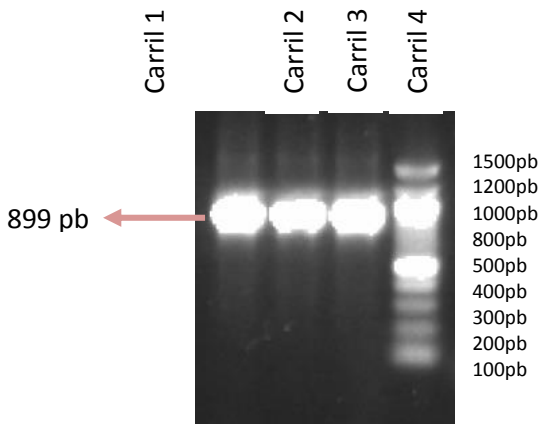


Figura 6-1: Gel de electroforesis, Agarosa al 1% con amplificados del exón 1. Carril 1: control normal; carril 2: Paciente ISS 07; carril 3: Paciente ISS 11; carril 4: Marcador de peso molecular.

Para el exón 2 se usaron los siguientes *primers* diseñados en Febrero de 2013, partiendo de la secuencia conocida del gen en las bases de datos Ensembl (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000007372;r=11:31806340-31839509;t=ENST00000419022) y NCBI (Homo sapiens chromosome 11, GRCh37.p10 Primary Assembly. (n.d.)), por medio de las herramientas *Primer* 3 (*Primer*3) y BLAST (*Primer*, 2010) obteniendo un amplificado de 2088 pb:

Exón 2:	*Forward*	ATCAGGCTCACTCGGGCA
	Reverse	CCTCCCTGGTTTCACGTT

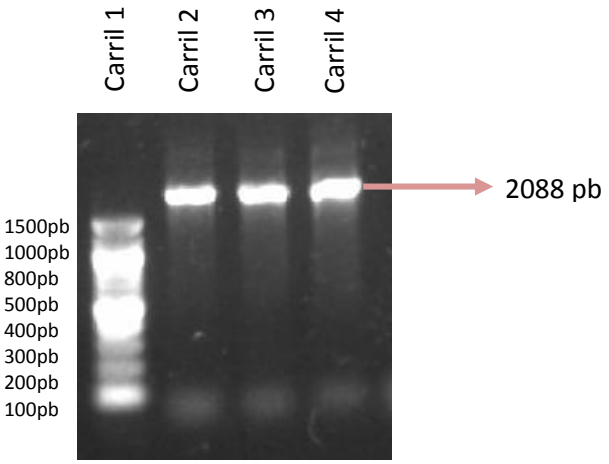


Figura 6-2: Gel de electroforesis, Agarosa al 1% con amplificados del exón 2. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: control normal; carril 3: Paciente ISS 07; carril 4: Paciente ISS 11.

Para la PCR se empleó el Kit de *GoTaq* DNA Polimerasa de Promega (Referencia M3005) y *GoTaq Hot Start* Polimerasa de Promega (Referencia M5005).

Los pasos para la realización de la PCR con un volumen de 50 µl son los siguientes:

1. Marcado de cada tubo de 200 µl con el código del paciente a analizar.

2. Preparar el *Master Mix* que contiene para cada reacción de 50 µl:
    a. 24,2 µl de Agua grado Biología Molecular
    b. 10 µl de 5X *Green GoTaq Flexi Buffer*
    c. 3 µl de $MgCl_2$ (25mM)
    d. 2,5 µl de dNTP´s (4mM)
    e. 1 µl de *Primer Forward* (10mM)
    f. 1 µl de *Primer Reverse* (10mM)
    g. 0,3 µl de *GoTaq Hot Start* Polimerasa (5u/ µl)

3. Mezclar bien por pipeteo.

4. Adicionar en el tubo de cada paciente un volumen de 42 µl de la *Master Mix*.

5. Adicionar a la preparación 8 µl de DNA del paciente dando previamente vortex y mezclar por pipeteo.

6. Se colocan las muestras en el termociclador.

   El ciclado de la PCR para ambos amplificados fue el siguiente:

Paso 1: 94°C durante 5 minutos

Paso 2: 94°C durante 45 segundos

Paso 3: 60°C durante 1 minuto

Paso 4: 72°C durante 2 minutos

Paso 5: 35 ciclos (Pasos 2 a 4)

Paso 6: 72°C durante 10 minutos

Paso 7: 15°C Mantener

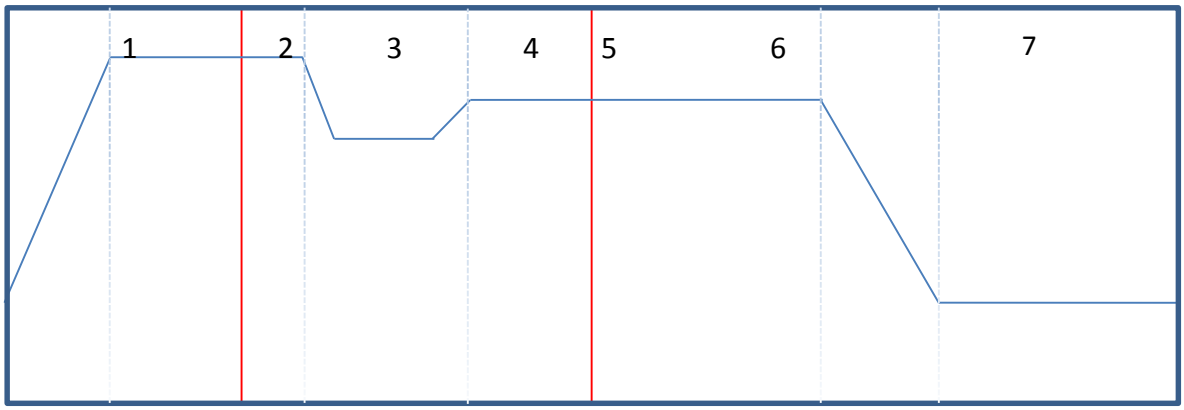


Figura 6-3: Ciclado de PCR

7. Purificación de amplificados con el Kit de Invitrogen®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

8. Secuenciación bidireccional de los fragmentos amplificados del gen IGFALS.

   El exón 1 se realiza la reacción de secuencia, *forward y reverse,* para cada muestra con los mismos *primers* diseñados para la amplificación inicial.

Para el exón 2 se realiza la reacción de secuenciación en el termociclador con cuatro *primers* para obtener secuencias que se superponen entre sí, con una longitud aproximada de lectura de 800pb. Los *primers* usados para la secuenciación son:

Fragmento 1:	*Forward*	ATCAGGCTCACTCGGGCA
Fragmento 2:	*Forward*	ACCTGGACCGCAACCTCA
	Reverse	TCCGCAGTGAGTTGTTCCT
Fragmento 3:	*Forward*	CGACTCTTCCTCAAGGACAAC

La secuenciación se realizó con el servicio de Macrogen utilizando tecnología de punta para la secuenciación del producto de PCR.

La secuenciación Sanger consiste en la incorporación de didesixinucleótidos marcados fluorescentemente a una cadena de ADN durante el proceso de copiado de la misma. Los didesixinucleótidos no poseen un grupo 3´-OH necesario para la formación del enlace fosfodiester que permite la unión entre nucleótidos, por lo tanto se interrumpe la elongación de la cadena cada vez que uno de estos es incorporado en ella. De este modo se generan secuencias de diferentes tamaños. Estas se hacen migran a través de un gel de poliacrilamida donde se separan por tamaños. El equipo de secuenciación cuenta con un dispositivo que permite captar la emisión de luz de los cuatro didesixinucleótidos. La lectura se hace entonces partiendo de las secuencias más cortas hasta la secuencia completa, y se genera un gráfico con picos de emisión de luz en la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de interés (cromatograma). (www.ivic.gob.ve/).

9. Comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias consenso en ENSEMBL con ID ENST00000215539; para la determinación de las mutaciones se realizó con el programa *Chromas Lite* de libre acceso.

10. Extracción de sangre en tubo seco tapa roja a los pacientes que asistieron a control tras los resultados de secuenciación.

11. Dejar en incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos previo a la centrifugación de la sangre a 2000 rpm durante 20 minutos.

12. Extracción de suero en tubos de 1.5 ml y almacenamiento a -70°C.

13. Medición de ALS por ELISA usando el Kit de ELISA de Mediagnost y siguiendo las instrucciones del fabricante.

1) Pipetear en todos los pozos 50 µl de Anticuerpo Conjugado (AK) diluido 1:50.

2) Pipetear en las posiciones A1 /2 50µL del standard A (0 mU / ml),

Pipetear en las posiciones B1 /2 50µL del standard B (1,5 mU / ml),

Pipetear en las posiciones C1 /2 50µL del standard C (6,25 mU / ml),

Pipetear en las posiciones D1 /2 50µL del standard D (12,5 mU / ml),

Pipetear en las posiciones E1 /2 50µL del standard E (25 mU / ml),

Pipetear en las posiciones F1 /2 50µL del standard F (40 mU / ml).

Para el control pipetear en las posiciones G1/2 y H1/2, 50µl del diluido en 1:150.

Pipetear en caca pocillo 50 µl de cada uno de las muestras diluidas 1:150.

3) Cubrir los pocillos con sealing tape e incubar la placa durante 2 horas a temperatura ambiente (agitar a 350 rpm) .

4) Después de la incubación aspirar el contenido de los pocillos y lavar 5 veces con 300µl de Buffer de Lavado WP.

5) Después de la última etapa de lavado pipetar 100 µl de Enzima conjugada EK en cada pocillo.

6) Cubrir los pocillos con sealing tape e incubar 0,5 horas a temperatura ambiente (agitación de 350 rpm).

7) Después de la incubación lavar los pocillos 5 veces con el buffer de lavado WP como se describe en el paso 4.

8) Pipetear 100 µl de la Solución de Sustrato S en cada pocillo.

9) Incubar la placa durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

10) Después de la incubación pipetear 100 µl de solución de parada (Stop solution) en cada pocillo SL.ho

11) Medir la absorbancia dentro de 30 minutos a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590 nm).

Para calcular se resta la absorbancia media del blanco de las absorbancias medias de todos los demás valores y se trazan las concentraciones estándar en el eje X vs los valores medios de la absorbancia de las normas sobre el eje y. La concentración de ALS en mU / ml de las muestras puede ser calculado por la multiplicación con el respectivo factor de dilución.

6.5. Estadística

Se realizó una estadística descriptiva de la información obtenida en el formato de recolección de datos incluyendo las medidas antropométricas tomada a los pacientes.

También mediante estadística descriptiva se analizaron los resultados de la secuenciación del gen IGFALS.

Además mediante correlación de Pearson se analizaron los datos de Talla – ALS e IGFI – ALS de acuerdo al género, en el grupo de pacientes que asistieron a control para toma de niveles séricos de ALS.

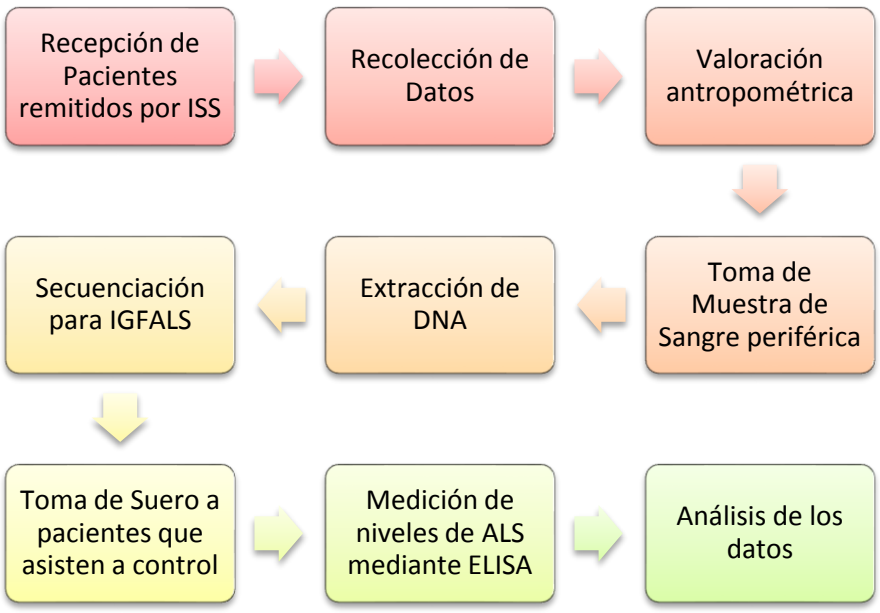


Figura 6-4: Diagrama de metodología.

7. CONSIDERACIONES ETICAS

El presente estudio cumplió con las normas éticas para la investigación en salud en Colombia, ciñéndose a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, resguardando la confidencialidad de los datos y la identificación de los participantes.

Para la inclusión de los pacientes en el estudio, se recolectaron los datos del mismo, los cuales fueron de completa confidencialidad y la información solo fue manejada por los investigadores.

El objetivo del estudio fue claro en el consentimiento informado y adicionalmente se le informó verbalmente a los pacientes y sus familiares, resolviendo toda aquella inquietud que surgieron. Obteniendo el asentimiento de los pacientes y el consentimiento de los padres o representantes.

La participación en este estudio representó un riesgo mínimo para la salud e integridad del participante y las molestias y efectos adversos estuvieron representados exclusivamente por la toma de muestras, referida en el procedimiento que incluyeron dolor mínimo, infecciones, sangrado y/o hematomas (morados). El riesgo de la toma de esta muestra de sangre es mínimo y no se han descrito situaciones adversas que afecten la salud del paciente como consecuencia de este procedimiento.

El manejo del paciente y de la información obtenida cuenta con la aprobación del centro, instituto o entidad en la que el paciente está llevando a cabo su tratamiento y se seguirán las normas establecidas por estos mismos.

8. Resultados

8.1 Descripción de la población estudio

En este estudio fueron incluidos 53 pacientes que asistieron a consulta de endocrinología pediátrica o consulta de genética al Hospital Militar Central, Hospital La Misericordia, Centro Nacional de Endocrinología Pediátrica y del Adolescente (CENPA), Hospital Universitario San Ignacio, Centro Nacional de Endocrinología y Metabolismo (CENDEM), Laboratorio de Investigación Hormonal (LIH) y Consulta especializada en genética clínica del Instituto de Genética de la Universidad Nacional.

Centro de Referencia	Número de Pacientes
Hospital Militar Central	22
Hospital La Misericordia	4
Centro Nacional de Endocrinología Pediátrica y del Adolescente (CENPA)	4
Hospital Universitario San Ignacio	3
Centro Nacional de Endocrinología y Metabolismo (CENDEM)	2
Laboratorio de Investigación Hormonal	5
Instituto de Genética de la Universidad Nacional	9
Otros	4
Total	**53**

Tabla 8-1: Sitios de remisión de la población estudio

Con respecto al origen de los pacientes el 74,55% son naturales de Bogotá y el 25,45% restante son de otros municipios del país.

Municipio de Procedencia	Número de pacientes
Bogotá	39
Ibagué	2
Neiva	3
Chía	2
Facatativá	2
Caparrapí	1
Apulo	1
Villavicencio	1
Tenjo	1
Icononzo	1
Total	**53**

Tabla 8-2: Municipios de origen de la población estudio.

Del total de 53 pacientes 35 son de género femenino (66,03%) y 18 del género masculino (33,96%). Con un promedio de edad de 8,7±3,6 años.

CODIGO	GENERO	EDAD (AÑOS)	EDAD GESTACIONAL (SEMANAS)	PESO NACER (g)	TALLA NACER (cm)	TALLA AL INGRESO (cm)	TALLA SDS	PESO (Kg)
ISS 01	F	10	36	3000	53	125	-3	22
ISS 03	F	9	35	2380	48	122	-2	25
ISS 04	F	10	36	2600	48	126	-2,5	23
ISS 05	F	12	40	2300	49	132.5	-3	31
ISS 07	F	10	39	3500	51	123	-3	N.D
ISS 08	F	9	39	3000	49	115	-3	20,5
ISS 09	M	11	38	3600	48	133	-2	28
ISS 10	F	4	40	3200	51	88.6	-3,7	12,7
ISS 11	M	13	37	2900	49	143	-2	16,5
ISS 12	F	6	40	3080	48	90	-5	13
ISS 13	M	4	27	940	35	90	-3,5	12
ISS 15	M	14	39	3100	50	146.8	-2,1	45,8
ISS 16	M	6	39	3060	49	105	-3	45
ISS 19	M	3	38	2420	47	90	-2,5	11,6
ISS 21	F	7	36	2378	45	112	-2,5	17,5

Tabla 8-3: (Continuación)

CODIGO	GENERO	EDAD (AÑOS)	EDAD GESTACIONAL (SEMANAS)	PESO NACER (g)	TALLA NACER (cm)	TALLA AL INGRESO (cm)	TALLA SDS	PESO (Kg)
ISS 22	F	4	37	1740	43	94	-3	12
ISS 24	F	11	40	2450	45	131	-2,5	27
ISS 25	M	6	42	3500	50	102	-3	16
ISS 27	F	11	42	3200	52	125	-2,7	28,5
ISS 28	F	11	40	3500	49	130.5	-2,5	28
ISS 29	F	8	40	2800	48	118	-2	25
ISS 30	F	2	38	2790	47	81	-3,6	11
ISS 32	M	12	40	3000	48	128	-3	33,5
ISS 33	F	9	39	2800	48	115.4	-3,5	21,5
ISS 34	M	4	39	2900	44	92.5	-2	14
ISS 36	F	8	36	2250	44	113	-3	22
ISS 37	F	15	40	2500	50	143	-3	45
ISS 40	F	4	37	2800	47	98	-2,5	13,5
ISS 41	F	2	40	2200	43	79	-2	8
ISS 42	M	15	38	3400	49	157.5	-2	51,6
ISS 48	F	14	39	2300	38	137	-3,2	37
ISS 49	F	7	40	2900	42	107	-2	17,8
ISS 52	F	11	38	2750	47	130	-2	25,2
ISS 53	M	10	39	2800	48	122	-2,5	25
ISS 54	M	6	40	2950	48	103.5	-2	11
ISS 56	F	10	40	4500	51	128.5	-2,3	28,3
ISS 57	M	9	41	3600	53	120	-2,7	23
ISS 59	M	13	40	3700	47	141	-2,7	34,5
ISS 64	F	6	39	3550	54	105.3	-2,6	16,8
ISS 65	F	8	36	2600	48	117.5	-4	21,8
ISS 67	F	10	34	1800	44	131	-2	27,5
ISS 68	M	14	36	2080	48	144	-2,5	36
ISS 69	F	4	38	3070	50	94	-3	13
ISS 70	F	11	39	3800	49	127	-2,5	28
ISS 73	M	5	40	3235	49	100	-2,5	16
ISS 74	F	15	40	2300	N.D	138	-3,8	52,5
ISS 75	F	8	40	2740	47	109.3	-3,5	16
ISS 77	F	10	38	3500	51	121	-2	24
ISS 78	F	6	37	3600	50	103	-2,4	16
ISS 79	F	7	40	3000	N.D	111	-3	18
ISS 80	M	6	37	2970	48	103	-2,4	16
ISS 81	F	12	40	3000	50	126.5	-4	25
ISS 82	M	13	40	N.D	N.D	126	-4	129

Tabla 8-3: Datos de sexo, edad de ingreso al estudio, edad gestacional, peso y talla al nacer, talla, SDS y peso a ingreso al estudio. N.D: No se dispone del dato.

Se tuvieron en cuenta pacientes tanto con bajo peso, el 15,38%, como con peso normal al nacer, 84,61%. En el grupo de las niñas el promedio del peso al nacer fue de 2856,88 g. y de la talla fue de 47,8 cm; mientras que en los niños el promedio del peso al nacer fue de 2950,29 g. y la talla fue de 47,6 cm.

En la tabla 8-4 se describen los datos de la talla de la población estudio. El promedio de la talla fue de -2,52 SDS para ambos sexos teniendo en cuenta el género y la edad según las tablas de crecimiento de la OMS. Para las niñas el promedio de la talla fue -2,62±0.53 y para los niños de -2,33±0.35.

	SDS Talla	**SDS Talla Niñas**	**SDS Talla Niños**
Total de Pacientes	**53**	**35**	**18**
Media	-2.52	-2,62	-2,33
Mediana	-2	-3	-2
Moda	-2	-2	-2

Tabla 8-4: Media, mediana y moda de las SDS de la talla.

8.2 Análisis Molecular

Para el análisis molecular de los pacientes se realizó amplificación mediante PCR de los exones 1 y 2 del gen IGFALS, que codifican para la isoforma canónica de la proteína ALS, los cuales posteriormente fueron secuenciados y sus resultados fueron comparados con la secuencia consenso reportada en las bases de datos (NCBI y ENSEMBL).

Algunos datos de las variantes se pueden encontrar en *Ensembl genome browser 75: Homo sapiens - cDNA sequence - Transcript:* PAX6-201 (ENST00000419022). (n.d.). Extraido de http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000007372;r=11:31806340-31839509;t=ENST00000419022

En el exón 1 se encontró el SNP rs3817902 ubicado a -19 bp, con cambio de una Adenina por una Guanina, (c.-19A>G), a una distancia de 1645 pb corriente abajo del promotor.

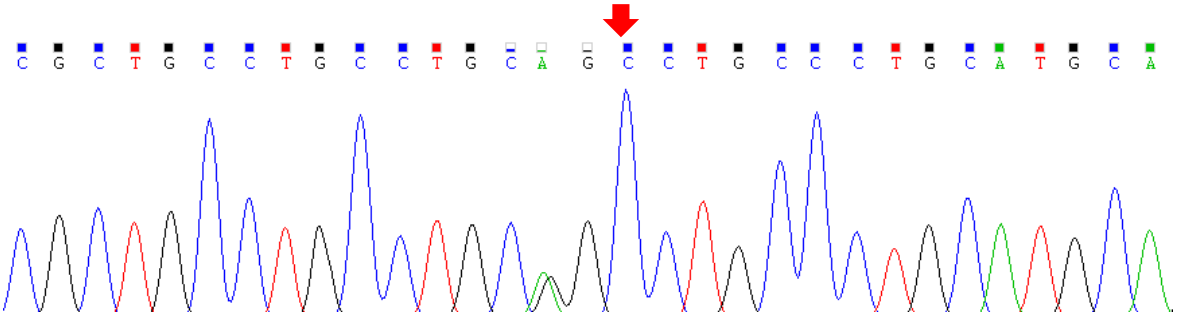


Figura 8-1: Electroesferograma de la variante c.-19 A>G

En el exón 2 se encontraron las variantes sinónimas rs189350550, rs3751893, rs35632685 y rs17559.

El SNP rs189350550 está ubicado a 99 pb, con cambio de Guanina por Adenina, c.99G>A.

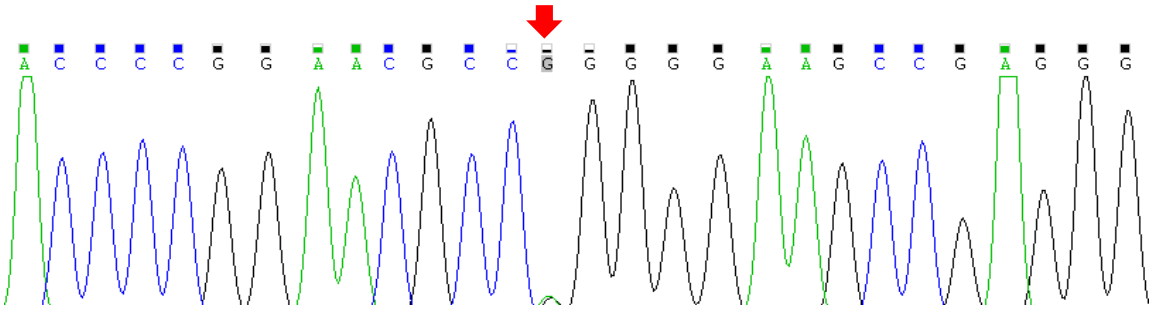


Figura 8-2: Electroesferograma de la variante c. 99G>A

La variante rs3751893 está localizada a 210pb, con un cambio de una Timina por una Citosina, c.210 T>C.

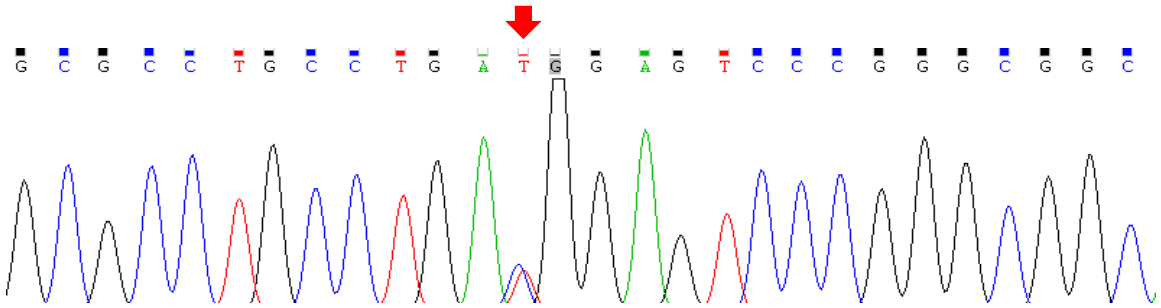


Figura 8-3: Electroesferograma de la variante c.210 T>C

El SNP rs35632685 con una localización a 915bp, con cambio de una Guanina por una Adenina c.915G>A.

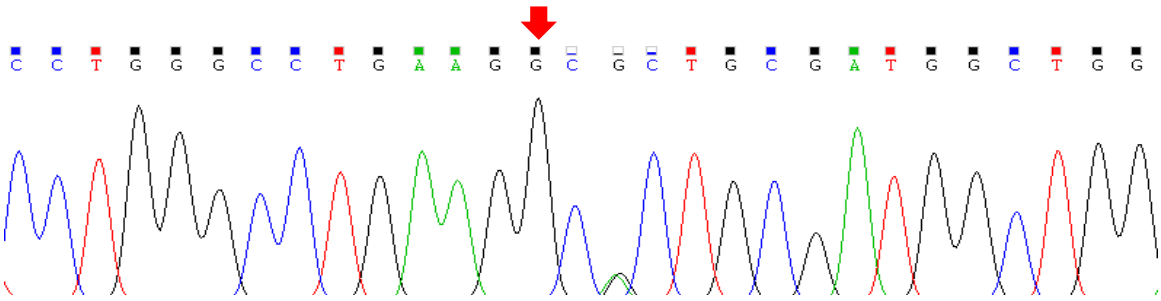


Figura 8-4: Electroesferograma de la variante c.915 G>A

El SNP rs17559 ubicado a 1500bp, con cambio de una Citosina por una Timina c.1500C>T.

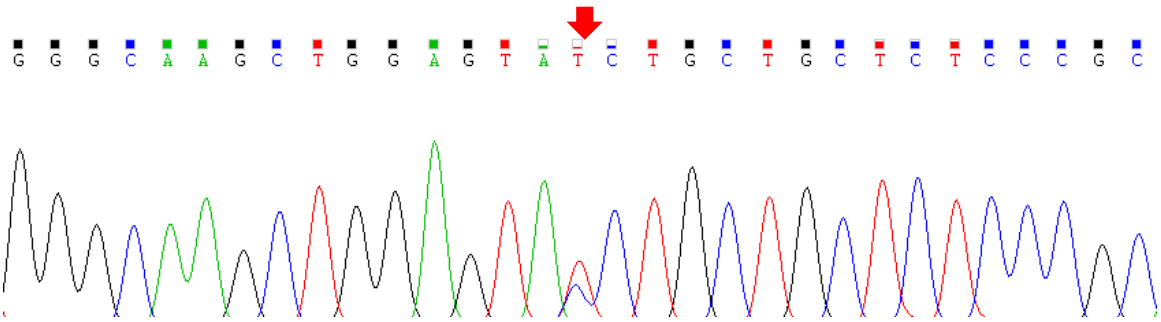


Figura 8-5: Electroesferograma de la variante c.1500 C>T.

De los 53 pacientes analizados 67,92% tienen variantes sinónimas en el exón 1, el 24,5% tienen variantes sinónimas solo en el exón 2, el 67,92% tienen variantes en ambos exones, el 9,43% tienen 3 o más variantes y el 7,54% no tienen ninguna variante o mutación.

CODIGO ISS	VARIANTES EXON 1	VARIANTES EXON 2
ISS 01	-19AA>GG	210 TT>CC
ISS 03	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 04	-19 AA>AG	210 TT>TC
ISS 05	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 07	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 08		210 TT>TC
ISS 09	-19 AA>AG	210 TT>TC
ISS 10	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 11	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 12	-19 AA>AG	210 TT>CC 915 GG>AG
ISS 13		210 TT>CC
ISS 15		210 TT>TC 1500 CC>CT
ISS 16	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 19	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 21		
ISS 22		210 TT>CC
ISS 24	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 25	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 27	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 28	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 29	-19 AA>AG	210 TT>TC
ISS 30	-19 AA>GG	210 TT>CC 1500 CC>CT
ISS 32	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 33		
ISS 34	-19 AA>AG	210 TT>TC
ISS 36		210 TT>TC 915 GG>AG
ISS 37	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 40	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 41	-19 AA>AG	210 TT>TC
ISS 42		
ISS 48		210 TT>CC
ISS 49	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 52	-19 AA>GG	210 TT>CC 1500 CC>CT
ISS 53	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 54	-19 AA>AG	210 TT>TC
ISS 56	-19 AA>AG	210 TT>CC 915 GG>AA
ISS 57		210 TT>TC
ISS 59		210 TT>CC
ISS 64	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 65	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 67	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 68	-19 AA>GG	99 GG>GA 210 TT>CC 1500 CC>CT

Tabla 8-5: (Continuación)

CODIGO ISS	VARIANTES EXON 1	VARIANTES EXON 2
ISS 69	-19 AA>AG	210 TT>CC
ISS 70	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 73	-19 AA>GG	210 TT>CC
ISS 74	-19 AA>AG	210 TT>TC
ISS 75		210 TT>TC 915 GG>GA
ISS 77	-19 AA>AG	210 TT>CC
ISS 78		210 TT>TC
ISS 79		210 TT>CC 915 GG>GA
ISS 80		210 TT>CC
ISS 81		210 TT>TC
ISS 82		

Tabla 8-5: Variantes encontradas en cada paciente

En la tabla 8-6 se muestra la frecuencia del la unica variante encontrada en el exón 1, la variante -19 A>G discriminada entre heterocigotos y homocigotos.

Exón 1

	Frecuencia	Porcentaje
Ninguna	17	32,07
-19 AA>AG	11	20,75
-19 AA>GG	25	47,16
Total	53	100

Tabla 8-6: Frecuencia de la variante -19 A>G en estado homocigoto y heterocigoto.

En la Tabla 8-7 se muestra la frecuencia de la variante c.210 T>C, la cual es la más común en la población estudiada, con una frecuencia de 92,45%.

Exón 2 Variante 210 TT>CC

	Frecuencia	Porcentaje
No Tiene la variante	4	7,54
210 TT>CC	35	66,03
210 TT>TC	14	26,41
Total	53	100

Tabla 8-7: Frecuencia de la variante c.210 T>C en estado homocigoto y heterocigoto.

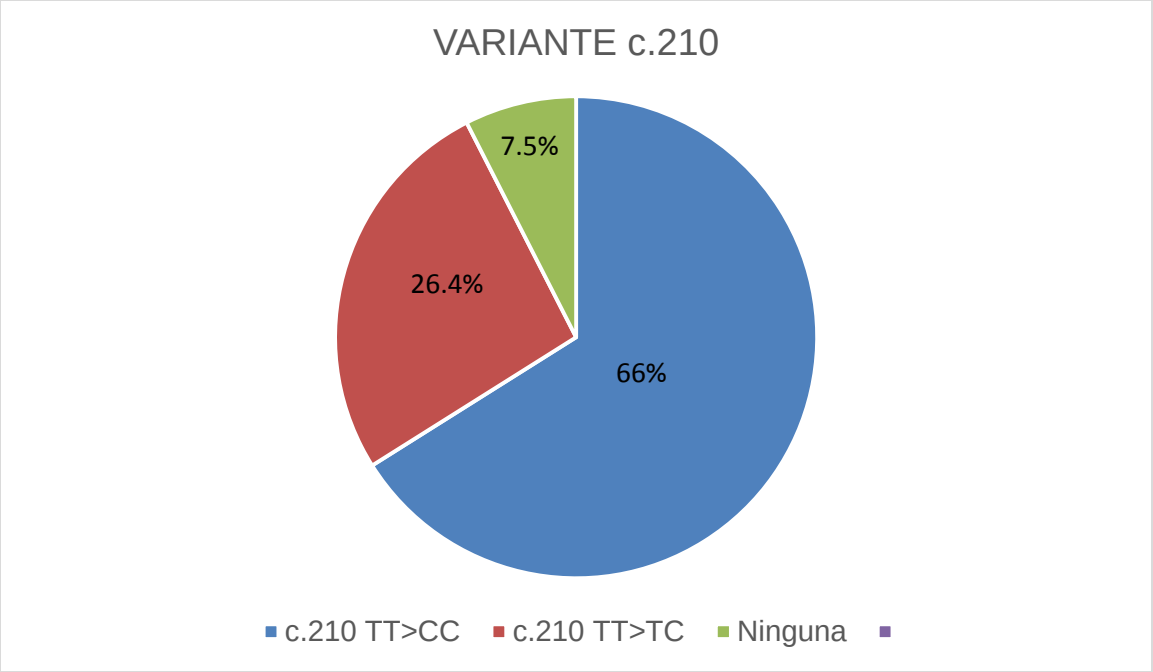
En la tabla 8-8 se observa la frecuencia las otras variantes menos comunes en el exón 2. Se evidencia que el 18.2% de los pacientes portan una variante diferente a la c.210 T>C.

Exón 2

	Frecuencia	Porcentaje
No tiene ninguna de las siguientes	44	83,01
1500 CC>CT	4	7,54
915 GG>AA	1	1,88
915 GG>GA	4	7,54
99 GG>GA	1	1,88

Tabla 8-8: Frecuencia de las otras variantes además de la c.210 T>C en el exon 2.

En la figura 8-6 se representan las frecuencias de las variantes del exón 2. En la torta superior se muestra la frecuencia de la variante más abundante del exón 2 que es la c.210 T>C. En la torta inferior se plasman solo las variantes menos frecuentes.



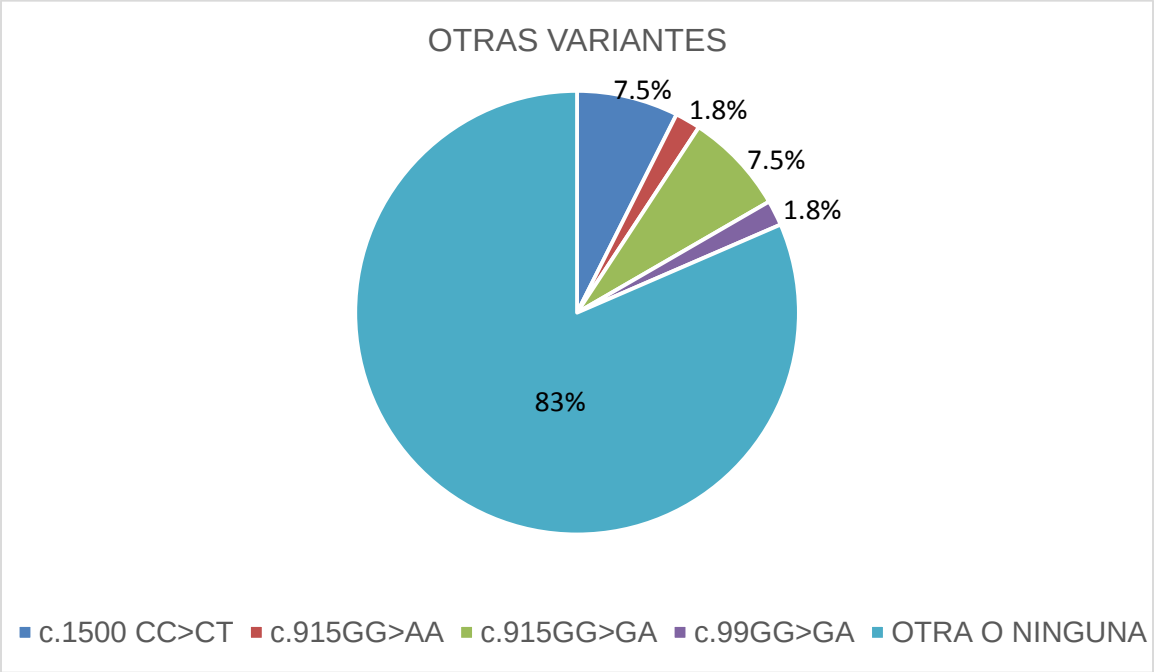


Figura 8-6: Diagrama de frecuencia de las variantes del exón 2.

8.3 **Medición de ALS**

Para la descripción bioquímica y radiológica de los pacientes, se tomaron 29 individuos, de los cuales se disponían niveles de IGF I y otros paraclínicos relevantes para el estudio de talla baja. Además se tomaron los niveles de ALS mediante la técnica de ELISA para determinar el efecto de las variantes encontradas sobre la expresión de la proteína. Estos paraclínicos se documentan en la tabla 8-9.

ISS	SEXO	EDAD	DIFERENCIA EDAD CRONOLÓGICA – EDAD ÓSEA	IGF I (ng/ml)	SDS de IGF I	IGFBP 3 (µg/ml)	SDS de IGFBP3	ALS (mU/ml)
ISS 07	F	10	0	218	-1	N.D	-	2286,36
ISS 11	M	13	0,1	462	0	N.D	-	4750,45
ISS 12	F	6	N.D	327	+2	N.D	-	4792,49
ISS 21	F	7	-0,2	298	+1	4,8	+1	3071,34
ISS 22	F	4	-0,2	40,5	-2	N.D	-	2373,59
ISS 25	M	6	-2	78	-1	N.D	-	5203,24
ISS 29	F	8	N.D	536,1	+2	N.D	-	5276,33
ISS 33	F	9	-1,1	107	-1	7,9	+2	7832,17
ISS 34	M	4	-1,4	134	+1	3,7	-	2281,33
ISS 37	F	15	2	480	+2	N.D	-	3393,86
ISS 40	F	4	-1,2	30	-2	N.D	-	1115,87
ISS 41	F	2	-0,8	134	+1	N.D	-	1370,55
ISS 52	F	11	N.D	420,4	+2	N.D	-	14290,01
ISS 53	M	8	-0,6	89	-1	4,1	0	5562,76
ISS 54	M	6	-1,3	151	0	N.D	-	4283,26
ISS 57	M	9	-1	146	0	4,3	0	3396,35
ISS 61	M	6	-2,6	35,5	-2	1,6	-2	3907,66
ISS 65	F	8	-1,5	446,7	+2	8,1	+2	3722,81
ISS 67	F	10	1,9	143	-1	9,1	+2	4147,10
ISS 68	M	14	1,8	339	0	7,2	+2	5253,14
ISS 69	F	4	-0,6	36	-2	4	+1	4902,82
ISS 70	F	11	-1	138	-2	2,9	-2	4859,81
ISS 75	F	8	-1,3	29,1	-2	N.D	-	1491,30
ISS 77	F	10	-1	115	-1	N.D	-	2146,45
ISS 78	F	6	N.D	47	-2	N.D	-	2406,94
ISS 79	F	7	-1,5	134,4	-1	N.D	-	1489,11
ISS 80	M	6	-1	34,8	-2	2,2	-2	2435,38
ISS 81	F	12	-1,8	193	-1	4,76	0	3620,38
ISS 82	M	13	-1,4	83	-2	2,83	-2	1972,66

Tabla 8-9: Carpograma, IGF I, IGFBP3 y ALS. N.D: No se dispone del dato.

El promedio de la madurez ósea para las niñas fue de -0.55±0.8 años y para los niños fue de – 0.94±0.8 años respecto a la edad cronológica. El dato no se obtuvo en 4 de los 29 pacientes de este subgrupo.

Respecto a los niveles de IFG I, IGFBP3 y ALS se presentó una amplia variabilidad entre pacientes, en las niñas el promedio de IGF I fue de -0,31±2.7 SDS y de IGFBP3 fue de 0,57±0,6 SDS, y en los niños el promedio de IGF I fue de -0,7±1.1 SDS y de IGFBP3 fue de 0,66±2.8 SDS. Los datos totales de la población estudiada se observa en la tabla 8-10.

	IGF I	**IGFBP3**	**ALS**
Total analizados	**29**	**13**	**29**
Media	-0.44	0.15	3918.46
Mínimo	-2	-2	1115
Máximo	2	2	14290

Tabla 8-10: Media, mínimo y máximo de las desviaciones estándar de IGF I y IGBP3 y los niveles de ALS en mU/ml.

En la tabla 8-11 se aprecia cada uno de los valores de ALS en el grupo de pacientes a los cuales se les cuantificó esta proteína por ELISA, observando que el 29.9% de los pacientes tenían valores dentro de los niveles de referencia suministrados por la manufactura del kit, tomada en población adulta; el 70.1% restante tenían niveles más altos respecto a las referencias suministradas.

Código ISS	Niveles de ALS
ISS 40	1115,87
ISS 41	1370,55
ISS 79	1489,11
ISS 75	1491,3
ISS 82	1972,66
ISS 77	2146,45
ISS 34	2281,33
ISS 07	2286,36
ISS 22	2373,59
ISS 78	2406,94
ISS 80	2435,38
ISS 21	3071,34
ISS 37	3393,86
ISS 57	3396,35
ISS 81	3620,38

Código ISS	Niveles de ALS
ISS 65	3722,81
ISS 61	3907,66
ISS 67	4147,1
ISS 54	4283,26
ISS 11	4750,45
ISS 12	4792,49
ISS 70	4859,81
ISS 69	4902,82
ISS 25	5203,24
ISS 68	5253,14
ISS 29	5276,33
ISS 53	5562,76
ISS 33	7832,17
ISS 52	14290,01

Tabla 8-11: Niveles de ALS en mU/ml en el grupo de pacientes estudiados. Resultados en orden ascendente de los valores de ALS en los pacientes analizados. En azul se encuentran los niveles que están dentro de los valores de referencia en adultos, suministrados por la manufactura del Kit de ELISA

En La figura 8-7 se observan los niveles de ALS, de acuerdo al género, en todos los pacientes en quienes se tomó esta medida.

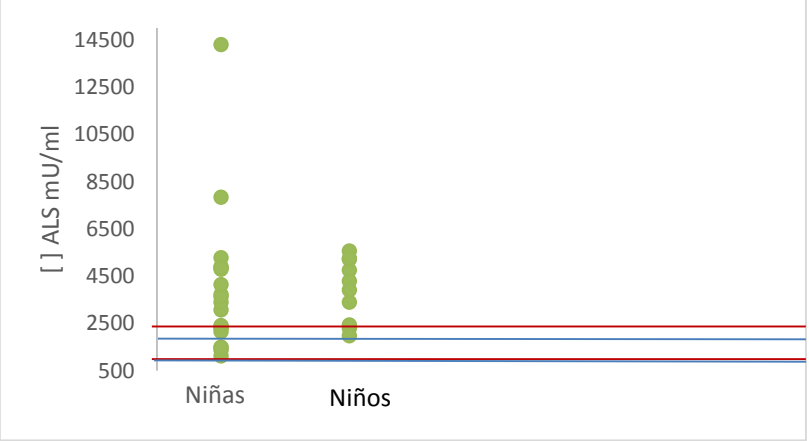


Figura 8-7: Diagrama de dispersión de los valores de ALS por ELISA de los niños y niñas del subgrupo estudiado. En el eje Y se encuentran las concentraciones de ALS en mU/ml.

El en eje X la primera columna hace referencia al grupo de niñas y la segunda columna al grupo de niños. Las líneas muestran el rango de los niveles de ALS, la roja en mujeres y la azul en hombres, de acuerdo con el kit de ELISA.

Para evaluar la relación que tienen los niveles de ALS con algunas variables antropométricas y bioquímicas en los niños evaluados en este estudio, se utilizó el coeficiente de relación de Pearson. La cuantificación de la fuerza de la relación lineal entre dos variables cuantitativas, se estudia por medio del cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. Este estadístico requiere un sentido estricto: Las dos variables provienen de una muestra aleatoria de individuos, al menos una de las variables tiene una distribución normal en la población de la cual proviene la muestra, el valor del coeficiente de relación es independiente de cualquier unidad de medida usada en las variables y mide solo la relación con una línea recta (Fernández, 1997).

El coeficiente de correlación de Pearson no implica causalidad y sus resultados oscilan entre -1 y +1, donde los valores más cercamos a -1 implican una relación negativa, los valores más cercanos a +1 se representan cuando hay una relación positiva entre las variables y el valor cero indica que no hay relación lineal entre las variables (Fernández,1997).

En las tablas 8-12 y 8-13 se analiza la correlación entre la talla y los niveles de ALS en niñas y niños respectivamente, con muy poca relación entre estas variables, con una significancia estadística por encima de 0,05. Estos datos se hacen aún más evidentes en las gráficas de dispersión de los datos en las figuras 8-8 y 8-9.

Correlations

		Talla Niñas	ALS
Talla Niñas	Pearson Correlation	1	.411
	Sig. (2-tailed)		.072
	N	20	20
ALS	Pearson Correlation	.411	1
	Sig. (2-tailed)	.072	
	N	20	20

Tabla 8-12: Correlación de Pearson entre los niveles de ALS mU/ml con la talla en niñas.

Correlations

		TALLA NIÑOS	ALS
TALLA NIÑOS	Pearson Correlation	1	.371
	Sig. (2-tailed)		.291
	N	10	10
ALS	Pearson Correlation	.371	1
	Sig. (2-tailed)	.291	
	N	10	10

Tabla 8-13: Correlación de Pearson entre los niveles de ALS mU/ml con la talla en niños.

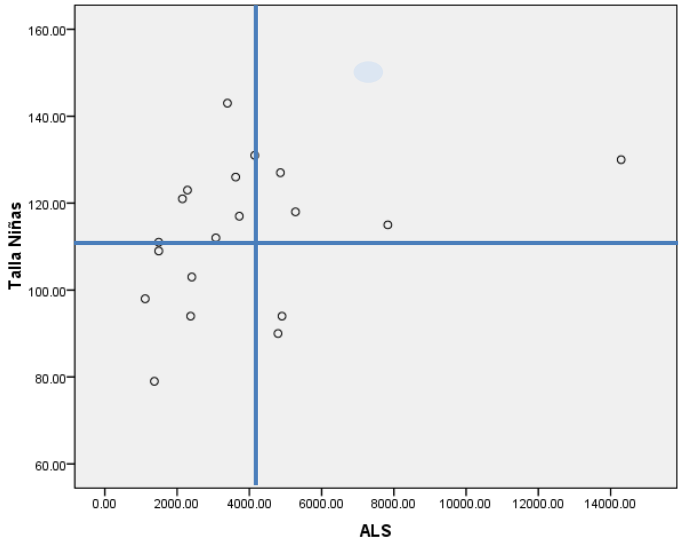


Figura 8-8: Gráfica de dispersión de los datos entre las variables de Talla y Niveles de ALS en niñas. Las líneas en la gráfica representan la media de la talla y la media de la ALS en niñas.

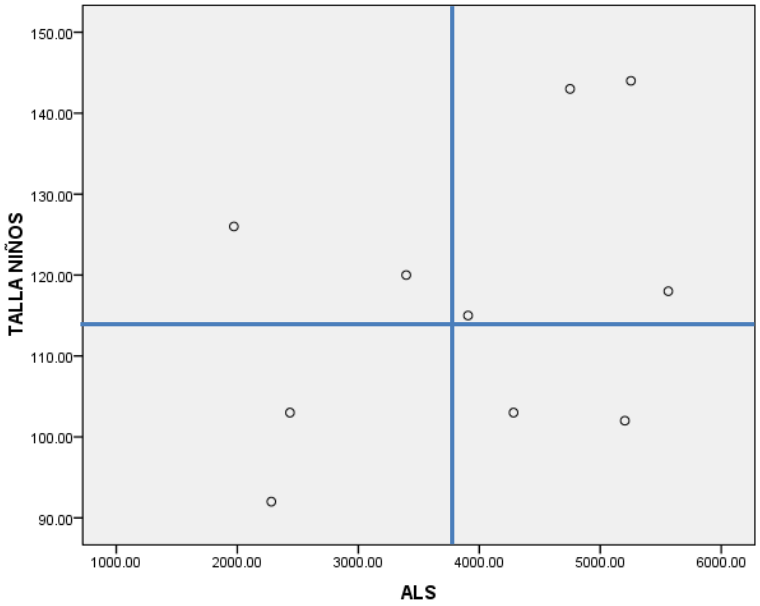


Figura 8-9: Gráfica de dispersión de los datos entre las variables de Talla y Niveles de ALS en niños. Las líneas en la gráfica representan la media de la talla y la media de la ALS en niños.

El las tablas 8-14 y 8-15 se analiza la correlación entre los niveles de ALS y los de IGF I en niñas y niños respectivamente, sin encontrar una correlación entre estas variables tanto en el grupo de las niñas (*p:* 0.037) como de los niños (*p:* 0.261). Esto permite realizar la hipótesis de que no existe una relación directa, entre los niveles de ALS e IGF I en el grupo de pacientes analizados.

Correlations

		ALS	IGF-I
ALS	Pearson Correlation	1	.470*
	Sig. (2-tailed)		.037
	N	20	20
IGF-I	Pearson Correlation	.470*	1
	Sig. (2-tailed)	.037	
	N	20	20

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabla 8-14: Correlación de Pearson entre los niveles de ALS mU/ml e IGF-I en niñas.

Correlations

		ALS	IGF-I
ALS	Pearson Correlation	1	.393
	Sig. (2-tailed)		.261
	N	10	10
IGF-I	Pearson Correlation	.393	1
	Sig. (2-tailed)	.261	
	N	10	10

Tabla 8-15: Correlación de Pearson entre los niveles de ALS mU/ml e IGF-I en niños.

Estos datos se pueden corroborar de acuerdo a la dispersión de los datos como se observa en las figuras 8-10 y 8-11.

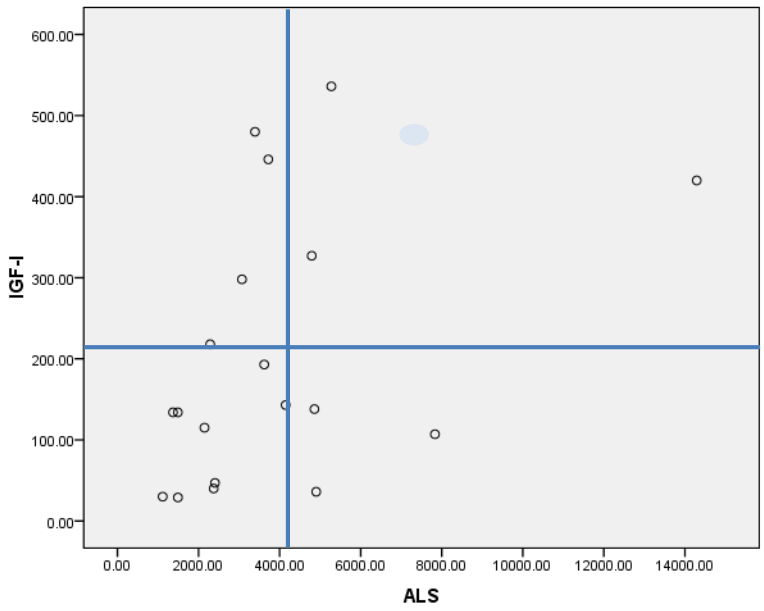


Figura 8-10: Gráfica de dispersión de datos entre las variables Niveles de ALS e IGF I en niñas. Las líneas en la gráfica representan la media de la talla y la media de la ALS en niñas.

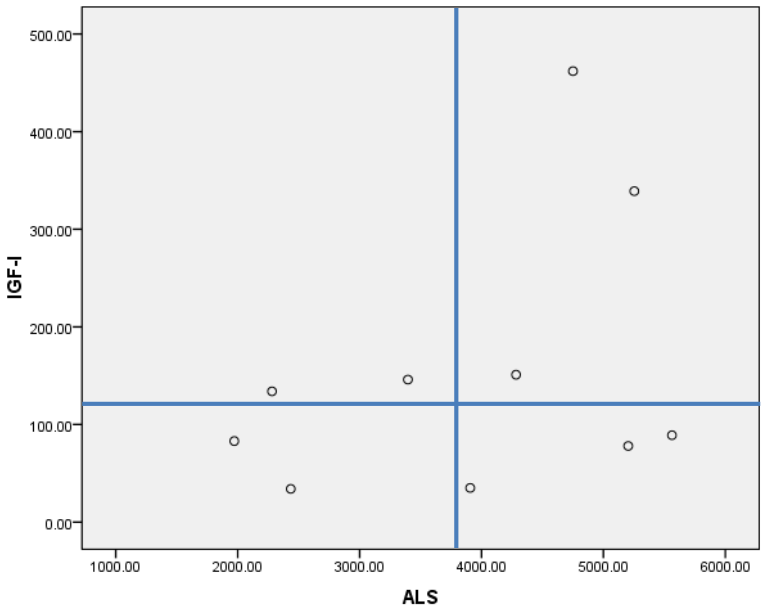


Figura 8-11: Gráfica de dispersión de datos entre las variables Niveles de ALS e IGF I en niños. Las líneas en la gráfica representan la media de la talla y la media de la ALS en niños.

9. DISCUSIÓN

En aproximadamente el 80% de los niños que son referidos a una clínica pediátrica debido a la baja estatura no es posible definir una causa establecida, incluso después de una evaluación diagnóstica completa, incluyendo un amplio *screening* bioquímico e investigaciones radiológicas (Wit, 2012).

El diagnóstico de talla baja idiopática (ISS) se realiza cuando el niño tiene una talla menor a -2 desviaciones estándar, una talla y peso normal al nacimiento, su retraso en el crecimiento es proporcionado, no tiene enfermedades endocrinas o sistémicas, no tiene problemas psicosociales y lleva una dieta adecuada (Cohen, 2008). Para establecer el diagnóstico de ISS se debe descartar la deficiencia de GH. Este proceso conlleva a la determinación de los niveles plasmáticos de GH, IGFI e IGFBP3, sin embargo la interpretación individualizada de sus resultados no siempre es sencilla y plantea muchos problemas en la práctica clínica diaria (Carrascosa, 2011). Un estudio reciente reporta que con una evaluación médica amplia solo se obtiene un rendimiento diagnóstico del 1,3% (Dauber, 2014).

La talla, es un rasgo clásico determinado por efecto poligénico aditivo, en el cual la participación de múltiples genes establece esta característica (Weedon MN, et el, 2008). Uno de los trabajos *GWAS* más representativo en la población de ancestría europea, abarca un total de 180 *loci* implicados en el rasgo de la talla (Hana Lango, et al, 2010); este estudio hace parte de un gran meta-análisis publicado en Nature en el 2014 que consta de un total de 79 estudios *GWAS* que reporta 697 variantes localizadas en 423 *loci*, asociados a vías de crecimiento, explicando cerca de una quinta parte de la heredabilidad del rasgo (Andrew R Wood, et al,2014).

No existe evidencia que soporte criterios definitivos para la selección de pacientes que se benefician del *test* genético. Este debe reservarse para quienes se sospecha, un solo locus es responsable de la determinación de su estatura, por ejemplo en pacientes con severa deficiencia de GH, insensibilidad a GH, RCIU sin *catch-up*, dismorfismos, displasia esquelética evidente, discapacidad intelectual asociada, microcefalia, o talla < -3 SD (Dauber, 2014).

Aproximadamente el 25% de los pacientes con talla baja Idiopática manifiestan deficiencia de IGF-I con niveles normales o elevados de GH, lo que ha sido definido como deficiencia primaria de IGF-I (Barros, 2012), por lo que el criterio estricto de IGF-I bajo y / o alteración en el test de estimulo a GH, no es un impedimento o un criterio de exclusión absoluto, cuando se trata de encontrar la etiología en este grupo de pacientes. Estas condiciones clínicas de pacientes con talla baja idiopática coinciden con lo observado en el actual estudio, donde el 31% de los pacientes, tenían niveles de IGF I menores a – 2 SDS, como se plasma en la tabla 9-1.

IGF I SDS	Frecuencia	Porcentaje
-2	9	31,0
-1	8	27,5
0	4	13,7
1	3	10,3
2	5	17,24
Total	29	100

Tabla 9-1: Niveles de IGF I en la población estudio.

En estos pacientes con deficiencia primaria de IGF I, se han encontrado mutaciones en GH, GHR, o en STAT5b, que se encuentran en la vía, pero presentan una baja frecuencia mutacional. La incidencia de mutaciones en GHR en pacientes con deficiencia primaria de IGF-I es relativamente baja, explicando un porcentaje <10% de los casos de estudiados al nivel molecular (Bang et al, 2008;David, 2011). La incidencia de mutaciones en el gen codificante de la GH (GH1) y gen codificante de receptor de GHRH (GHRHR) fue del 6,2% y 0%, respectivamente, en una cohorte de 82 pacientes Holandeses, con talla baja, déficit de GH y valores circulantes de IGF-I < -2 SDS (De Graaff, 2009).

En cuanto a la vía de señalización post-receptor, los defectos en los genes involucrados fundamentalmente STAT5b, constituyen la segunda causa genética de resistencia a la acción de GH, identificando un total de 10 casos de Deficiencia Parcial de IGFI debidos a

7 mutaciones diferentes de STAT5B (David, 2011). Se han descrito igualmente, muy pocos casos de mutaciones del gen GH1 que generan una GH biológicamente inactiva (Barros, 2012). Por lo tanto es válido continuar estudios de esta misma vía, como por ejemplo, mutaciones en ALS e IFG1, como se realizó en este trabajo.

Un estudio de Campos Barros y colaboradores toma 80 pacientes con talla baja e IGFI baja encontrando 9 familias con alteraciones en el gen IGFALS que presentaron 7 mutaciones diferentes, determinando así que las mutaciones en IGFALS representan el defecto molecular más frecuente (11,25%) en los pacientes con talla baja y déficit idiopático de IGF-I (Campos, 2011).

Gen	N° Mutaciones	Homocigotos	Heterocigotos compuestos	Heterocigotos
IGFALS	9/80 (11,25%)	4	1	4
GHR	2/80 (2,5%)	0	0	2
IGFBP3	1/80 (1,25%)	0	0	1
IGF1	0/80	-	-	-

Tabla 9-2: Frecuencia de Mutaciones en el estudio de Campos Barros et al, 2011.

En el 2004 en Buenos Aires - Argentina se reportó el primer caso de una paciente de 17 años con un progreso lento de la pubertad y un crecimiento lineal lento asociado a la inactivación del gen IGFALS por una mutación *frame-shift*, 1338delG, E35fsX120 y por ende una ausencia completa del trímero formado por IGF I, IGFBP3 y ALS, con niveles de Hormona de crecimiento elevados (Domené, 2004). El doctor Domené hace una descripción clínica, endocrina y metabólica de los pacientes con mutaciones en IGFALS en la que indica que los individuos con alteraciones en este gen presenta una estatura discretamente baja entre -2 y -3 SDS en la mayoría de casos acompañado de bajas concentraciones de IGFI e IGFBP3 y advierte que la identificación de pacientes con mutaciones en IGFALS es problemática, debido al desconocimiento de la historia natural de esta condición (Domene, 2009).

En comparación con lo descrito por de Domené, el actual estudio tiene en promedio de estatura para la edad de -2,4 SDS ± 0,78. Además de la revisión realizada por Domené y colaboradores, se publicó recientemente una descripción de una familia afectada por mutaciones en el gen IGFALS con un fenotipo muy variable entre ellos; H.L. Storr en el 2014 reportó una paciente femenina homocigota para una mutación en IGFALS (p.L134Q) con mayor compromiso de la talla al nacer que su hermano homocigoto para la misma

mutación; pero que presentan un posterior ritmo de crecimiento similar entre ambos. Llama la atención los niveles ausentes de ALS en sangre en ambos casos, pero con niveles disimiles de IGF I entre ambos hermanos homocigotos. Además en comparación con otra hermana heterocigota, se observa mayor compromiso de la talla en la hermana heterocigota respecto al hermano homocigoto para la misma mutación (Storr, 2014).

En el presente estudio en el exón 1 se encontró el SNP rs3817902 ubicado a -19 bp en el cDNA y con cambio de una Adenina por una Guanina, (c.-19A>G). Este cambio se encuentra con una frecuencia del 65% en la población general siendo más común en la población africana con una frecuencia de 71%, y en los americanos se encuentra en un 69%.

En el exón 2 encontramos las variantes sinónimas rs189350550, rs3751893, rs35632685 y rs17559.

El SNP rs189350550 tiene una baja frecuencia en la población general y solo se encuentra con un porcentaje del 2% en la población africana. Ubicado a 99 pb del cDNA con cambio de Guanina por Adenina, c.99G>A y en la posición 33 de la proteína (SNP linked to Gene CD79A (geneID : 973) Via Contig Annotation. (2011)).

La variante rs3751893 está localizada a 210pb en el DNA complementario con un cambio de una Timina por una Citosina, c.210 T>C, en la posición 70 de la proteína (SNP linked to Gene CD79A (geneID : 973) Via Contig Annotation. (2011)). Tiene una frecuencia del 78% en la población general, siendo más común en la población americana y africana con una frecuencia de 82%.

El SNP rs35632685 tiene una baja frecuencia en la población general de solo el 1%, siendo más común en asiáticos con un 4%, con una localización a 915 bp, c.915G>A, en la posición 267 de la proteína (SNP linked to Gene CD79A (geneID : 973 Via Contig Annotation. (2011)).

El SNP rs17559 es otra variante sinónima ubicada a 1500bp, con cambio de una Citosina por una Timina c.1500C>T, en la posición 462 de la proteína (linked to Gene CD79A (geneID : 973) Via Contig Annotation. (2011)). Tiene una frecuencia del 19% en la población general y la mayor prevalencia se da en la población africana con una frecuencia de 45%.

CODIGO ISS	GENERO	VARIANTES EXON 1	VARIANTES EXON 2	Talla SDS	TALLA MATERNA	TALLA PATERNA	TALLA MEDIO PARENTAL (TMP)
ISS 01	F	-19AA>GG	210 TT>CC	-3	149	163	149,5
ISS 03	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2	160	174	160,5
ISS 04	F	-19 AA>AG	210 TT>TC	-2,5	159	179	162,5
ISS 05	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-3	159	179	162,5
ISS 07	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-3	150	168	152,5
ISS 08	F		210 TT>TC	-3	145	172	152
ISS 09	M	-19 AA>AG	210 TT>TC	-2	150	155	159
ISS 10	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-3,7	152	148	143,5
ISS 11	M	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2	149	164	163
ISS 12	F	-19 AA>AG	210 TT>CC 915 GG>AG	-5	155	172	157
ISS 13	M		210 TT>CC	-3,5	159	165	168,5
ISS 15	M		210 TT>TC 1500 CC>CT	-2,1	153	164	165
ISS 16	M	-19 AA>GG	210 TT>CC	-3	160	170	171,5
ISS 19	M	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2,5	151,7	178,2	171,45
ISS 21	F			-2,5	145	162	147
ISS 22	F		210 TT>CC	-3	143	163	146,5
ISS 24	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2,5	154	154	147,5
ISS 25	M	-19 AA>GG	210 TT>CC	-3	150	165	164
ISS 27	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2,7	157	167	155,5
ISS 28	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2,5	154	165	153
ISS 29	F	-19 AA>AG	210 TT>TC	-2	155	165	153,5
ISS 30	F	-19 AA>GG	210 TT>CC 1500 CC>CT	-3,6	162	177,8	163,4
ISS 32	M	-19 AA>GG	210 TT>CC	-3	155	160	164
ISS 33	F			-3,5	139	160	143
ISS 34	M	-19AA>AG	210 TT>TC	-2	144	162	159,5
ISS 36	F		210 TT>TC 915 GG>AG	-1,5	145	169	150,5
ISS 37	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-3	153	166	153
ISS 40	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2,5	152	156	147,5
ISS 41	F	-19 AA>AG	210 TT>TC	-2	154	172	156,5
ISS 42	M			-2	147	173	166,5
ISS 48	F		210 TT>CC	-3,2	151,9	168	153,45
ISS 49	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2	152	157	148
ISS 52	F	-19 AA>GG	210 TT>CC 1500 CC>CT	-2	158	170	157,5
ISS 53	M	-19 AA>GG	210 TT>CC	-1,5	164	175	176
ISS 54	M	-19 AA>AG	210 TT>TC	-2	156	174	171,5
ISS 56	F	-19 AA>AG	210 TT>CC 915 GG>AA	-2,3	151,3	164	151,15
ISS 57	M		210 TT>TC	-2,7	147	169	164,5
ISS 59	M		210 TT>CC	-2,7	157	157	163,5
ISS 64	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2,6	151	164	151
ISS 65	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-4	152	163	151
ISS 67	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2	162	164	156,5
ISS 68	M	-19 AA>GG	99 GG>GA 210 TT>CC 1500 CC>CT	-2,5	166	166	172,5
ISS 69	F	-19 AA>AG	210 TT>CC	-3	157	163	153,5
ISS 70	F	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2,5	155	169	155,5
ISS 73	M	-19 AA>GG	210 TT>CC	-2,5	138	159	155

Tabla 9-3: (Continuación)

CODIGO ISS	GENERO	VARIANTES EXON 1	VARIANTES EXON 2	Talla SDS	TALLA MATERNA	TALLA PATERNA	TALLA MEDIO PARENTAL (TMP)
ISS 74	F	-19 AA>AG	210 TT>TC	-3,8	155	157	149,5
ISS 75	F		210 TT>TC 915 GG>GA	-3,5	140	157	142
ISS 77	F	-19 AA>AG	210 TT>CC	-2	168	172	163,5
ISS 78	F		210 TT>TC	-2,4	150	170	153,5
ISS 79	F		210 TT>CC 915 GG>GA	-3	155	165	153,5
ISS 80	M		210 TT>CC	-2,4	158	183	177
ISS 81	F		210 TT>TC	-4	153	169	154,5
ISS 82	M			-4	158	168	169,5

Tabla 9-3. Identificación de los pacientes estudiados, con las variantes encontradas, la SDS de la talla del paciente y la talla en cm de los padres.

En la tabla 9-3 se pueden observar las variantes encontradas en cada paciente. Al separar los pacientes en dos grandes grupos, el primero los pacientes con -2 a -2,4 SDS y el segundo grupo < -2,5 SDS de la talla, podemos ver que respecto al exón 1 en el primer grupo 13 de 18 pacientes (72,2%) tienen la variante -19 AA>AG al igual que en el grupo dos, 26 de 35 pacientes (74,2%) presentan esta misma variante. Respecto al exón 2, en el primer grupo un paciente no tiene ninguna variante (5,5%), 13 tienen solo una variante (72,2%) y 4 tienen 2 variantes (22,2%), mientras que en el grupo dos, tres pacientes no tienen ninguna variante (8,57%), 23 tienen una variante (65,7%), 4 tienen 2 variantes (11,42%) y un paciente tiene 3 variantes (2,8%), demostrando un comportamiento similar en la frecuencia de números de variantes en ambos grupos.

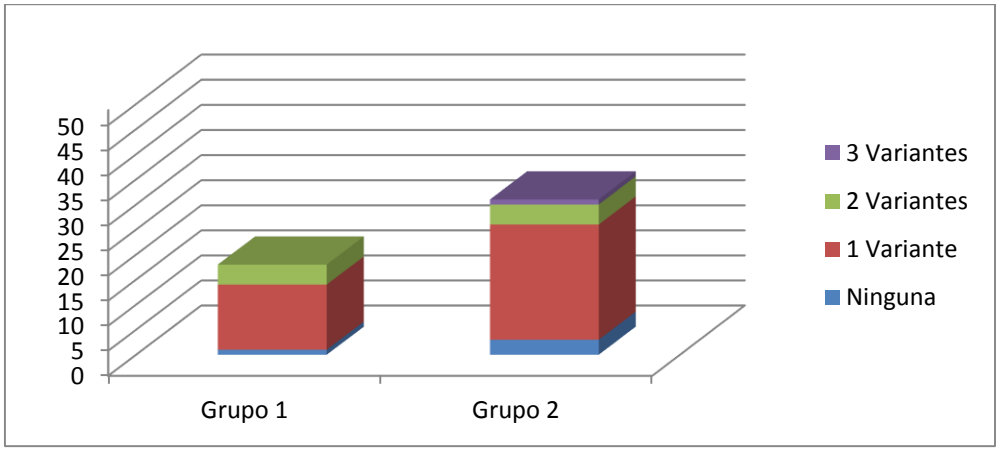


Figura 9-1: Diagrama de barras que identifica el número de pacientes con 1, 2, 3 o ninguna variante en el exón 2.

En el estudio realizado por JM Wit y colaboradores en el 2012 se describió un grupo de 36 pacientes con variabilidad en los niveles de IGFI y con adecuada respuesta al test de estímulo de GH. Este grupo se subdividió en 3 grupos diferentes: en el grupo 1 están los pacientes con Talla < - 2,5 SDS e IGF I < - 2 SDS, el grupo 2 son pacientes con talla de -1,9 a -2,5 SDS e IGF I < -2 SDS y finalmente el grupo 3 conformado por pacientes con talla <- 1,9 SDS e IGF I de 0 a -2 SDS. Se observó que en el grupo 1 tres de nueve pacientes fueron pequeños para la edad gestacional, mientras que en el grupo 2 no se identificó ningún paciente pequeño para la edad gestacional. A todos los pacientes se les realizó un amplio estudio molecular de genes candidatos que incluyeron secuenciación y MLPA de GH1, GHR, STAT5B, IGF1, e IGFALS, CNV´s y SNP *Array*, identificando numerosas variantes.

En el grupo 1, cinco de nueve pacientes presentaron una o más variantes. Se identificaron las siguientes variantes no clasificadas (UV) y algunas no descrita en estudios previos, heterocigota c.944A>C p.Glu315Ala y heterocigota c.1492G>A p.Val498Met en el gen STAT5B, heterocigota c.1642C>T p.Arg548Trp, heterocigota c.860C>T p.Pro287Leu y heterocigota c.1133C>T p.Pro378Leu en el gen IGFALS.

Además mediante *Array* se encontró duplicación de las regiones 2q24.3q31.1 y 2q31.1 y deleción de la región Xq25 que contiene el gen WDR40C. En el paciente con la variante p.Arg548Trp en IGFAL, además se observó un nivel de ALS de -1,2 SDS y un pico bajo en la formación del complejo ternario. Se observó que al aumentar los niveles de hIGFBP3, aumentaba el pico de formación del trímero. Posiblemente esta variante reduce la afinidad por el complejo IGF-IGFBP3, lo cual solo se manifiesta con niveles relativamente bajos de IGFBP3.

Respecto a la variante p.Pro287Leu del gen IGFALS, ha sido considerada como un SNP de baja abundancia (MAF = 0.0053), los análisis *in silico* predicen que es benigna y los niveles séricos de IGFBP-3 están dentro del rango normal, sugiriendo una variante neutra. Sin embargo esta variante ha sido descrita previamente en otros pacientes con ISS. La variante p.Pro378Leu al parecer implica una deficiencia parcial de ALS, debido a niveles séricos de la misma en -1,8 SDS y muestra un patrón en la cromatrografía de exclusión consistente con un defecto heterocigoto de IGFALS. Esta variante no ha sido reportada en estudios previos ni en controles. La predicción de *PolyPhen* 2 dice que esta variante podría ser patogénica. Se observó que al aumentar los niveles de hIGFBP3, aumentaba el pico de formación del trímero. Por esto se sospecha que la mutación heterocigota p.Val498Met en STAT5B en este mismo paciente por sí sola, o mediante sinérgicamente con la mutación IGFALS, es la causa de la estatura baja del paciente y su bajo nivel de IGF-I en suero.

Adicionalmente en el grupo 1 se encontraron 2 polimorfismos en IGFALS (c.1566G>A, p.Thr522Thr and c.1386C>T, p.Tyr462Tyr).

En el grupo 2 se encontraron variantes en 2 de 6 pacientes. Se encontraron los polimorfismos heterocigoto c.1386C>T, p.Tyr462Tyr en IGFALS y el polimorfismo heterocigoto c.10+52A>G, c.10+56A>T en GH1. En el paciente JB se evidenciaron niveles séricos de IGF I e IGFBP3 bajos sugiriendo una deficiencia de ALS, y los niveles de ALS eran bajos (-2,4 SDS) y una reducción de la formación del complejo ternario de 150 kDa, más sin embargo el estudio de IGFALS solo mostro el polimorfismo c.1386C >T, p.Tyr462Tyr, trasmitido del padre el cual presentaba una talla normal, niveles de IGF I y una formación del trímero completamente normal. Este polimorfismo ha sido encontrado en el 18% de niños con ISS y en el 14% de niños con talla normal. Por otro lado la madre del paciente, de talla baja, si muestra una reducción en la formación del complejo de 150 kDa a pesar de tener niveles normales de ALS.

En grupo 3, como mencionamos, está conformado por pacientes con talla <- 1,9 SDS e IGF I de 0 a -2 SDS, características similares a algunos de los pacientes incluidos en el presente estudio, 12 de 29 y que manifestaban un comportamiento similar a lo observado por J.M. Wit, que reporta ocho de 21 pacientes presentaban variantes, pero en todos los casos la relevancia patogénica es incierta. En IGFALS encontraron en un paciente la variante hetetocigota in 5´ UTR c.56–30A>T heredada de su madre con talla normal, y en otro paciente la variante heterocigota c.860C>T, p.Pro287Leu y el polimorfismo heterocigoto c.1386C>T, p.Tyr462Tyr. En ambos pacientes es improbable que los hallazgos clínicos y bioquímicos puedan ser explicados por estas mutaciones.

Un hallazgo llamativo es el caso del paciente RK, el cual presenta unas características bioquímicas de deficiencia parcial de ALS (niveles séricos normal-bajos de IGFBP-3 e IGF-I, un patrón de cromatrografía de columna con el patrón típico de deficiencia parcial de ALS y valores séricos de ALS –1.1 SDS), pero el *screening* mutacional no mostró ninguna variante en IGFALS.

Como reporta J.M Wit en el último grupo de pacientes, se manifestaron características sugestivas de déficit parcial de ALS a pesar de encontrar valores de IGF I dentro de los rangos de normalidad (-2 a 0 SDS); por tal motivo los niveles de IGF I normales no son suficientes para descartar alteraciones en el gen IGFALS.

Una observación interesante del estudio de J.M. Wit, et al, fue el nivel bajo o bajo-normal de ALS y la reducción en la formación del complejo ternario de 150 kDa en 2 niños con un fenotipo y características bioquímicas sugerentes de un defecto heterocigoto en IGFALS. Sin embargo, la secuenciación de IGFALS sólo mostró un SNP común sinónimo lo cual podría explicar que existe un mecanismo alterado en la regulación génica (Wit, 2012).

Tal como lo describe J.M. Wit en su estudio, también en el presente trabajo se encontraron pacientes con fenotipo sugestivo de déficit de ALS, dados por talla baja y niveles disminuidos de IGF I e IGFBP3, pero encontrando solo variantes sinónimas en la secuenciación del gen IGFALS; y al no disponer de cromatografía de exclusión para determinar la formación del complejo ternario IGFI-IGFBP3-ALS, no es posible determinar la actividad de la proteína ALS.

Otra observación nueva del estudio de J.M. Wit es que un amplio número de pacientes tenían combinación de variantes en dos genes, los cuales se conoce están implicados en la regulación de crecimiento, por ejemplo STAT5B e IGFALS. Gran parte de las variantes encontradas se clasificaron como de relevancia patogénica incierta que según estudios funcionales, cromatografía de exclusión del trímero IGFI-IGFBP3-ALS, tienen implicaciones en la disponibilidad de IGFI, es decir que pueden estar afectando la actividad de ALS. Las conclusiones que se obtienen del estudio de J.M Wit son:

1. Existe un rendimiento diagnóstico del 30% para evaluar los genes asociados a insensibilidad a GH.
2. Existe un efecto digénico de la talla baja. Varios pacientes muestran una combinación de variantes en dos genes que se sabe están implicados en la regulación del crecimiento, por ejemplo, las variantes STAT5B e IGFALS
3. La asociación entre las variantes genéticas en IGFALS y la baja estatura sigue siendo incierta.
4. La asociación entre las variantes genéticas con las características clínicas y bioquímicas sigue siendo incierto.
5. En los niños con menos compromiso de la talla y / o modesta disminución de los niveles séricos de IGF-I, la probabilidad de encontrar variantes en estos genes es mucho más bajo, lo que sugiere que otros genes, aún desconocidos, juegan un papel importante.

De acuerdo con estas conclusiones se observan las dificultades que se presentaron en el trabajo, puesto que se abarcó solo un gen asociado a Talla Baja Idiopática, disminuyendo las posibilidades de encontrar un número significativo de pacientes afectados por esta condición o que presenten interacción con otros genes implicados en el crecimiento lineal.

De acuerdo a la clasificación realizada por JM Wit y colaboradores en el 2012 por grupos, en el presente estudio podemos decir que de los pacientes que se tenían datos de IGF I, 6 se encontraban en el grupo 1, dos en el grupo 2 y 11 en el grupo 3. Encontrando solo la variante 210 TT>CC en el grupo 2 y en los otros grupos se encontraron las mismas variantes.

En el actual estudio se empleó la técnica de secuenciación del gen IGFALS para establecer la frecuencia de mutaciones, encontrando cinco variantes sinónimas y no se encontraron mutaciones patogénicas, lo cual nos lleva a pensar que la frecuencia de talla baja causada por mutaciones patogénicas en IGFALS es baja según lo observado en la población estudio, en comparación con estudios como el de Campos Barros, pero existen variantes que pueden estar jugando un rol importante en la regulación sobre la expresión del gen y pueden contribuir a un efecto sumatorio de un rasgo poligénico como es la talla.

La disponibilidad de la medición de ALS nos permitirá caracterizar más pacientes con retraso del crecimiento y la pubertad causados por deficiencia de IGF-I circulante como consecuencia de la deficiencia de esta proteína (Domene, 2005). Sin embargo las mediciones de los niveles de ALS, a pesar de que no se cuenta con valores de referencia de acuerdo a la edad, con el método usado en el estudio actual, estaban con una alta expresión de la proteína lo cual permite suponer que no se está generando cambio en la expresión del gen, pero se desconoce si existe cambios en la actividad de la proteína.

El propósito del test genético en talla baja es identificar las causas monogénicas de la baja estatura debida a variantes genéticas raras con gran efecto (Dauber, 2014). El estudio genético de los pacientes tiene muchas ventajas, primero permite la identificación molecular de la etiología, segundo puede alertar acerca de comorbilidades clínicas, tercero permite un asesoramiento genético adecuado y por último puede tener implicaciones para la terapia (Dauber, 2014).

Sin embargo, a pesar de los considerables avances realizados, con los conocimientos actuales, todavía se desconoce el defecto molecular subyacente en aproximadamente un 80% de los casos de hipocrecimiento armónico postnatal, probablemente debido a la elevada complejidad de la regulación funcional del eje GH-IGF-I en el crecimiento humano (Barros, 2012).

10. Conclusiones

1. A través de este estudio se caracterizaron fenotípicamente 53 pacientes con diagnóstico de talla baja idiopática, 35 de sexo femenino y 18 de sexo masculino, con un promedio de edad cronológica de 8,7 años y una talla promedio de -2,62 SDS en las niñas y de -2,33 SDS para los niños.

2. La madurez ósea para las niñas fue de -0.55 años y para los niños fue de – 0.94 años respecto a la edad cronológica

3. Los niveles de IGF I e IGFBP3 de la población estudiada fueron muy variables con proporciones similares en cada una de las desviaciones estándar. El 31% estaba debajo de -2 SDS para la edad y el 42,2% estaba entre -2 y 0 SDS.

4. Se llevó a cabo una caracterización molecular del gen IGFALS, identificando variantes sinónimas, polimórficas, sin significado clínico en el 92,46% de los pacientes estudiados. Se identificaron 5 variantes, una en el exón 1 en el 66,03% de los pacientes, 4 variantes sinónimas en el exón 2. De las variantes en el exón 2 el 92,45% corresponden a la variante c.210 T>C.

5. Las variantes encontradas podrían estar jugando un rol importante en la regulación sobre la expresión del gen, la función de la proteína o podrían contribuir a un efecto sumatorio de un rasgo poligénico como es la talla.

6. Se evaluaron los niveles de la proteína ALS en un grupo de 29 pacientes con talla baja Idiopática obteniendo valores elevados de la proteína de acuerdo a los valores de referencia otorgados por la manufactura del Kit de ELISA, tomadas en población adulta.

7. Según el reporte de la literatura la frecuencia de mutaciones patológicas de IGFALS es aproximadamente 11% en los pacientes con déficit de IGFI; en este estudio no

se encontraron mutaciones patogénicas, probablemente debido a que se evaluó un grupo general de Talla Baja Idiopática con niveles variables de IGF I y no se restringió a aquellos que presentaran deficiencia de IGF I.

11. Recomendaciones

1. Ampliar el grupo de estudio para poder establecer un perfil epidemiológico adecuado y poder capturar la mayor cantidad posible de pacientes con algún grado de deficiencia de IGFI.

2. Se recomienda realizar estudio de interacción del trímero IGFI-BP3-ALS por cromatografía de exclusión para determinar la actividad de la proteína ALS y el efecto que puede sufrir a consecuencia de las variantes identificadas.

3. Determinar los niveles de ALS por ELISA de acuerdo a las edades, para poder tener valores de referencia adecuados, puesto que esta proteína es cambiante de acuerdo a la edad.

4. Se recomienda el uso de nuevas tecnologías que permitan conocer nuevos genes determinantes del rasgo de la estatura como es la secuenciación de exoma, en particular para el estudio de pacientes con talla baja idiopática.

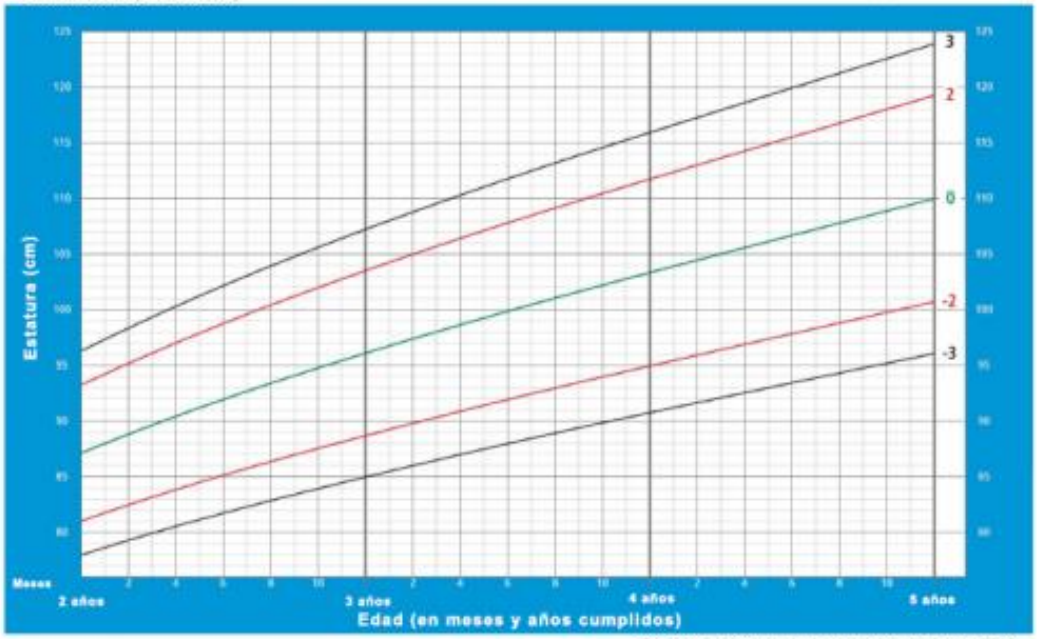
12. Anexos

Anexo A: Curvas de Relación Talla- Edad de Niñas y Niños de la OMS.

Patrones de crecimiento infantil de la OMS

Estatura para la edad Niños

Puntuación Z (2 a 5 años)



Patrones de crecimiento infantil de la OMS

Anexo B: Consentimiento Informado para la participación en el proyecto de Investigación.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

EVALUACIÓN DEL GEN IGFALS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL PACIENTE Y SU FAMILIA

OBJETIVO- ¿QUÉ BUSCA ESTE ESTUDIO?
La talla baja se ha descrito como una estatura por debajo de – 2 desviaciones estándar para la edad y el sexo, respecto a la población general (o <P3). Una vez que en el paciente se excluyen síndromes genéticos, endocrinos o desordenes sistémicos (causas secundarias y primarias) se considera una talla baja idiopática (ISS). Se ha descrito previamente que mutaciones en el gen IGFAL (Unidad Ácido Lábil del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina) pueden producir talla baja. Este estudio busca caracterizar mutaciones en el gen IGFALS en pacientes con Talla Baja Idiopática en Bogotá.

PROCEDIMIENTO-¿QUÉ LE PEDIMOS?
Su hijo, o menor a cargo, tiene una estatura por debajo de – 2 desviaciones estándar para la edad y sexo, respecto a la población general, el cual estamos estudiando.

Si permite su participación en este estudio, se procederá a tomar una muestra de sangre (7cc en el brazo), las muestras serán procesadas en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional para la realización de los análisis de varios procesos moleculares en dicha muestras.

Los riesgos del estudio son inherentes a la toma de esta muestra de sangre.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa riesgo mínimo para la salud e integridad de su hijo y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de la muestra, y como se explicó arriba los riesgos son pocos y pueden incluir dolor leve, hematomas (morados).

BENEFICIOS ADICIONALES: Este estudio tiene para usted el (los) siguiente(s) beneficio(s) adicional(es): 1. Detección de mutaciones en el gen IGFALS en su hijo o menor a cargo, en el caso que la tuviese. 2. Proporcionar más información a la comunidad científica, sobre la Talla Baja Idiopática.

MANEJO DE RESULTADOS: Los resultados de las pruebas serán facilitados a usted si así lo desea.

OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE: En el curso del estudio se le suministrará a usted cualquier tipo de información nueva, derivada de éste, que pueda modificar su participación en el mismo. Las muestras e información que usted aportó serán empleadas para el desarrollo de ESTA investigación.

Solo en algunos casos, la información y muestras suministradas por usted se pueden emplear en otros estudios clínicos o de ciencias básicas. SIEMPRE SE LE PEDIRÁ una autorización por escrito en caso de que usted autorice que su información o la información y muestras DEL MENOR A SU CARGO, sean empleadas en otros estudios. Por ello le solicitamos que revise el formato de AUTORIZACIÓN donde usted puede aprobar o rechazar el empleo de la información y muestras en las circunstancias allí mencionadas.

Usted podrá, en el momento que lo desee, retirar las muestras del almacenamiento.

Si usted cree que ha sufrido una lesión relacionada con la investigación o desea cualquier información adicional, por favor llame a los teléfonos mencionados más adelante.

INVITACION A PARTICIPACION EN EL PROYECTO.

Usted y su hijo o menor a cargo, está siendo invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética Humana de **UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.** Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria.

(b) Este estudio puede generar beneficios directos sobre usted y su familia, ya que en algunos pacientes se detectarán mutaciones en el gen IGFALS. Con los datos obtenidos en este estudio podremos conocer más sobre la etiología de la Talla Baja Idiopática.

(c) Usted en nombre del menor a su cargo puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocatoria de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente ni consecuencia alguna en la calidad de atención médica que se le suministre.

(d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación.

(e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras.

(f) Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted.

(g) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.

(h) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida y explicada por el grupo investigador. Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, contestará sus preguntas.

Para mayor información, llame en Colombia al 3165000 EXT 11631, para comunicarse con el investigador Dr. Harvy Velasco Parra, en el Instituto de Genética Humana de la Universidad Nacional, Carrera 44 #26-85 y al correo por Internet: hmvelascop@unal.edu.co,

Adicionalmente, si usted no está satisfecho con la forma como se está conduciendo este estudio o tiene otras preguntas concernientes a sus derechos como participante del estudio, por favor contacte al mismo teléfono o correo electrónico mencionados antes.

AUTORIZACION

El ingreso a este estudio es voluntario. Usted tiene derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. Los investigadores guardarán las muestras de sangre para realizar **EVALUACIÓN DEL GEN IGFALS EN PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ**

Una vez terminado este trabajo, requerimos de su autorización para:

- Ser almacenadas para emplearlas en estudios de investigación nacionales e internacionales de patologías relacionadas con la entidad objeto de esta investigación (Talla Baja), siempre y cuando se conserve ☐Si ☐No

en anonimato mis datos de identificación y los del menor a mi cargo. En el caso que su respuesta sea afirmativa, el grupo de investigación se compromete a contactarse con usted y solicitar una nueva autorización, previa autorización del comité de Ética de la Universidad Nacional para proteger la integridad del sujeto de estudio

- Ser desechadas una vez terminado este trabajo, mediante incineración y se tendrá un registro de desecho de muestras ☐Si ☐No

AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO: "**EVALUACIÓN DEL GEN IGFALS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ"**

Yo, _____identificado con documento numero _____ de _____, acepto voluntariamente que se me tome a mi o a mi hijo (a) o menor a mi cargo, cuyo nombre es _____ muestras de_____, con el fin de almacenarlas para el estudio molecular de Talla Baja Idiopática Así mismo, declaro que se me ha explicado Y HE ENTENDIDO la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

_____
Firma del padre
Nombre:_____
Identif: _____
Teléfono: _____

_____
Firma de la madre
Nombre: _____
Identif: _____
Teléfono:_____

_____
Responsable del menor
Nombre:_____
Identif: _____
Teléfono: _____

_____
Sujeto de investigación (mayor de 7 años)

_____
Testigo 1
Nombre:_____
Identif: _____
Teléfono: _____

_____
Testigo 2
Nombre:_____
Identif: _____
Teléfono: _____

_____
Investigador

Fecha: _____

Anexo C: Formato de recolección de Datos.

EVALUACIÓN DEL GEN IGFALS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ

FORMATO DE RECOLECCION DE INFORMACION

Fecha: ___/___/___ Cod.__ __ __ __

Nombre

Edad aa// mm Fecha Nacimiento: dd// mm// aaaa

Natural y procedente

Identificación: C.C | T.I | R.C | C.E | CNV | NUIP _____

Género: F | M Teléfonos: _____ _____ _____

Centro de Referencia: _____

Antecedentes Familiares

- Talla materna : cms (DS_____) Referida Si | No
- Talla paterna : cms (DS_____) Referida Si | No

Antecedentes perinatales

- Edad gestacional al nacer: Semanas Peso: Gramos (DS____) Talla: cms (DS_____)

Antecedentes Patológicos

- Edad de Diagnóstico de talla baja: aa// mm

Antecedentes farmacológicos:

- Uso de hormona de crecimiento: Si | No Edad de inicio de tto: dd/mm/aa

Paraclinicos

- Carpograma: Edad cronológica: aa// mm Edad ósea: aa// mm
- Fecha del carpograma dd// mm// aaaa
- Hormona Estimulante de Tiroides: Normal | Anormal Valor: ug/dl
- En tratamiento: Si | No
- Prueba de Estimulo con Hormona de Crecimiento: Normal | Anormal
- Respuesta Parcial | Ausente
- Niveles de Insulina uU/ml
- Factor Similar a la Insulina (IGF1): ng/ml
- Proteina de Unión del Factor Similar a la Insulina (IGFBP3): ng/ml

Fenotipificación

- Medidas antropométricas:
  - Talla: [cms] (DS_____) Envegadura: [cms] Peso: : [Kgs] (DS_____)
  - Segmento superior: [cms] Segmento inferior: [cms]
  - Perímetro cefálico [cms]

CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION DEL ESTUDIO:

INCLUSIÓN	EXCLUSIÓN
• Niños entre 2 y 16 años • **Talla por debajo de 2,0 desviaciones estándar** (SD) ajustado para edad cronológica, género y población (Tablas de Crecimiento y Desarrollo estandarizada por los clínicos asociados al proyecto). • Cariotipo convencional normal en pacientes de sexo femenino • Secreción normal de hormona de crecimiento (GH), valorada por un test de estimulo, adecuado para la edad. • Estudio del gen SHOX por MLPA	• Déficit de hormona de crecimiento (GH) • Resistencia a GH • Cualquier tipo de displasia esquelética. • Enfermedades crónicas (cardiopatías, nefropatías, neumopatías, DNT, enfermedades genéticas, enfermedades gastrointestinales, hipotiroidismo, cánceres, inmunodeficiencias) • Deformidad de Madelung • Diagnostico de retardo constitucional de Crecimiento y Desarrollo valorado por índice maduracional

13. Bibliografía

1. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, et al. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med*. 2003;349:2211-2222. doi:10.1056/NEJMoa010107.
2. Acosta Guio J, Zarante IM. Consulta de Genética Médica en un Hospital de Seundo Nivel en Colombia: Impacto Médico y Social. *Rev Salud Bosque*. 2011;volumen 1(número 1):25-32.
3. Amano N, Mukai T, Ito Y, et al. Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):E713-E718. doi:10.1210/jc.2013-3525.
4. Amit T, Youdim MB, Hochberg Z. Clinical review 112: Does serum growth hormone (GH) binding protein reflect human GH receptor function? *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(3):927-932. doi:10.1210/jcem.85.3.6461.
5. Attie KM, Carlsson LM, Rundle a C, 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.
6. Bang P. Statement 3: a low serum IGF-I Level in idiopathic short stature patients indicates partial GH insensitivity. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2008;5 Suppl 3:841-846.
7. Barrios V, Pozo J, Muñoz MT, Buño M, Argente J. Normative Data for Total and Free Acid-LabileSubunit 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 Paediatr*. 2000;53(3):148-153. http://www.karger.com/DOI/10.1159/000023554.

8. Barros ÁC, Núñez AG, Bouthelier G, Gómez EG. Análisis molecular del eje GH/IGF-I en el hipocrecimiento postnatal : del laboratorio a la clínica. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*. 2012; 3(4):25-32. doi:10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2012.May.123.
9. Baxter RC. Editorial: The binding protein's binding protein - Clinical applications of acid-labile subunit (ALS) measurement. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(12):3941-3943. doi:10.1210/jc.82.12.3941.
10. Blum WF. *Insulin-like Growth Factors (IGF) and IGF-Binding Proteins: Their Use for Diagnosis of Growth Hormone Deficiency*. Cambridge University Press; 2000.
11. Bober MB, Bellus GA, Nikkel SM, Tiller GE. Hypochondroplasia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., eds. Seattle (WA); 1993.
12. Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: An important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol*. 2001;170:63-70. doi:10.1677/joe.0.1700063.
13. Campos Barros, S. De Frutos, A. Gómez, K. E. Heath, E. Gallego RG. Las Mutaciones en IGFALS Constituyen el Defecto Molecular más Frecuente en Pacientes con Déficit Idiopático de IGF-I y Talla Baja. 2011;2:25-26. doi:10.3266/Pulso.ed.RevEspEP2011.vol2.SupplCongSEEP.
14. Carrascosa a., Fernández Longás a., Gracia Bouthelier R, López Siguero JP, Pombo Arias M, Yturriaga R. Talla baja idiopática. Revisión y puesta al día. *An Pediatría*. 2011;75(3):204.e1-e204.e11. doi:10.1016/j.anpedi.2011.05.007.
15. Cianfarani S, Liguori A, Boemi S, et al. Inaccuracy of insulin-like growth factor (IGF) binding protein (IGFBP)-3 assessment in the diagnosis of growth hormone (GH) deficiency from childhood to young adulthood: association to low GH dependency of IGF-II and presence of circulating IGFBP-3 18-kilodalton fragment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6028-6034. doi:10.1210/jc.2005-0721.
16. Clayton P, Bonnemaire M, Dutailly P, et al. Characterizing Short Stature by Insulin-like Growth Factor Axis Status and Genetic Associations: Results From the Prospective, Cross-sectional, Epidemiogenetic EPIGROW Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(March):E1122-E1130. doi:10.1210/jc.2012-4283.

17. Cohen P, Rogol a. D, Deal CL, et al. 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(November 2008):4210-4217. doi:10.1210/jc.2008-0509.
18. Courtland HW, DeMambro V, Maynard J, et al. Sex-specific regulation of body size and bone slenderness by the acid labile subunit. *J Bone Miner Res*. 2010;25(9):2059-2068. doi:10.1002/jbmr.94.
19. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic Evaluation of Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;(September):jc20141506. doi:10.1210/jc.2014-1506.
20. Dauber A, Yu Y, Turchin MC, et al. Genome-wide association of copy-number variation reveals an association between short stature and the presence of low-frequency genomic deletions. *Am J Hum Genet*. 2011;89(6):751-759. doi:10.1016/j.ajhg.2011.10.014.
21. David A, Hwa V, Metherell L a., et al. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity. *Endocr Rev*. 2011;32(March):472-497. doi:10.1210/er.2010-0023.
22. David A, Kelley L a., Sternberg MJE. A new structural model of the acid-labile subunit: Pathogenetic mechanisms of short stature-causing mutations. *J Mol Endocrinol*. 2012;49:213-220. doi:10.1530/JME-12-0086.
23. De Graaff LCG, Argente J, Veenma DCM, et al. Genetic screening of a Dutch population with isolated GH deficiency (IGHD). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(5):742-750. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03414.x.
24. Del Toro KY, Durán P, LLano García M. Enfoque del paciente con talla baja en pediatría. *Precop SCP*. 2008;7:28-37.
25. Domené HM, Bengolea VS, Jasper HG. Consecuencias endocrinas y metabólicas de la deficiencia de la subunidad ácidolabil del complejo circulante de los factores de crecimiento insulino-símiles. *Rev Argent Endocrinol Metab*. 2005;42(4):157-166.
26. Domené HM, Bengolea S V, Martínez AS, et al. Deficiency of the Circulating Insulin-like Growth Factor System Associated with Inactivation of the Acid-Labile

Subunit Gene. *N Engl J Med*. 2004;350(6):570-577. doi:10.1056/NEJMoa013100.

27. Domené HM, Hwa V, Argente J, et al. Human acid-labile subunit deficiency: clinical, endocrine and metabolic consequences. *Horm Res*. 2009;72(3):129-141. doi:10.1159/000232486.
28. Domené HM, Hwa V, Jasper HG, Rosenfeld RG. Acid-labile subunit (ALS) deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(1):101-113. doi:10.1016/j.beem.2010.08.010.
29. Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougneres P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nat Genet*. 2004;36(7):720-724. doi:10.1038/ng1379.
30. Fernández S. P, Pértega Díaz S. Investigación: relación entre variables cuantitativas. *Cad Atención Primaria*. 1997;4:141-144. http://desarrollo.fisterra.com/mbe/investiga/var_cuantitativas/var_cuantitativas2.pdf.
31. Fisker S. Physiology and pathophysiology of growth hormone-binding protein: methodological and clinical aspects. *Growth Horm IGF Res*. 2006;16(1):1-28. doi:10.1016/j.ghir.2005.11.001.
32. Fofanova-Gambetti O V., Hwa V, Wit JM, et al. Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (IGFALS) gene mutations on stature: Results from the International Acid-Labile Subunit Consortium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(September 2010):4184-4191. doi:10.1210/jc.2010-0489.
33. Francis J. Hughes, Wendy Turner GBYGM. Efectos de los factores de crecimiento y de las citocinas sobre la diferenciación de los osteoblastos. *Periodontol 2000*. 2007;15:48-72.
34. Gaviria A. Nutrición y salud infantil en Colombia : determinantes y alternativas de política *. *Coyunt Económica*. 2006;XXXVI:33-66.
35. Giovenale D, Meazza C, Cardinale GM, et al. The prevalence of growth hormone deficiency and celiac disease in short children. *Clin Med Res*. 2006;4(3):180-183.
36. Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev*. 1998;19(6):717-797. doi:10.1210/edrv.19.6.0353.

37. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev*. 2008;29(5):535-559. doi:10.1210/er.2007-0036.

38. Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, et al. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(October):8083-8087. doi:10.1073/pnas.86.20.8083.

39. Gudbjartsson DF, Walters GB, Thorleifsson G, et al. Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet*. 2008;40(5):609-615. doi:10.1038/ng.122.

40. 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(6):753-758.

41. Guo MH, Shen Y, Walvoord EC, et al. Whole exome sequencing to identify genetic causes of short stature. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(1):44-52. doi:10.1159/000360857.

42. He M, Xu M, Zhang B, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of adult height in East Asians identifies 17 novel loci. *Hum Mol Genet* . 2015;24 (6):1791-1800. doi:10.1093/hmg/ddu583.

43. Hess O, Khayat M, Hwa V, et al. 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(6):838-844. doi:10.1111/cen.12200.

44. Hirschhorn JN, Lettre G. Progress in Genome-Wide Association Studies of Human Height. *Horm Res Paediatr*. 2009;71(suppl 2(Suppl. 2):5-13. http://www.karger.com/DOI/10.1159/000192430.

45. Huang Z, Cheng SL, Slatopolsky E. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is required for extracellular calcium stimulation of human osteoblast proliferation. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21351-21358. doi:10.1074/jbc.M010921200.

46. Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, et al. 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(2):E373-E378. doi:10.1210/jc.2010-1570.

47. Kant SG, Grote F, de Ru MH, et al. Radiographic evaluation of children with growth disorders. *Horm Res*. 2007;68(6):310-315. doi:10.1159/000108399.
48. Khosravi MJ, Diamandi A, Mistry J, Krishna RG, Khare A. Acid-labile subunit of human insulin-like growth factor-binding protein complex: measurement, molecular, and clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(12):3944-3951. doi:10.1210/jcem.82.12.4415.
49. Kim J-J, Park Y-M, Baik K-H, et al. Exome sequencing and subsequent association studies identify five amino acid-altering variants influencing human height. *Hum Genet*. 2012;131(3):471-478. doi:10.1007/s00439-011-1096-4.
50. Kofoed EM, Hwa V, Little B, et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med*. 2003;349:1139-1147. doi:10.1056/NEJMoa022926.
51. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndtf SI, Weedon MN. Hundreds of Variants Clustered in Genomic Loci and Biological Pathways Affect Human Height. *Nature*. 2010;467(7317):832-838. doi:10.1038/nature09410.Hundreds.
52. Lanning NJ, Carter-Su C. Recent advances in growth hormone signaling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006;7(4):225-235. doi:10.1007/s11154-007-9025-5.
53. Lee JM, Davis MM, Clark SJ, Hofer TP, Kemper AR. Estimated cost-effectiveness of growth hormone therapy for idiopathic short stature. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006;160(3):263-269. doi:10.1001/archpedi.160.3.263.
54. Lettre G, Jackson AU, Gieger C, et al. UKPMC Funders Group Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat Genet*. 2008;40(5):584-591. doi:10.1038/ng.125.Identification.
55. Leung KC, Ho KK. Measurement of growth hormone, insulin-like growth factor I and their binding proteins: the clinical aspects. *Clin Chim Acta*. 2001;313:119-123.
56. Lindsay R, Feldkamp M, Harris D, Robertson J, Rallison M. Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr*. 1994;125(1):29-35.
57. Mezquita Raya MT. Importancia del IGF-I en el Metabolismo Oseo. *REEMO*. 2003;12(6):117-119.
58. Millar DS, Lewis MD, Horan M, 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(4):424-440. doi:10.1002/humu.10168.

59. Morrison KM, Bidlingmaier M, Stadler S, Wu Z, Skriver L, Strasburger CJ. Sample pre-treatment determines the clinical usefulness of acid-labile subunit immunoassays in the diagnosis of growth hormone deficiency and acromegaly. *Eur J Endocrinol*. 2007;156:331-339. doi:10.1530/EJE-06-0592.
60. Neufeld L, Rubio M, Pinzón L, Tolentino L. Nutrición en Colombia: estrategia de país 2011-2014. *Banco Interam Desarro*. 2010.
61. Nilsson O, Guo MH, Dunbar N, et al. Short stature, accelerated bone maturation, and early growth cessation due to heterozygous aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):E1510-E1518. doi:10.1210/jc.2014-1332.
62. Okada Y, Kamatani Y, Takahashi A, et al. A genome-wide association study in 19 633 Japanese subjects identified LHX3-QSOX2 and IGF1 as adult height loci. *Hum Mol Genet*. 2010;19(11):2303-2312. doi:10.1093/hmg/ddq091.
63. Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1229-1232. doi:10.1210/jc.2005-1949.
64. Oostdijk W, Grote FK, de Muinck Keizer-Schrama SMPF, Wit JM. Diagnostic approach in children with short stature. *Horm Res*. 2009;72(4):206-217. doi:10.1159/000236082.
65. Organización Mundial de la Salud (OMS). Patrones de crecimiento infantil OMS. 2014;(1). http://www.who.int/childgrowth/standards/es/.
66. Palmert MR, Hirschhorn JN. Genetic approaches to stature, pubertal timing, and other complex traits. *Mol Genet Metab*. 2003;80(1-2):1-10.
67. Pedicelli S, Peschiaroli E, Violi E, Cianfarani S. Controversies in the definition and treatment of idiopathic short stature (ISS). *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2009;1(3):105-115. doi:10.4008/jcrpe.v1i3.53.
68. Perola M. Genome-wide association approaches for identifying loci for human height genes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;25(1):19-23. doi:10.1016/j.beem.2010.10.013.
69. Pombo M, Castro L, Rodríguez PC. El niño de talla baja. *Protoc diagn ter pediatr*. 2011;(1):236-254.
70. Poukoulidou T, Kowalczyk J, Metherell L, De Schepper J, Maes M. A novel homozygous mutation of the IGFALS gene in a female adolescent: indirect

evidence for a contributing role of the circulating IGF-I pool in the pubertal growth spurt. *Horm Res Paediatr*. 2014;81(6):422-427. doi:10.1159/000358329.

71. *Primer* P, Pcr I. *Primer* designing tool *Primer* designing tool. 2010:1-4.
72. *Primer*3. *Primer*3 Input. http://*primer*3.wi.mit.edu/.
73. Rappold GA, Fukami M, Niesler B, et al. Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1402-1406. doi:10.1210/jcem.87.3.8328.
74. Rechler MM, Clemmons DR. Regulatory Actions of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins. *Trends Endocrinol Metab*. 1998;9(5):176-183.
75. Rogol AD, Geffner M, Hoppin AG. Diagnostic approach to short stature. 2012:1-19.
76. Rogol AD, Hayden GF. Etiologies and Early Diagnosis of Short Stature and Growth Failure in Children and Adolescents. *J Pediatr*. 2015;164(5):S1-S14.e6. doi:10.1016/j.jpeds.2014.02.027.
77. Rosenbloom AL. Idiopathic short stature: conundrums of definition and treatment. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2009;2009:470378. doi:10.1186/1687-9856-2009-470378.
78. Sandberg D. The Psychosocial Consequences of short stature: a review of the evidence. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002;16(3):449-463. doi:10.1016/S1877-3419(09)70050-9.
79. Schreiner F, Schoenberger S, Koester B, Domene HM, Woelfle J. Novel acid-labile subunit (IGFALS) mutation p.T145K (c.434C>A) in a patient with ALS deficiency, normal stature and immunological dysfunction. *Horm Res Paediatr*. 2013;80(6):424-430. doi:10.1159/000355927.
80. Seaver LH, Irons M. ACMG practice guideline: genetic evaluation of short stature. *Genet Med*. 2009;11(6):465-470. doi:10.1097/GIM.0b013e3181a7e8f8.
81. Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet*. 2006;38(9):1038-1042. doi:10.1038/ng1862.
82. Stephanie Sisley, Marcela Vargas Trujillo, Jane Khoury and P, Backeljauw. Low Incidence of Pathology Detection and High Cost of Screening in the Evaluation of Asymptomatic Short Children. *Changes*. 2013; 29(4):997-1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

83. Storr HL, Prasad R, Temple IK, Metherell LA, Savage MO, Walker JM. Heterogeneity of the growth phenotype and birth size in acid-labile subunit (ALS) deficiency. *J Endocrinol Invest*. 2014. doi:10.1007/s40618-014-0195-1.

84. Storr HL, Dunkel L, Kowalczyk J, Savage MO, Metherell LA. Genetic characterisation of a cohort of children clinically labelled as GH or IGF1 insensitive: diagnostic value of serum IGF1 and height at presentation. *Eur J Endocrinol* . 2015;172 (2):151-161. doi:10.1530/EJE-14-0541.

85. Strufaldi MWL, Silva EMK da, Puccini RF. Follow-up of children and adolescents with short stature: the importance of the growth rate . *Sao Paulo Med J* . 2005;123 :128-133.

86. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(12):4908-4911. doi:10.1210/jcem.85.12.7167.

87. Tanner JM, Goldstein H, Whitehouse RH. Standards for Children's Height at Ages 2-9 Years Allowing for Height of Parents. *Arch Dis Child*. 1970;45(1966):755-762. doi:10.1136/adc.45.244.819-b.

88. Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol*. 2001;54:133-137. doi:10.1136/mp.54.3.133.

89. Van Duyvenvoorde HA, Lui JC, Kant SG, et al. Copy number variants in patients with short stature. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(5):602-609. doi:10.1038/ejhg.2013.203.

90. Vasques G a., Amano N, Docko AJ, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(October 2013):1636-1644. doi:10.1210/jc.2013-2142.

91. Vinasco T. Caracterización Molecular del Gen SHOX y sus Regiones Reguladoras en una Muestra de Pacientes con Talla Baja Idiopática de la Ciudad de Bogotá. 2012.

92. Waldman L a, Chia DJ. Towards identification of molecular mechanisms of short stature. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2013;2013:19-29. doi:10.1186/1687-9856-2013-19.

93. Walenkamp MJE, Wit JM. Genetic disorders in the growth hormone - insulin-like growth factor-I axis. *Horm Res*. 2006;66(5):221-230. doi:10.1159/000095161.

94. Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, et al. Large-Scale Pooled Next-Generation Sequencing of 1077 Genes to Identify Genetic Causes of Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(8):E1428-E1437. doi:10.1210/jc.2013-1534.
95. Wassenaar MJE, Dekkers OM, Pereira AM, et al. Impact of the exon 3-deleted growth hormone (GH) receptor polymorphism on baseline height and the growth response to recombinant human GH therapy in GH-deficient (GHD) and non-GHD children with short stature: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(10):3721-3730. doi:10.1210/jc.2009-0425.
96. Weedon MN, Lango H, Lindgren CM, et al. UKPMC Funders Group Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Genetics*. 2009;40(5):575-583. doi:10.1038/ng.121.Genome-wide.
97. Wit JM, Kiess W, Mullis P. Genetic evaluation of short stature. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(1):1-17. doi:10.1016/j.beem.2010.06.007.
98. Wit JM, Reiter EO, Ross JL, et al. Idiopathic short stature: management and growth hormone treatment. *Growth Horm IGF Res*. 2008;18(2):111-135. doi:10.1016/j.ghir.2007.11.003.
99. Wit JM, van Duyvenvoorde HA, Scheltinga SA, et al. Genetic analysis of short children with apparent growth hormone insensitivity. *Horm Res Paediatr*. 2012;77(5):320-333. doi:10.1159/000338462.
100. Wit JM, Clayton PE, Rogol a. D, Savage MO, Saenger PH, Cohen P. Idiopathic short stature: Definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res*. 2008;18:89-110. doi:10.1016/j.ghir.2007.11.004.
101. Wit JM, Ranke MB, Kelnar CJH. The ESPE classification of paediatric endocrine diagnoses. *Horm Res*. 2007;68(Iso 9706):VII - +.
102. With S, The EOF, Report C. Intrauterine Growth Retardation and Postnatal Growth Failure Associated With Deletion of the Insuline.Like Growth Factor I Gene. *N Engl J Med*. 1996;335(18):1363-1367.
103. Wood AR, Esko T, Yang J, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet*. 2014;46(11):1173-1186. http://dx.doi.org/10.1038/ng.3097.
104. Yu H, Mistry J, Nicar MJ, et al. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I, and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3,

IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. *J Clin Lab Anal*. 1999;13(4):166-172. doi:10.1002/(SICI)1098-2825(1999)13:4<166::AID-JCLA5>3.0.CO;2-X.

105. Zahnleiter D, Uebe S, Ekici AB, et al. Rare Copy Number Variants Are a Common Cause of Short Stature. *PLoS Genet*. 2013;9(3):1-11. doi:10.1371/journal.pgen.1003365.
106. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):3990-3993. doi:10.1210/jcem.85.11.6984.
107. Curvas Colombianas de Crecimiento ¿Cómo crecen los niños en Colombia?.
108. Derecho del Bienestar Familiar [RESOLUCION_MINTRABAJO_RT240079]. http://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_mintrabajo_rt240079.htm.
109. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional En Colombia 2010. 2010;(64).
110. Ensembl genome browser 75: Homo sapiens - cDNA sequence - Transcript: PAX6-201 (ENST00000419022). http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000007372;r=11:31806340-31839509;t=ENST00000419022.
111. Ensembl genome browser 75: Homo sapiens - cDNA sequence - Transcript: PAX6-201 (ENST00000419022). http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000007372;r=11:31806340-31839509;t=ENST00000419022.
112. Ensembl genome browser 75: Homo sapiens - cDNA sequence - Transcript: PAX6-201 (ENST00000419022). http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000007372;r=11:31806340-31839509;t=ENST00000419022.
113. Etiologies and Early Diagnosis of Short Stature and Growth Failure in.
114. Homo sapiens chromosome 11, GRCh37.p10 Primary Assembly. :5248301.
115. SNP linked to Gene CD79A (geneID : 973) Via Contig Annotation. 2011:2011.