



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN SHOX Y
SUS REGIONES REGULADORAS EN UNA MUESTRA DE
PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPATICA DE LA
CIUDAD DE BOGOTA**

GLORIA TATIANA VINASCO SANDOVAL

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
MAESTRIA EN GENETICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA, FACULTAD DE MEDICINA
BOGOTA, COLOMBIA**

2012

**CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN SHOX Y SUS REGIONES
REGULADORAS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA
IDIOPATICA DE LA CIUDAD DE BOGOTA**

GLORIA TATIANA VINASCO SANDOVAL

COD: 598543

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Magister en Genética humana**

Director:

HARVY MAURICIO VELASCO MD. Msc

Codirectores

GIOVANNA CAROLA JAIMES MD. Endocrinóloga Pediatra

MAURICIO COLL BARRIOS MD. Endocrinólogo Pediatra

CAMILA CESPEDES MD. Endocrinóloga Pediatra

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

MAESTRIA EN GENETICA HUMANA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA, FACULTAD DE MEDICINA

BOGOTA, COLOMBIA

2012

**CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN SHOX Y SUS REGIONES
REGULADORAS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA
IDIOPATICA DE LA CIUDAD DE BOGOTA**

NOTA DE ACEPTACION

Firma del presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Director

Bogotá, D.C., Enero de 2012

DEDICATORIA

**A Dios, promotor de la vida y de mis logros
A mi familia y mis amigos por que siempre han creído en mi y están para
apoyarme en todo lo que hago.**

AGRADECIMIENTOS

A dios, por la vida que me regalo y por demostrarme que existe en cada uno de los logros que consigo.

A mis padres y hermanos, por que siempre hacen todo lo posible por brindarme lo que necesito, incluyendo su apoyo emocional, y porque siempre a pesar de los errores que yo pueda cometer están ahí impulsándome a salir adelante.

A los docentes de la maestría, quienes me aportaron su conocimiento y colaboración.

A mi director Harvy M. Velasco y a mis codirectores Carola Jaimes, Mauricio Coll y Camila Cespedes, por su colaboración y orientación en la realización de este trabajo y la consecución de pacientes.

A los doctores del Laboratotio de Investigacion Hormonal y del Centro Nacional de Endocrinologia Y metabolismo (Cendem); Teresa Ortiz, Mauricio Llano, Juan Manuel Arteaga y Roberto Franco, quienes muy amablemente me colaboraron en la obtención de pacientes.

A los jurados de este trabajo, Dr Juan Manuel Arteaga y Dr. Jorge Eduardo Caminos, por interesarse en evaluarlo y ayudarme a mejorarlo a través de sus valiosas críticas.

A Islena Bonilla, por su colaboración, amabilidad y amistad durante estos 3 años de estar en la Maestría.

A mi amiga y compañera de maestría Lorena Piñeros, por toda su colaboración y sincera amistad durante mi paso por la maestría y por esta ciudad extraña para mi.

A mis primas Gabriela y Daniela Sandoval por su apoyo durante todos los años que hemos compartido juntas, especialmente este último año.

A todas las personas que conocí y que hacen parte tanto de la maestría en Genética, así como del instituto de genética y que me brindaron su amistad.

RESUMEN

La talla baja es un concepto para el cual se han descrito tanto variantes normales como variantes patogénicas. Una de las variantes que hace parte de la clasificación de variantes normales es la Talla baja idiopática (ISS), debido a que estos pacientes no cursan con ninguna anomalía fenotípica y sus niveles de GH son normales. Mutaciones en el SHOX, generan un amplio espectro de fenotipos cuando hay haploinsuficiencia del gen, desde la discondrosteosis de Leri Weill (LWD), el Síndrome de Turner y la talla baja desproporcionada (DSS), sin embargo, también se ha encontrado mutado en una alta frecuencia en pacientes con ISS (cerca del 3 al 15% de la población de ISS). En este estudio se empleó la técnica MLPA para determinar la frecuencia de mutaciones en el gen shox y sus CNE en pacientes colombianos con ISS, encontrando una frecuencia del 9,6% entre deleciones e inserciones, reportando un caso aislado de una duplicación en el CNE 9 en un paciente con fenotipo de talla baja idiopática y una deleción no referenciada en el intron 6b en otro paciente con ISS

Palabras clave: Gen Shox, Talla baja Idiopática, MLPA

ABSTRACT

Short stature is a concept for which variants have been described both normal and pathogenic variants; a variant that is part of the classification of normal variants is idiopathic short stature (ISS), because these patients do not present with any phenotypic abnormalities and GH levels are normal. Shox mutations generate a wide spectrum of phenotypes when there is haploinsufficiency of the gene, since Leri Weill dischondrosteosis (LWD), Turner Syndrome and disproportionate short stature (DSS), however, has been found a high frequency of mutations in patients with ISS (about 3 to 15% of population of ISS). In this study, the MLPA technique was employed to determinate the frequency of mutations in the Shox gene and CNE in colombian patients with ISS and found a frequency of 9.6% between deletions and insertions, reporting a single case of aduplication in the CNE 9 in a patient with phenotype of ISS and one unreferenced deletion in the intron 6b in another patient with ISS.

Key Words: Shox Gene, Idiopathic Short Stature, MLPA

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUCCION.....	17
2. PROBLEMA.....	19
3. JUSTIFICACION.....	20
4. MARCO TEORICO.....	21
4.1 Introducción.....	21
4.2 Fisiología del crecimiento.....	22
4.3 Métodos antropométricos y patrones para la evaluación del crecimiento longitudinal.....	29
4.4 Talla baja.....	32
4.5 Epidemiología.....	35
4.6 Talla Baja Idiopática ISS.....	37
4.7 Gen SHOX.....	40
5. OBJETIVOS.....	48
5.1 GENERAL.....	48
5.2 ESPECIFICOS.....	48
6. METODOLOGIA.....	49
6.1 FASE PREANALITICA.....	49
6.2 FASE ANALITICA.....	52
6.3 FASE POSTANALITICA.....	56
7 RESULTADOS.....	57

7.1	Descripcion de la población de estudio	57
7.2	Análisis Molecular	63
8	DISCUSION	79
9	CONCLUSIONES.....	84
10	RECOMENDACIONES	86
11	ANEXOS	87
12	BIBLIOGRAFIA	99

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: factores de transcripción que intervienen en el desarrollo de la placa de crecimiento.....	26
Tabla N° 2: Estudios de frecuencia de patologías relacionadas a fenotipo de talla baja.	36
Tabla N° 3: bases moleculares de la ISS causada por anomalías en IGF-I.....	39
Tabla N° 4: : Frecuencia de mutaciones del gen SHOX en pacientes con talla baja idiopática.....	44
Tabla N° 5: Cantidad de pacientes incluidos en el estudio según centro de referencia.....	57
Tabla N° 6: Procedencia de los sujetos de investigación.....	58
Tabla N° 7: descripción antropométrica de los pacientes según el género.....	58
Tabla N° 8: pacientes con diagnóstico de talla baja idiopática incluidos en el estudio	60
Tabla N° 9: Descripción fenotípica de los pacientes con anomalías en el gen SHOX.....	64
Tabla N° 10: correlacion entre el grupo de pacientes sin alteraciones en Shox y el grupo de pacientes con alteraciones en Shox.	66

Tabla N° 11: especificación de mutaciones heredadas y de novo para cada paciente	67
Tabla N° 12: descripción de los hallazgos por MLPA en 5 pacientes con talla baja idiopática.....	70
Tabla N° 13: hoja reporte del software Coffalyser mostrando los OR calculados para cada sonda en los pacientes con anomalías del gen SHOX.....	71
Tabla N° 14: Condiciones técnicas para el análisis mutacional de cada paciente.	77

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Esquema del proceso de diferenciación celular osea	24
Figura N° 2: esquema general del desarrollo de los huesos largos o crecimiento longitudinal.....	25
Figura N° 3: vía de diferenciación celular a partir de progenitores mesenquimales, diferenciación de osteoblastos a partir de Msx2, Dlx5/6 y Runx2	28
Figura N° 4: vía de regulación de la diferenciación de los osteoclastos	29
Figura N° 5: Esquema de localización de la población incluida en le estudio multicentrico de la OMS.....	31
Figura N° 6: protocolo de valoración y seguimiento al hipocrecimiento desde atención primaria	33
Figura N° 7: Prevalencia (%) de talla baja para la edad según tres encuestas nacionales (ENDS 1995, 2000 y ENSIN 2005), por región en Colombia.....	35
Figura N° 8: Esquema representativo de las vías de señalizacion que participan en el crecimiento.....	40
Figura N° 9: Representación esquemática del gen SHOX, y sus dos formas alternativas	41
Figura N° 10: Frecuencia de mutaciones puntuales de SHOX en pacientes con talla baja.	45

Figura N° 11: Mutaciones reportadas para el gen SHOX en la base de datos de SHOX.....	46
Figura N° 12: numero de mutaciones reportadas en la region intragenica de SHOX	46
Figura N° 13: Representación esquemática de PAR1, incluye SHOX, y región reguladora 200 a 250Kb corriente abajo.....	47
Figura N° 14: Calculo de tamaño muestral usando el módulo StatCalc de Epi-Info (6.04)	50
Figura N° 15: principio de la tecnica MLPA	53
Figura N° 16: electroferogramas obtenidos a partir de electroforesis capilar.....	63
Figura N° 17: numero de mutaciones encontradas en pacientes con ISS según la ubicación en el gen.....	64
Figura N° 18: Frecuencia de alteraciones del gen shox encontrada en la población de estudio.....	65
Figura N° 19: esquema de pacientes con talla baja idiopática evaluados con MLPA	68
Figura N° 20: electroferogramas de los pacientes con hallazgos de mutaciones en el gen SHOX.....	73

Figura N° 21: geles de electroforesis de los amplificados para control normal y cada uno de los pacientes con hallazgos de delección en región intragénica del gen shox75

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: CURVAS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA OMS	88
ANEXO N° 2: FORMATO DE RECOLECCION DE INFORMACION	89
ANEXO N° 3: FORMATO CONSENTIMIENTO INFORMADO	90
ANEXO N° 4: SALSA MLPA KIT P018-E1 SHOX, MRC HOLLAND.....	95
ANEXO N° 5: SALSA MLPA KIT P018-F1 SHOX, MRC HOLLAND.....	96
ANEXO N° 6: LISTA DE REVISION DE DATOS CRUDOS.....	97
ANEXO N° 7: CARTOGRAMA DE FLUJO PARA LA EVALUACION DEL PATRON DE PICOS OBTENIDO POR ELECTROFORESIS CAPILAR.....	98

INTRODUCCION

El crecimiento longitudinal es un proceso complejo determinado por factores genéticos, modulado por factores permisivos, fundamentalmente la nutrición, y, regulado por hormonas y factores de crecimiento¹. El crecimiento anormal resultante en talla baja es una patología de frecuente consulta y remisión a los servicios de pediatría y endocrinología pediátrica².

Esta talla baja está definida como la altura del cuerpo por debajo del 3er percentil para edad cronológica o menor a dos desviaciones (2SD) de los estándares de la población. Afecta aproximadamente al 2% de los niños de todo el mundo y es un desorden de relevancia clínica durante la niñez³.

Diferentes estudios de asociación de genoma completo han determinado variantes que afectan la susceptibilidad y han identificado polimorfismos que influyen en la talla, sin embargo estas solo dan explicación a una baja proporción de la varianza fenotípica en la población normal, contando para un poco más del 5% de la talla en la población⁴

Uno de los mayores contribuyentes genéticos en el crecimiento es el gen *SHOX* (Short Stature Homeobox-Containing Gene On Chromosome X). Se ha reportado que mutaciones que conducen a haploinsuficiencia del gen, generan fenotipos como la discondrosteosis de Leri-Weill (LWD) con una frecuencia mutacional del 30 – 70%⁵, Ellison y *col.* identificaron el gen *SHOX*, como el gen responsable de la talla baja en el síndrome de Turner⁶. Finalmente, mutaciones homocigotas producen la displasia mesomélica de Langer con una frecuencia mutacional del 67%⁷.

Con relación a la enfermedad de origen multifactorial de talla baja idiopática (ISS), se ha observado una frecuencia mutacional en regiones intragénicas del gen SHOX entre el 3 al 15%⁵, de igual forma se ha descrito recientemente que pacientes diagnosticados con ISS con región intragénica intacta de SHOX, presentan deleciones en regiones conservadas corriente abajo del gen, en una frecuencia del 22%⁴.

Debido a la inexistente evidencia en población colombiana relacionada con el comportamiento molecular de este gen y a causa de que solo existe evidencia de alteraciones de SHOX en pacientes latinoamericanos provenientes de Brasil, en este estudio se realizó un análisis de MLPA en un grupo de pacientes colombianos con diagnostico de ISS, de modo que se pudiera establecer cuál es el comportamiento de dicho gen en nuestra población con relación a esta enfermedad.

2. PROBLEMA

La condición de talla baja se considera como un factor limitante para las personas que la padecen. El desconocimiento de las causas que generan este fenotipo en determinados pacientes, especialmente niños, originan preocupación a los padres y es una de las causas más frecuentes de remisión a pediatría y endocrinología pediátrica.

Se ha reportado que del 2-8% de los niños y niñas en la población mundial presentan talla baja, y de ellos el 80% no tiene historia de Restricción del Crecimiento Intra Uterino, pequeños para la edad gestacional u otras patologías, haciendo parte del grupo de pacientes con talla baja idiopática (ISS).

Se ha determinado por medio de estudios de Asociación de Genoma Completo (GWA) y Estudios de Ligamiento, alrededor de 60 variantes génicas que influyen en la talla, pero ellas en su conjunto solo explican cerca del 5% del rasgo. Dentro de estos factores genéticos con mayor peso sobre el crecimiento, se ha descrito al gen *SHOX*, el cual puede explicar alrededor del 30% de la etiología en ISS.

Varios reportes en la literatura mencionan la utilidad clínica del diagnóstico molecular específico en ISS, de modo que pacientes con esta condición confirmada genéticamente, primero, podrían tener mejores resultados ante el uso de Hormona de Crecimiento y por otro lado, se podría establecer un riesgo de recurrencia para la familia como para el probando con relación a su descendencia.

Este gen ha sido escasamente evaluado en población latinoamericana y no hay reportes sobre el estado, la frecuencia y contribución en el rasgo de talla y ISS en población colombiana.

3. JUSTIFICACION

Wit J. y cols. ⁸ al evaluar las consecuencias psicosociales en niños con talla baja, determinaron que un 15-70% de los pacientes presentan más susceptibilidad a la poca aceptación en grupos sociales y son más propensos a ser víctimas de abusos por parte de otros niños y en la adultez, refiriendo una disminución en las competencias laborales, dificultad para conseguir pareja, además la limitación en la realización de actividades laborales.

El manejo de este tipo de pacientes se ve limitado a tratamiento con hormona de crecimiento, sin embargo es indispensable conocer las causas de este fenotipo antes de emplear algún tratamiento, teniendo en cuenta que los pacientes con talla baja idiopática no presentan o esporádicamente presentan deficiencias de hormona de crecimiento^{9 10}.

Avances en el diagnóstico molecular han determinado que un 3-15% de los pacientes con talla baja idiopática presentan anomalías en el gen *SHOX* ⁵, convirtiendo a este gen en un fuerte candidato al momento de establecer el origen de la baja talla.

Estos estudios han sido realizados en pacientes europeos y norteamericanos y solo el estudio de Jorge *et al* ² ha abordado el tema, pero parcialmente en población latinoamericana, reportando una frecuencia de mutaciones en el gen *SHOX* del 3.2% en un total de 63 pacientes con ISS.

Es necesario llenar algunos vacios relacionados a la etiología genética de la talla baja idiopática. Este estudio pretende caracterizar molecularmente al gen *SHOX* y sus regiones reguladoras en pacientes colombianos con talla baja idiopática.

4. MARCO TEORICO

4.1 Introducción

La altura humana es un clásico ejemplo de rasgo heredado poligénico, influenciado por diversos factores. Estudios familiares y de gemelos han demostrado que es una característica altamente heredable. Mcgregor y col.¹¹ en una cohorte de 1673 pares de gemelos, determinaron que la estatura presenta una heredabilidad del 91,1%, concordante con otros estudios que sugieren un rango de heredabilidad del 80-90%^{12, 13}.

Los patrones del crecimiento para ganar talla varían desde la infancia temprana y son controlados por diferentes mecanismos¹⁴. La talla se ve influenciada por factores ambientales durante la vida fetal, niñez y adolescencia¹², observando una ganancia importante de altura durante el primer año de vida, seguido por un periodo de crecimiento lento, con un incremento en la pubertad¹⁵.

Además del componente ambiental, los factores genéticos, han venido ganando protagonismo en la caracterización del rasgo de talla. Diferentes estudios de asociación y ligamiento han intentado determinar los loci asociados con este rasgo. Geller y col.¹⁶ reportaron en un GWA en 2003, que las regiones del cromosoma 6, 9 y 12 estaban asociadas con la talla y eran fundamentales para el estudio de genes candidatos; estudios posteriores vincularon las regiones de 9q22, Xp22 y Xq24¹⁷.

Algunos genes candidatos han sido descritos en el desarrollo del rasgo del crecimiento pondo estatural. Sovio y col¹⁴ en un estudio de asociación genoma completo identificaron 12 variantes (SNP) en o cerca a los genes *HHIP*, *DLEU7*, *UQCC*, *SF3B4/SV2A*, *LCORL*, *HIST1H1D*, *SOCS2*, *SF3B4/SV2A*, *C17ORF67*, *CABLES1*, y *DOT1* relacionados con talla, sin embargo estas regiones cromosómicas y genes candidatos otorgaban un pequeño efecto

(aproximadamente 0.2 - 0.6 cm/alelo) y explicaban solo el 5% de la variación en la población⁴.

Uno de los genes con peso moderado en la etiología de la talla es el gen *SHOX* (Short stature Homeobox containing gene), ya que alteraciones en el mismo podrían explicar entre 30 a 50 cms de variación entre individuos con la variante alélica⁷. Este gen ha sido claramente involucrado en varias patologías monogénicas, pero su contribución en el rasgo multifactorial de la talla y en especial en el de la talla baja, es reciente, por lo que se hace indispensable su estudio y caracterización.

4.2 Fisiología del crecimiento

El crecimiento longitudinal es un proceso complejo determinado por factores genéticos, modulado por factores permisivos, fundamentalmente la nutrición, y, regulado por hormonas y factores de crecimiento; estos últimos actúan a nivel local por un mecanismo autocrino-paracrino siendo los más conocidos los IGF-I y II, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), el derivado de las plaquetas (PDGF), el transformador β (TGF- β) y las proteínas morfógenas del hueso (BMP). Además, está regulado por diversas hormonas, principalmente la GH, el IGF-I, las hormonas tiroideas, los esteroides sexuales y la insulina¹.

En el proceso del crecimiento humano se distinguen dos etapas, la etapa prenatal y la etapa postnatal, el mayor crecimiento humano es dado en la etapa prenatal en este periodo, sin embargo los factores genéticos ejercen escasa influencia sobre el crecimiento fetal, con excepción de las mutaciones transmitidas o nuevas que afectan al crecimiento del esqueleto, como la acondroplasia, o que afectan a los factores hormonales claves, como la insulina, los IGF-I y II y otros factores locales del crecimiento^{1 18 19}.

Por el contrario, el crecimiento postnatal está regulado principalmente por el eje GH-IGF-I en combinación con otras hormonas, las tiroideas y los esteroides sexuales¹. Durante el crecimiento postnatal se diferencian tres fases:

Crecimiento en la lactancia: puede considerarse como un periodo durante el cual el ritmo de crecimiento cambia rápidamente. La velocidad de crecimiento durante el primer año de vida declina desde 20 cm/año en los primeros meses hasta 10 a 12 cm/año al cabo de 1 año de edad²⁰. La influencia genética parental sobre el crecimiento del lactante se refleja en el cambio de los canales de crecimiento, lo que acontece en alrededor de dos tercios de lactantes normales durante los primeros 6 a 18 meses de vida, con números iguales girando hacia arriba y hacia abajo²²

Crecimiento en la infancia: la velocidad promedio de crecimiento en esta etapa es de 10 a 13 cm/año. A partir de los tres años hasta la pubertad, el crecimiento se estabiliza en 5 a 6 cm/año, si bien puede producirse un pequeño retraso de hasta 2 cm/año por un tiempo antes del brote de crecimiento de la adolescencia²⁰.

Crecimiento en la adolescencia: corresponde al brote puberal con un periodo de máximo crecimiento, de 8 a 12 cm al año dependiendo del sexo, posteriormente se produce la desaceleración hasta el cese del crecimiento. El crecimiento se completa cuando, bajo la influencia del estrógeno, bien sea secretado por el ovario o convertido por aromatización de la testosterona en los hombres, se produce la fusión de las epífisis. Además de las hormonas sexuales, se observan incrementos considerables de la insulina, la HC y el FCI-I, que contribuyen al crecimiento del adolescente, todo lo cual, junto a una función tiroidea normal, es esencial para el brote de crecimiento de los adolescentes^{1 22 21}.

Como se menciono anteriormente la fisiología del crecimiento humano comprende el periodo dinámico, que se inicia con la segmentación del cigoto y termina con la

compleción de la adolescencia, caracterizada por el final del crecimiento de los huesos largos.

El crecimiento longitudinal se constituye sobre la infraestructura esquelética o también denominada complejidad del esqueleto en la cual existen tres tipos de células con una particular distribución espacial (Figura N° 1); los condrocitos encontrados en la placa de crecimiento cartilaginosa proliferan, se hipertrofian y mueren por medio de apoptosis, proceso que es seguido de una invasión vascular que genera los progenitores de osteoblastos desde las células del collar oseo hasta el centro del futuro hueso y posteriormente se forma la medula osea y los osteoblastos favorecen la diferenciación de los osteoclastos (Figura N° 2)^{22 23}.

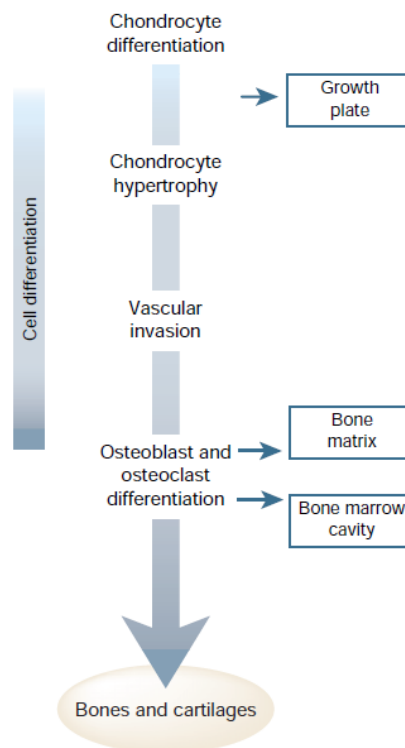


Figura N° 1: Esquema del proceso de diferenciación celular ósea²³

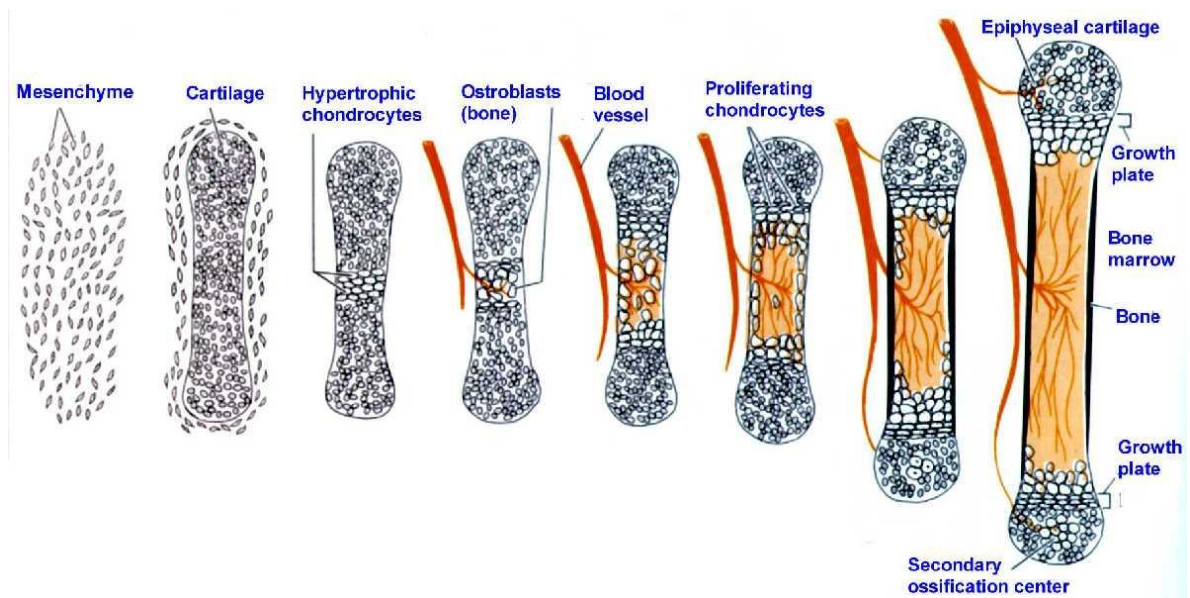


Figura N° 2: esquema general del desarrollo de los huesos largos o crecimiento longitudinal.

Procesos fisiológicos y moleculares relacionados con el crecimiento longitudinal

El desarrollo y la remodelación ósea son controladas tanto por reguladores paracrinos locales como por hormonas que viajan a través del torrente sanguíneo, dentro de estos encontramos las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), Wnts, factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), proteínas *Hedgehog*, factores de crecimiento tipo insulina, retinoides y otros factores de transcripción^{23 24 25 26}.

Regulación de la placa de crecimiento: la formación del hueso empieza con la formación de grupos de células mesenquimales que se unen a través de moléculas de adhesión, las cuales posteriormente se convierten en condrocitos, el tipo celular primario del cartílago. Los condrocitos tienen forma característica, secretan colágeno tipo II, agregan proteoglicano y expresan un programa genético característico dirigido por SOX9 y otros factores de transcripción (Tabla N° 1)²⁵.

Tabla N° 1: factores de transcripción que intervienen en el desarrollo de la placa de crecimiento (datos tomados de Kronenberg H., 2003²⁵)

Factor/Proteína	Descripción
<i>Ihh</i> (indian hedgehog):	<p>Coordina la proliferación y la diferenciación de condrocitos</p> <p>Es un miembro de la familia hedgehog de ligandos secretados, se sintetiza en los condrocitos que se dirigen al pool proliferativo y tempranamente en los condrocitos hipertróficos. El <i>Ihh</i> se une a su receptor Patched-1 (Ptc-1) para activar a Smo, una proteína de membrana requerida para la activación génica.</p> <p>El <i>Ihh</i> también regula la síntesis de la proteína relacionada con la paratohormona (PTHrP).</p>
PTHrP (parathyroid hormone-related protein)	<p>es una proteína sintetizada en la vida fetal por células del pericondrio, actúa manteniendo la proliferación de los condrocitos en el pool proliferativo.</p>
FGFRs (Fibroblast growth factor receptors)	<p>Dentro de los factores de crecimiento fibroblástico, los más conocidos por su señalización en la placa de crecimiento son:</p> <p>FGFR 3 expresado en los condrocitos en proliferación</p> <p>FGFR 1 expresado en condrocitos hipertróficos, prehipertrofos y pericondrio</p> <p>FGFR 2 expresado en pericondrio, periostio y esponjosa primaria</p> <p>FGF 18 expresado en pericondrio.</p> <p>Estudios con ratones knockout para FGF 18 sugieren que este actúa sobre FGFR 3 disminuyendo la proliferación de condrocitos, en FGFR 1 conduce a la retardo en la diferenciación terminal de los condrocitos hipertróficos y en FGFR1 y 2 disminuye el desarrollo de los osteoblastos.</p>
SOX 9	<p>Denominado el regulador central de la placa de crecimiento, es esencial para convertir las células de condensaciones mesenquimales en condrocitos y actúa en todos los estadios de</p>

	diferenciación de los condrocitos, pero no se expresa en los condrocitos en proliferación. Estimula la transcripción de diferentes genes de la matriz cartilaginosa incluyendo <i>Col2a1</i> , <i>Col11a2</i> y <i>aggrecan</i>
BMPs	Funcionan de forma antagonica al complejo Ihh y PTHrP, y participan en la regulación del pool proliferativo.

Regulación de los osteoblastos: la masa ósea en adultos es regulada localmente por el balance entre la resorción ósea de los osteoclastos y la formación ósea de los osteoblastos. Los osteoblastos derivados de mesénquima reconstruyen el hueso reabsorbido elaborando matriz que posteriormente es mineralizada, este proceso esta regulado principalmente por Runx2 y Sox9²⁴.

Estudios con ratones knockout para Runx2 (Runt-related transcription factor 2) han demostrado retardo en la maduración de los condrocitos, efecto que es consistente con la expresión de Runx2 en la zona proliferativa, además ratones heterocigotos tienen defectos en la osificación intramembranosa. Sin embargo la expresión transgénica de *Runx2* en los condrocitos resulta en hipertrofia de los condrocitos y osificación endocondral, sugiriendo que este factor controla la diferenciación de los condrocitos hipertróficos y de los osteoblastos (Figura N° 3²⁴).

De igual forma se ha descrito que los factores de transcripción *Distal-less homeobox 5 (Dlx5)* and *msh homeobox homologue 2 (Msx2)*, que se expresan en estadios tempranos de la diferenciación de ostoblastos son esenciales para la osificación intramembranosa normal (Figura N° 3)^{24 27}.

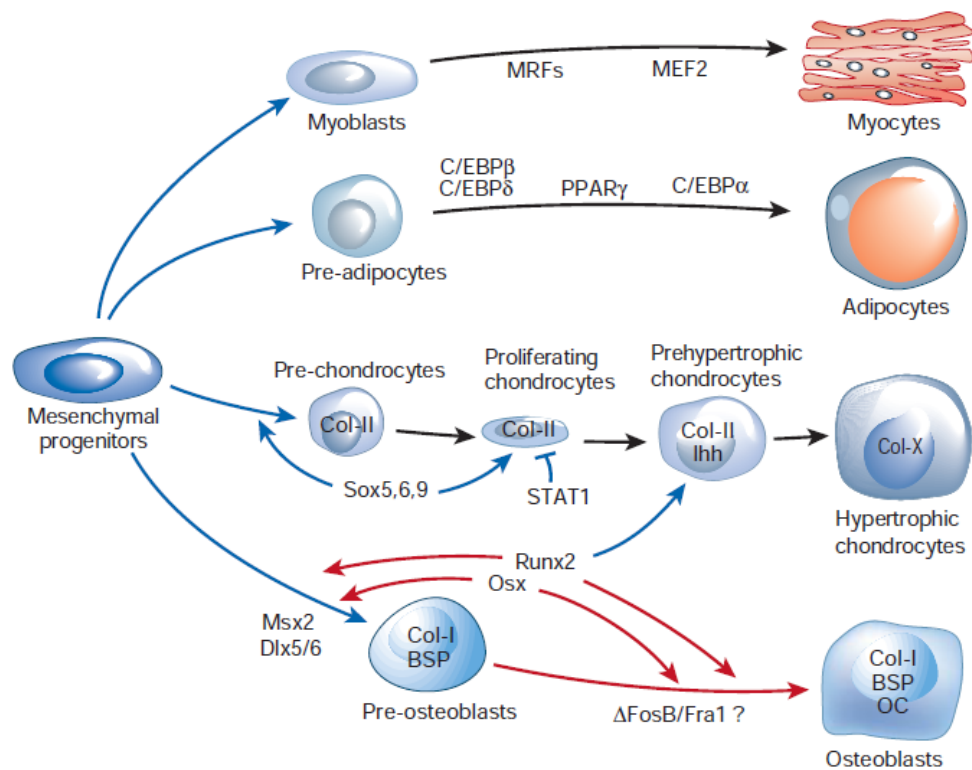


Figura N° 3: vía de diferenciación celular a partir de progenitores mesenquimales, diferenciación de osteoblastos a partir de Msx2, Dlx5/6 y Runx2 (tomado de Harada y Rodan, 2003²⁴).

Osteoclastogénesis: los osteoclastos son macrófagos policariones tejido específicos, crados por diferenciación celular de células precursoras de macrófagos/monocitos en o cerca de la superficie celular ósea. Se ha sugerido que factores derivados del estroma son los que estimulan el proceso de osteoclastogenesis, teniendo en cuenta la cercanía del estroma con la medula ósea²⁶.

Actualmente se conoce que este proceso es permitido por la producción de dos factores hematopoyéticos, TNF-related cytokine RANKL y CSF-1 (colony-stimulating factor-1) y por la subsecuente activación de RANK en la superficie de las células precursoras hematopoyéticas²⁶.

Tanto RANKL como CSF-1 son requeridos para inducir la expresión de genes que tipifican el linaje de los osteoclastos entre estos TRAP, CATK, el receptor de calcitonina y la integrina β_3 , conduciendo al desarrollo de los osteoclastos maduros. Mientras que RANK actúa como regulador de la resorción ósea cuando es activado por sus ligandos²⁶ (Figura N° 4)

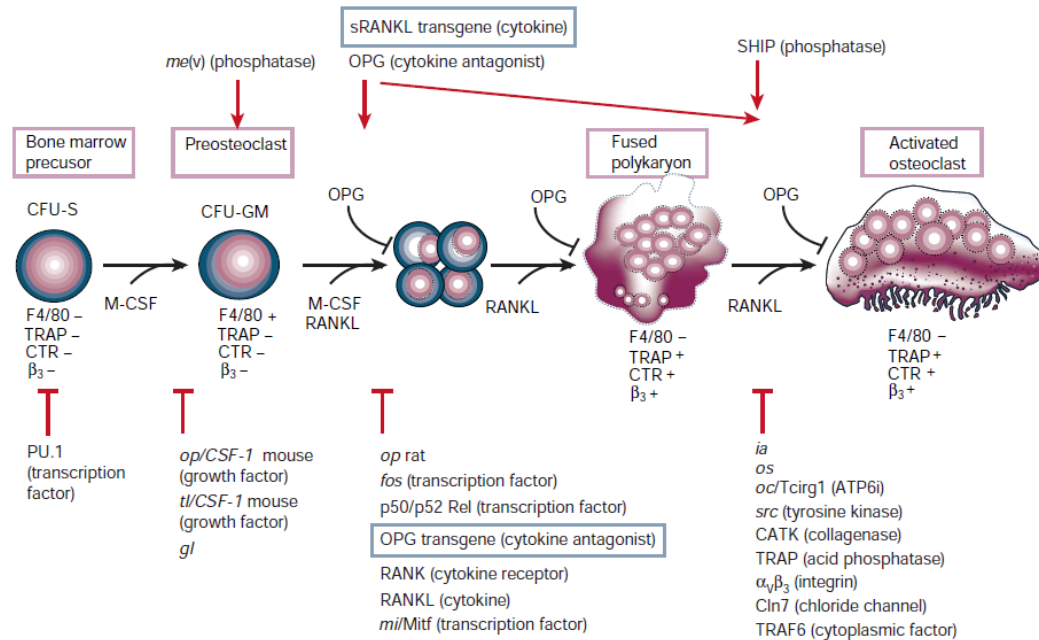


Figura N° 4: vía de regulación de la diferenciación de los osteoclastos (tomado de Boyle. Et al, 2003²⁶)

4.3 Métodos antropométricos y patrones para la evaluación del crecimiento longitudinal.

La evaluación del crecimiento físico se realiza con técnicas antropométricas (peso, talla, perímetro cefálico, entre otras), para las cuales es necesario elaborar estándares nacionales en base al cálculo de percentiles sobre las mismas poblaciones con las que se trabaja²⁸.

Se sabe actualmente que el potencial de crecimiento hasta los 5 años de edad en los distintos grupos étnicos es similar y que variaciones poblacionales de talla

tienen que ver con situaciones de pobreza donde se mezclan carencias alimentarias e infecciones severas y frecuentes²⁸.

La búsqueda de un método útil para determinar la manifestación adecuada del crecimiento ha llevado a establecer patrones de referencia, que se pueden expresar tanto numérica como gráficamente, y que en general proporcionan el valor medio y $\pm 1, 2$ o 3 desviaciones típicas o bien el porcentaje de individuos que se encuentran por debajo de un punto de corte arbitrario²⁹.

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) llevó a cabo un examen exhaustivo de las aplicaciones y la interpretación de los patrones antropométricos. Este examen llegó a la conclusión de que el patrón de crecimiento del National Center for Health Statistics y de la OMS (NCHS/OMS), que había sido recomendado para su uso internacional desde finales de los años setenta, no representaba adecuadamente el crecimiento en la primera infancia y se necesitaban nuevas curvas de crecimiento. La Asamblea Mundial de la Salud apoyó esta recomendación en 1994. En consecuencia, la OMS llevó a cabo el Estudio multicéntrico sobre el patrón de crecimiento (MGRS) entre 1997 y 2003, a fin de generar nuevas curvas para evaluar el crecimiento y el desarrollo de los niños en todo el mundo³⁰ (Figura N° 5).



Figura N° 5: Esquema de localización de la población incluida en le estudio multicentrico de la OMS (tomado de Duran, 2009)³¹.

El método utilizado para construir los patrones de la Organización Mundial de la salud (OMS) se basó por lo general en la distribución Box-Cox-power-exponential, y los modelos definitivos seleccionados se simplificaron según el modelo LMS. En consecuencia, en el cálculo de los percentiles y las puntuaciones z para estos patrones se utilizan fórmulas basadas en el método LMS (L es indicador de simetría, M es la mediana y S es coeficiente de variación)^{30 32}, por lo tanto la OMS sugiere la utilización de las graficas de crecimiento y desarrollo resultantes de este modelo ya que incluyen parámetros que permiten establecer el concepto de crecimiento idóneo en el menor (ANEXO N° 1)³³.

Específicamente para Colombia mediante la resolución 2121 de 2010 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 0 a 18 años de edad,

incluyendo los métodos para toma de medidas antropométricas y las graficas para evaluación del crecimiento longitudinal (resolución 2121 de 2011).

4.4 Talla baja

La talla baja es definida como la altura por debajo de 2 desviaciones estándar (SD) o del tercer percentil, ajustado para edad, género y población⁴¹, y se establece mediante la utilización de graficas para evaluación de los patrones de crecimiento previamente estandarizadas para una población.

Para evaluar correctamente a un paciente con talla baja se requiere una anamnesis completa y un examen físico adecuado. La anamnesis debe considerar en primer lugar una curva de peso y talla con estaturas anteriores, información clave para establecer la magnitud del problema. Igualmente se deben rescatar los antecedentes perinatales^{34 35}.

Tambien se deben detallar hábitos de vida del paciente, incluyendo características de la ingesta alimenticia, actividad deportiva, horas de descanso y uso de medicamentos y drogas como alcohol, tabaco, marihuana o cocaína en niños mayores, y luego deben investigarse los antecedentes familiares: talla de padres, hermanos y si es posible de abuelos. El dato anamnésico sobre tallas familiares, basado en impresiones subjetivas, no es muy confiable, por lo que es preferible la medición de la estatura de cada familiar directamente por el médico. Se deben consignar además los patrones familiares de desarrollo puberal y los posibles antecedentes sobre genopatías y enfermedades crónicas³⁴.

El pediatra de atención primaria es el primer lugar a donde asisten los padres cuando empiezan a percibir talla baja en sus hijos, la aplicación de protocolos (Figura N° 6) adecuados permite descartar las posibles causas de la talla del menor y realizar un buen diagnostico³⁶. La Academia Americana de Pediatría

recomienda que los niños asistan al pediatra cuando están recién nacidos, al mes, a los 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18 meses y a los 2 años. Luego una vez al año hasta que terminen su crecimiento y desarrollo³⁵.

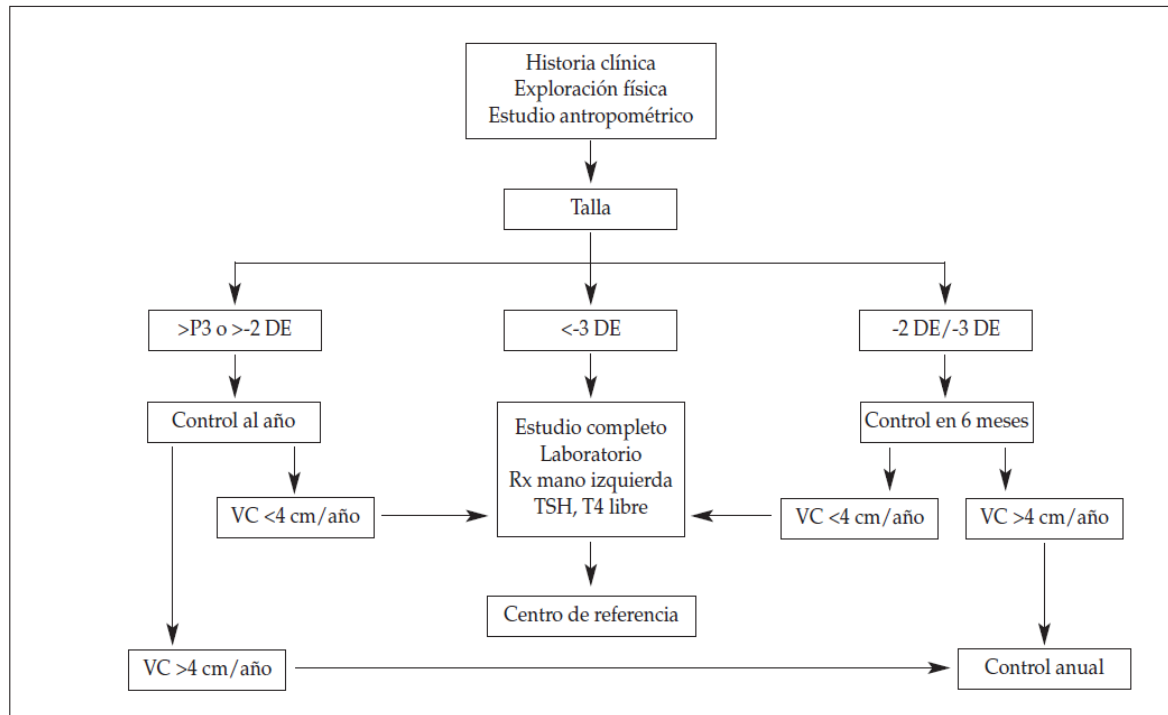


Figura N° 6: protocolo de valoración y seguimiento al hipocrecimiento desde atención primaria³⁵.

Las causas de talla baja se clasifican en³⁴:

1. Variantes normales: talla baja familiar y retraso constitucional.
2. Trastornos primarios del crecimiento como displasias esqueléticas, trastornos del desarrollo intrauterino y anomalías cromosómicas.
3. Alteraciones del crecimiento secundarias a nutrición inadecuada, enfermedades crónicas (como síndrome de malabsorción, insuficiencia renal, alteraciones pulmonares o cardíacas), y enfermedades endocrinológicas (como hipotiroidismo, alteraciones del eje somatotráfico, síndrome de Cushing, o raquitismo).

En muchas clasificaciones diagnosticas de talla se han diferenciado tres grupos: desordenes primarios del crecimiento (condiciones intrínsecas a la placa de crecimiento), desordenes secundarios del crecimiento (condiciones que cambian la fisiología de la placa de crecimiento) y un último grupo en el cual las causas son desconocidas^{41. 37}. Este último grupo se ha denominado **talla baja idiopática (ISS**, por sus siglas en ingles)

De igual forma la talla baja a sido clasificada de la siguiente manera³⁵:

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).
- Desproporcional
 - Displasias esqueléticas.
 - Cromosomopatías.

En la valoración y diagnostico de la posible causa de talla baja se debe tener en cuenta que los factores genéticos son determinantes para el desarrollo de la talla y más aún en el desarrollo del fenotipo de talla baja, jugando un papel importante en diferentes desordenes primarios o secundarios del crecimiento. Los desórdenes del crecimiento pueden estar asociados con anomalías cromosómicas, desórdenes monogénicos o síndromes de etiología desconocida³⁷.

4.5 Epidemiología

El fenotipo de talla baja, es una condición que afecta a más del 2% de la población mundial³⁸. En Estados Unidos por definición, el 2.5% de la población presenta fenotipo de talla baja, sin embargo, el número de niños de bajo crecimiento es mayor a la frecuencia de enfermedades crónicas de la niñez³⁹

En Colombia el porcentaje de niños bajos para la edad se ve aumentado principalmente por factores como la malnutrición en los sectores socioeconómicos más bajos, la información más reciente con representatividad nacional se obtiene de la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2005 (ENSIN 2005). Asimismo, los datos de 1995 y 2000 provenientes de la Encuesta Nacional de Demografía y Salud (ENDS), de aquí se obtiene que la prevalencia de talla baja para la edad en 2005 fue de 12% (sin diferencias significativas entre géneros), menor a la registrada en otras partes de América Latina (Figura N° 7)⁴⁰

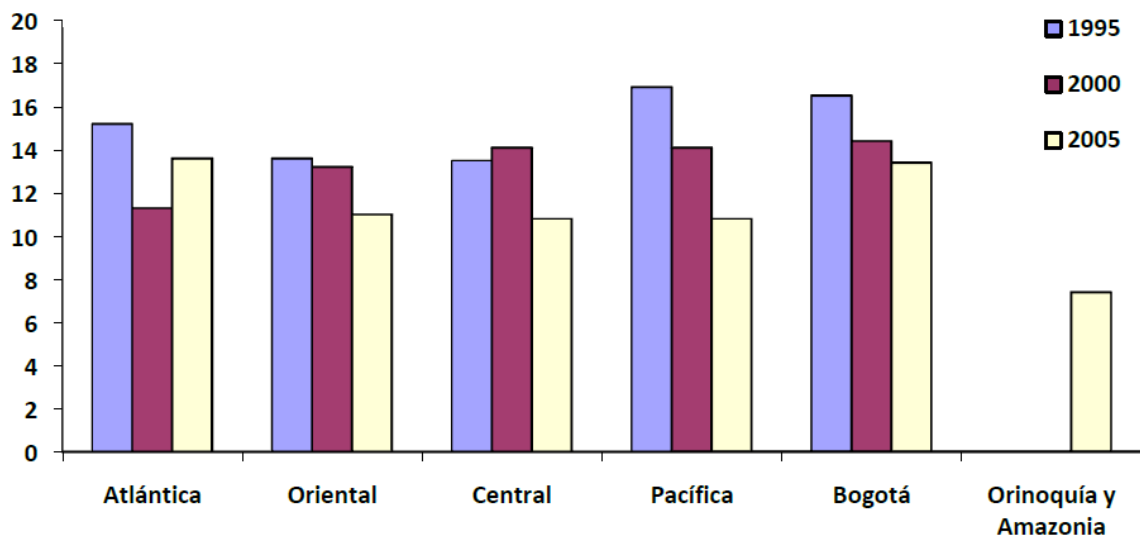


Figura N° 7: Prevalencia (%) de talla baja para la edad según tres encuestas nacionales (ENDS 1995, 2000 y ENSIN 2005), por región en Colombia⁴⁰

Algunos estudios epidemiológicos realizados en niños con talla baja reportan las siguientes frecuencias de patologías asociadas con el fenotipo (Tabla N° 2)

Tabla N° 2: Estudios de frecuencia de patologías relacionadas a fenotipo de talla baja. (Datos de Wit et al⁴¹)

Estudio	Frecuencia	Tipo de patología	Altura de la población.
Wessex growth Study (1992)	8/180 (4.4%)	Enfermedades orgánicas	Por debajo del 3er percentil
Oxford study (1993)	7/260 (3%)	Enfermedades orgánicas	-2SD
Utah growth study (1994)	25/555 (4.5%)	GHD, hipotiroidismo, S. turner	Altura por debajo del 3er percentil, o tasa de crecimiento de 5cm/año
	93/555 (9.5%)	Otras razones médicas para baja talla	
Assessment of Short Stature in Children, Leiden University (2007)	5%	Causas diversas para talla baja	No disponible
	15%	Bajo peso al nacer o baja talla en edad gestacional (SGA)	
Grimberg et al. (2005)	66/278 (23.7%)	Causas orgánicas	No disponible
Green et al (1983)	79/198 (40%)	Causas orgánicas	No disponible

Aproximadamente el 80% de los niños con talla baja evaluados por pediatras no tienen historia de peso y talla bajos al nacimiento y el 10% no presenta patologías que expliquen su condición talla baja o que puedan ser detectadas, por ende hacen parte del grupo de pacientes con talla baja idiopática (ISS)⁴¹.

4.6 Talla Baja Idiopática ISS

El término ISS fue involucrado como observación clínica junto con avances en biotecnología. En 1950, el diagnóstico diferencial de causas endocrinas de niños con talla baja fue establecido por Lawson Wilkins, basado en observaciones clínicas y análisis radiográficos de maduración esquelética. En 1960, los radioinmunoensayos documentaron bajos niveles de GH circulante no solo en niños con panhipopituitarismo sino también en aquellos que presentaban déficit idiopático y aislado de GH. En 1970 y 1980, el desarrollo de pruebas de estimulación de GH, revelaron que los déficits de GH se presentaban en aproximadamente el 1% de los niños con talla baja⁹.

Varios grupos de niños con talla baja fueron categorizados como:

- Talla baja por déficit parcial de GH
- Talla baja por resistencia a la GH

De igual forma un gran grupo de niños con talla baja quedaron sin categorización, entre 1980 y 1990, la literatura refiere a este gran grupo los siguientes términos:

- Variantes normales de Talla baja
- Talla baja sin déficit de GH
- Talla baja idiopática

En 1996, Ranke propuso que la talla baja idiopática fuera definida como una condición en la cual la talla de un individuo es mayor a 2 desviaciones estándar por debajo del promedio ajustado para edad género y población, sin evidencia de anomalías sistémicas, endocrinas, nutricionales o cromosómicas⁴², en 2007 esta definición fue actualizada en la Conferencia consenso de talla baja idiopática en Santa Monica CA, Estados Unidos, teniendo en cuenta que esta condición implica que el tratamiento de los pacientes con ISS es diferente al suministrado a los niños con déficit de hormona de crecimiento⁴³.

El diagnóstico de talla baja idiopática es hecho cuando un niño tiene peso al nacer normal, y talla baja proporcionada, no presenta desordenes orgánicos ni endocrinológicos, no tiene problemas psicosociales y tiene una dieta normal⁴⁴

Se ha reportado que para poder realizar un diagnóstico diferencial en talla baja aislada o patológica, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: talla baja familiar patológica, o no patológica, retardo constitucional del crecimiento, endocrinopatías primarias, talla baja en niñas con anomalías de cromosoma X, y talla baja secundaria por mutaciones en el gen SHOX⁴⁵.

4.5.1 Consecuencias psicosociales de la ISS

Las consecuencias psicosociales en pacientes con talla baja idiopática han sido evaluadas en tres niveles:

- Estrés psicosocial
- Calidad del proceso adaptativo
- Ocurrencia de psicopatologías

Se reporta que aproximadamente del 15-70% de los pacientes con talla baja idiopática presentan algún tipo de trastorno psicosocial debido al estrés que les genera tener talla baja. Actualmente no se ha reportado alguna respuesta con respecto al proceso adaptativo del paciente en su entorno, y con respecto a la ocurrencia de psicopatologías, diferentes estudios reportan que los niños con talla baja presentan disminución de competencias sociales o incremento en los problemas de conducta⁸.

4.5.2 Bases moleculares de la ISS.

Como se menciono anteriormente la talla baja idiopática hace parte de las variantes normales de talla baja, sin embargo actualmente se han asociado algunas causas moleculares a este fenotipo. Dentro de estas causas de mencionan los déficit y la resistencia a de IGF-1 (Tabla N° 3)⁴⁶

Tabla N° 3: bases moleculares de la ISS causada por anomalias en IGF-I (tomado de Rosenfeld, 2005)⁴⁶

Concentración sérica de IGF - I	Etiología
Baja (déficit de IGF-I)	Polimorfismos del gen IGF que resultan en transcripción alterada y/o deficiencia en la traducción Anomalías en las proteínas de unión a IGF. Anomalías en el receptor de GH Heterocigocidad por mutaciones o deleciones del gen receptor de GH. Defectos post-señalización de GH (sistema JAK/STAT)
Normal o elevado (resistencia a IGF)	Bioinactivación de IGF-I por mutaciones en le gen de IGF-I) anomalías en las proteínas de unios a IGF-I anomalías del receptor de IGF-I Defectos post-señalización de IGF-I Resistencia a la acción de IGF-I en la palca epifisaria

Avances en la comprensión de vías celulares que influyen el crecimiento han elucidado varios blancos potenciales que expliquen el fenotipo de talla baja. Entre

estos se destacan la vía de las Janus quinasa 2 (JAK 2) y tirosin quinasa que son activadas por la unión de H y su receptor para la formación de receptores de dimerización. De igual forma la fosforilación de STAT por medio de JAK2 conduce a la translocación de las proteínas citoplasmáticas activadas hasta la membrana nuclear, en donde ocurren eventos de regulación génica inherentes a GH⁹.

Y de igual forma se documenta que el complejo GHR-JAK2 activa vías de señalización como ERK y STAT. Por su parte la activación de ERK conduce a la translocación nuclear y la transcripción temprana de genes, pero no está vinculado a la transcripción de IGF-I. y finalmente se ha descrito que el gen SHOX ejerce su papel funcional en los fibroblastos de la médula ósea⁹

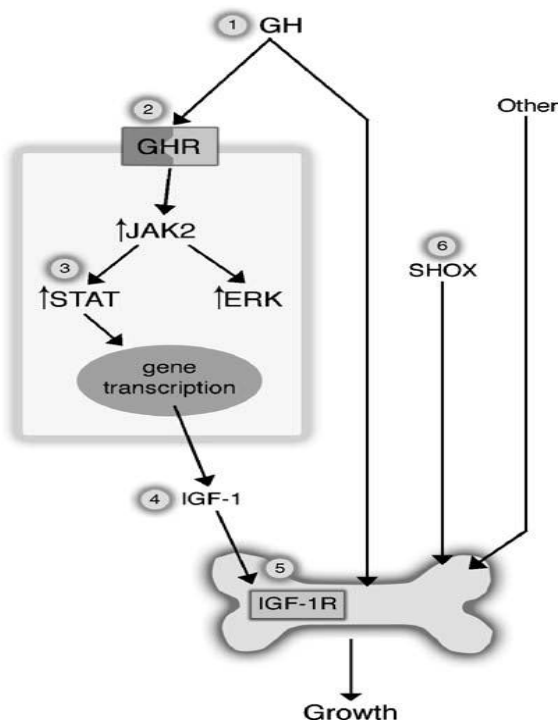


Figura N° 8: Esquema representativo de las vías de señalización que participan en el crecimiento⁹.

4.7 Gen SHOX

SHOX (*Short Stature Homeobox Containing Gene*) es un gen que pertenece a la familia de genes que codifican para proteínas homeodominio (genes Homeobox). Tiene una longitud de 40 Kb dentro de la región pseudoautosómica 1 (PAR1) de los cromosomas sexuales⁴⁷ y está compuesto por 7 exones los cuales codifican para dos transcritos por *splicing* alternativos (Figura N° 9) ^{3 48}.

Este gen está conformado de la siguiente manera: El exón 1 mide 262bp y pertenece a la región no traducida: el exón 2 contiene 209 bp y su región 5' pertenece a la región no traducida. Los exones 3 y 4 poseen 209bp y 58bp respectivamente, y contienen el homeodominio. El exón 5 posee 89bp y los exones 6a y 6b, tienen 1166bp y 625bp respectivamente⁴⁷.

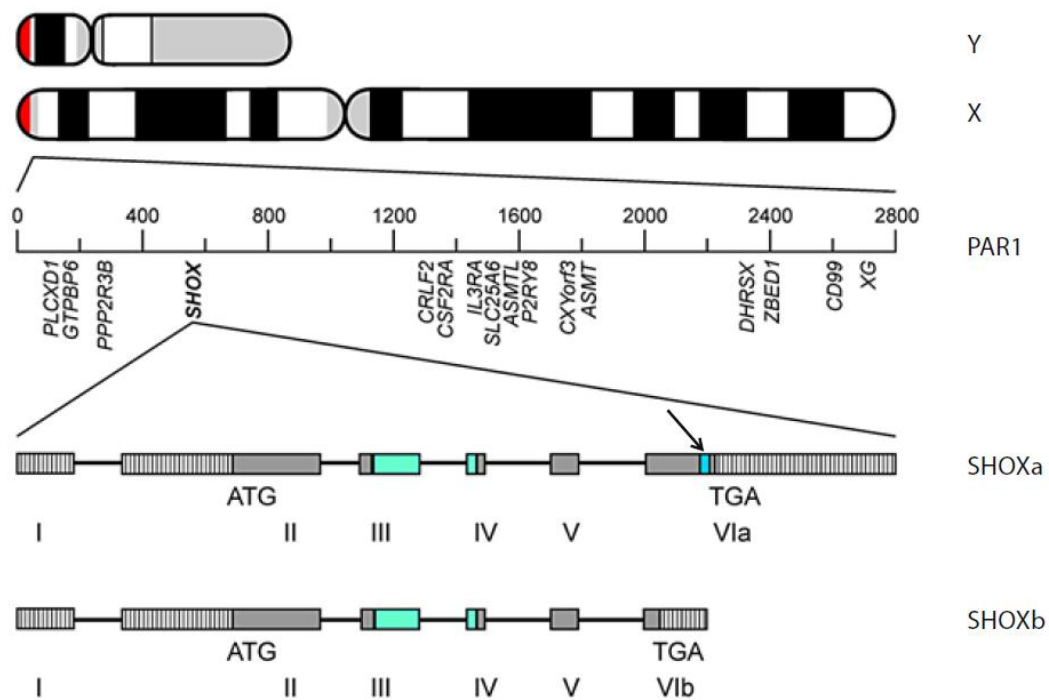


Figura N° 9: Representación esquemática del gen *SHOX*, y sus dos formas alternativas (tomado de Binder Gerhard, 2010⁴⁹). Los bloques representan los exones, UTRs en los bloques con líneas horizontales, el homeodominio con turquesa y las regiones codificantes con gris.

Las dos formas alternativas de este gen *SHOXa* y *SHOXb*, son idénticas hacia el extremo 5', pero varían en su extremo 3' y son traducidas en dos isoformas proteicas de 292 (*SHOXa*) y 225 (*SHOXb*) aminoácidos. Este gen es transcrito a partir de más de dos promotores alternativos que generan mRNAs distintos que codifican proteínas idénticas pero con distintos UTR 5', como se mencionó anteriormente³.

Diferentes genes homeobox juegan un papel fundamental durante la embriogénesis y el desarrollo y ellos pueden regular patrones de formación en invertebrados y vertebrados⁵⁰. Estudios in vitro en líneas celulares de osteosarcoma y en tejido cartilaginoso han demostrado que *SHOX* se expresa en la zona de condrocitos hipertróficos, contribuyendo al desarrollo óseo, debido a que funciona en la detención del ciclo celular, favoreciendo la apoptosis⁵¹.

De las dos isoformas, se ha descrito, que solamente *SHOXa* actúa como un activador transcripcional en células osteogénicas por medio de su dominio de transactivación, OAR (otoparaxial and rax), el cual está ausente en *SHOXb*. Actualmente se ha identificado a NPPB, el cual codifica un péptido natriuretico del cerebro un importante regulador de la osificación endocondral como el primer blanco transcripcional de *SHOX*⁵².

Mutaciones del gen *SHOX*, están involucradas en pacientes con diagnóstico de Discondrosteosis de Leri Weill (heterocigocidad, con una frecuencia del 70%), Displasia mesomelica de Langer (fenotipo más severo, homocigocidad), síndrome de Turner (mayor del 19%) y talla baja idiopática (3-15%)⁵.

Diferentes estudios han indicado la presencia de uno o más genes relacionados a la talla baja en la región pseudoautosómica (PAR)⁵³. Uno de los primeros reportes que vinculan al Gen *Shox* con esta patología lo realizó Ogata y col. en 1995⁵⁴ el

cual reporto que el gen Shox por estar ubicado en PAR1 podía ser el responsable de la talla baja en niñas con síndrome de Turner.

Posteriormente Ellison y col. en 1996⁵⁵, publico que el gen Shox codificaba un factor de transcripción que poseía un homeodominio y estaba presente en diferentes organismos. De igual forma sugirió que este gen estaba restringido a las células osteogénicas y lo denominó PHOG (*Pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene*).

Rao y col. en 1997 realizan la primera publicación de mutaciones del gen Shox, reportando delección de una región de 170kb en PAR1, en 36 individuos con talla baja y diferentes rearrreglos en Xp22 o Yp11.3, en este mismo trabajo se determina que el gen codifica dos formas alternativas por splicing de la proteína SHOX, identificando también mutaciones significativamente funcionales por screening en 91 pacientes con ISS.

El cambio de la nomenclatura PHOG a SHOX es realizada en 1997 teniendo en cuenta la designación de Shox como gen homeótico⁵³.

4.7 Mutaciones en SHOX

4.7.1 Mutaciones intragénicas

Diferentes estudios clínicos y moleculares han identificado el gen *SHOX* como causa del fenotipo de talla baja^{2, 56, 57}. Mutaciones haploinsuficientes en *SHOX* han sido encontradas en pacientes sindrómicos (Discondrosteosis de Leri Weill y 45,X0) mientras que mutaciones homocigotas se han correlacionado con fenotipos como la Displasia mesomélica de Langer. Sin embargo, fenotipos no sindrómicos

y mucho más frecuentes que los sindrómicos podrían ser el reflejo de mutaciones en este gen, como es el caso de talla baja idiopática.

Se estima que las mutaciones en *SHOX* son encontradas con una frecuencia de 1:1000 en el total de la población, con una variación del 2-15% en los casos de talla baja idiopática²³ (tabla 2).

Tabla N° 4 : Frecuencia de mutaciones del gen SHOX en pacientes con talla baja idiopática. (Modificado de Jorge y col²³)

Autor /año	Mutaciones puntuales	Deleciones	Frecuencia
Rao e cols., 1997	1/91	0/91	1.1
Binder, Schwarze y Ranke, 2000	0/68	1/68	1.5
Stuppia e cols., 2003	3/56	4/56	12.5
Huber e cols., 2006 (24)	4/78	8/78	15
Jorge e cols., 2007	2/63	0/63	3.2
Rappold e cols., 2007	9/1534	25/1534	2.2

En cuanto a tipo de mutaciones, Marchini y col, en un *review* sobre ISS, describieron una mayor frecuencia de mutaciones *missense* en el exón 3 del gen, sin embargo, existe todo tipo de mutaciones (nonsense, frameshift, del/in), en todos los exones y recientemente se han descrito mutaciones en regiones no codificantes³ (Figura N° 10)

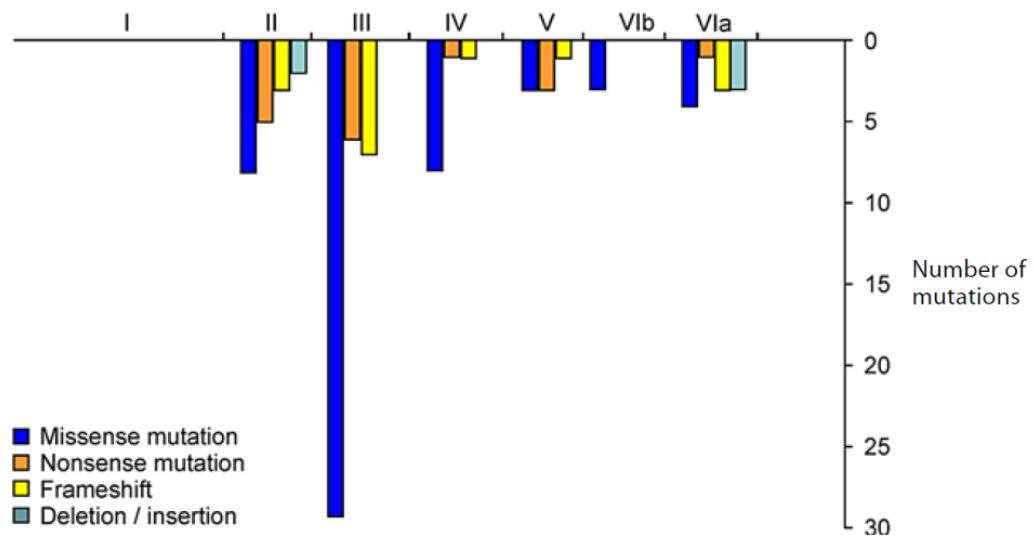


Figura N° 10: Frecuencia de mutaciones puntuales de SHOX en pacientes con talla baja. (Binder G, 2010⁴⁹)

La base de datos de mutaciones del gen SHOX, fue creada en el 2006⁵⁸ y su ultima actualización se realizo en 2010, en ella se reportan un total de 1163 variantes descritas a la fecha y se presenta una discriminación de las mutaciones según su tipo y según su ubicación en el gen (Figura N° 11 y 12).



Figura N° 11: Mutaciones reportadas para el gen SHOX en la base de datos de SHOX

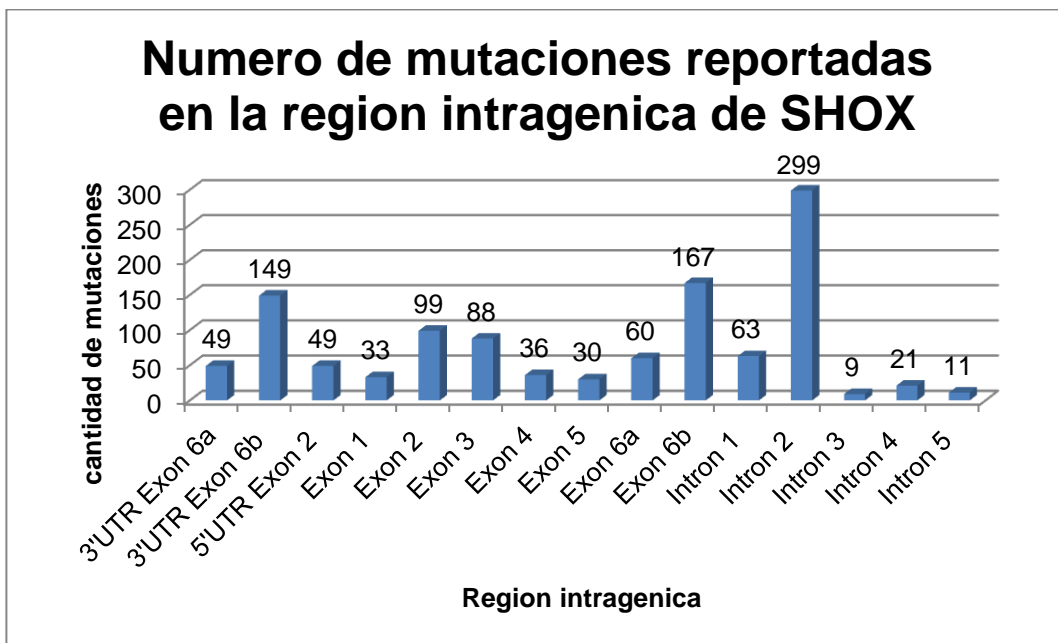


Figura N° 12: numero de mutaciones reportadas en la region intragenica de SHOX

5.4.1.1 Mutaciones en elementos no codificantes (CNE)

Un elemento conservado no codificante es una región de DNA que se encuentra corriente arriba o corriente debajo de un gen y funciona como un transactivador de la transcripción génica⁵.

Recientemente se ha comprobado que elementos conservados no codificantes (CNE) corriente abajo de *SHOX* (Figura N° 13) regulan la función del gen. Estos elementos conservados presentan un dominio regulatorio 250 Kb corriente abajo de *SHOX*, delecionado en pacientes con talla baja idiopática con una frecuencia del 22% y en pacientes con Leri-Weil con una frecuencia del 34%^{4 5}.

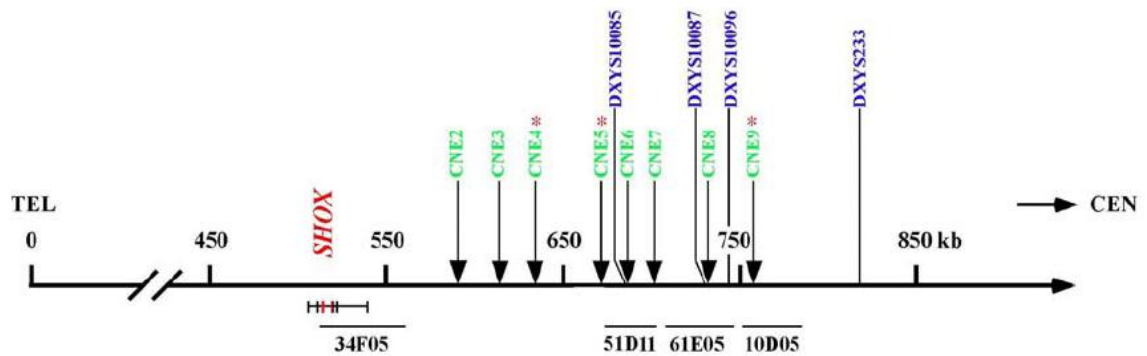


Figura N° 13: Representación esquemática de PAR1, incluye SHOX, y región reguladora 200 a 250Kb corriente abajo. (Tomado de Sabherwal et al⁵)

De esta manera, el 2-15% de los pacientes con talla baja idiopática tienen mutaciones en el gen SHOX y un 22% adicional presentan regiones codificantes de SHOX sin mutaciones, pero con alteraciones génicas de las regiones regulatorias, explicando entonces cerca del 30% de la etiología del ISS^{4 5 24 30 59}

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Caracterizar molecularmente del gen *SHOX* (*Short stature HOmeoboX*) y sus Elementos Conservados No codificantes (CNE), en una muestra de pacientes con talla baja idiopática de la ciudad de Bogotá.

5.2 ESPECIFICOS

5.2.1. Caracterizar fenotípicamente una muestra de pacientes con talla baja idiopática (ISS).

5.2.2. Evaluar la frecuencia de mutaciones intragenicas y de los CNE del gen *SHOX*.

5.2.3 Describir el tipo de mutaciones presentes en la muestra de pacientes con talla baja idiopática.

5.2.4 Correlacionar los hallazgos fenotípicos con las variables genéticas encontradas en el gen *SHOX*.

6. METODOLOGIA

6.1 FASE PREANALITICA

6.1.1 Tipo de estudio

- Estudio descriptivo, transversal, de caracterización epidemiológica (prevalencia) y molecular (tipos de mutaciones) del gen SHOX y sus CNE en individuos con talla baja idiopática, provenientes de la consulta externa de endocrinología pediátrica de 5 centros de referencia (marco muestral de base hospitalaria), y que aceptaron participar en este estudio voluntariamente, para esto se empleo un formato de historia clínica (ANEXO N° 2) y el consentimiento informado debidamente diligenciado por el paciente (ANEXO N° 3) .

6.1.2 Tamaño de muestra

En este estudio se tuvieron en cuenta 52 pacientes con diagnostico Talla Baja Idiopática (ISS por sus siglas en ingles) basado en que el 2% de la población mundial tiene talla baja y de estos el 10% están diagnosticados como talla baja idiopática¹⁸, se tomaron en cuenta los parámetros del numeral 6.1.3. para el calculo del tamaño de muestra.

6.1.3 Cálculo del tamaño muestral

Usando el módulo StatCalc de Epi-Info (6.04) con una precisión de 95% (5% de error), asumiendo una estimación de prevalencia de 30%^{21 26 27}, con un nivel de

confianza de 95% (5% de error alfa). La salida obtenida se muestra en la Figura N° 1.

Datos adicionales:

- El “n” estará regulado por la disponibilidad de pacientes remitidos al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, Hospital Militar Central, Hospital de la Misericordia, Hospital San Ignacio, CENPA, Laboratorio de Investigación Hormonal y se tendrá un nivel de corte de ingreso de los pacientes hasta el 6to mes de iniciada la ejecución del protocolo.
- Cada una de estas instituciones recibe pacientes de distintos regímenes de afiliación al sistema general de seguridad social en salud (régimen contributivo, subsidiado, especial, particulares, territorios nacionales), por lo que consideramos que la muestra es representativa.

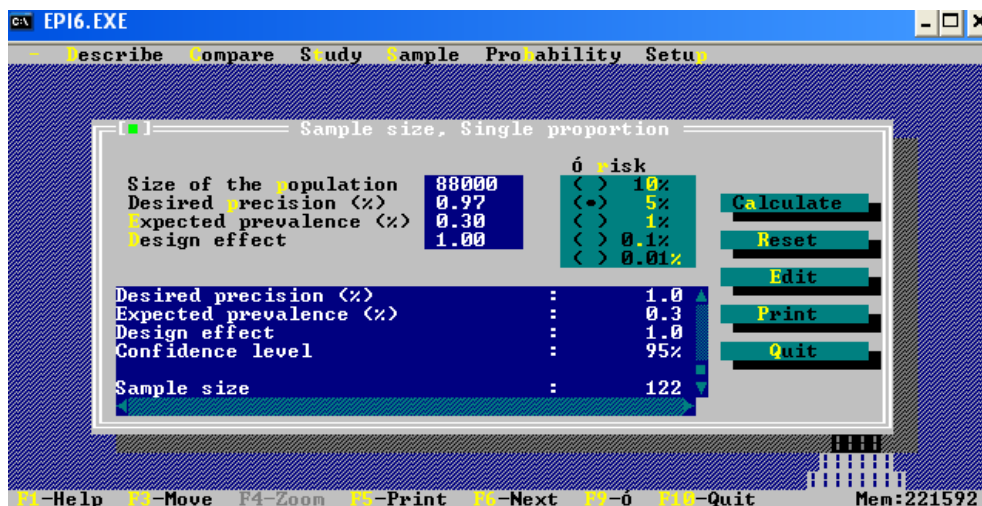


Figura N° 14: Calculo de tamaño muestral usando el módulo StatCalc de Epi-Info (6.04)

6.1.4 Criterios de inclusión

- Se incluyeron pacientes que cumplieran con los siguientes criterios:
 - Niños entre 2 y 16 años
 - Talla por debajo de 2,0 desviaciones estándar (SD) ajustado para edad cronológica, género y población
 - 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.

6.1.5 Criterios de exclusión

- 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, puesto que estos pacientes tendrán mayoritariamente talla baja de origen sindromico.
- Diagnostico de retardo constitucional de Crecimiento y Desarrollo valorado por índice maduracional
- RCIU (Restricción del Crecimiento Intra Uterino)

6.2 FASE ANALITICA

6.2.1 Muestras

Se tomó una muestra de sangre periférica, de 7mL en tubo con anticoagulante EDTA a cada uno de los pacientes.

6.2.2 Extracción de DNA y RNA

La Extracción de DNA se realizó con el kit Ultraclean Bloos DNA Isolatio Kit de Mo Bio a partir de una muestra de 300 µl de sangre, según las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido fue cuantificado en nanodrop y almacenado a -20°C para su posterior análisis.

6.2.3 Amplificación y electroforesis capilar.

Se emplearon kits de MLPA MRC Holland para *SHOX* y sus CNE (SALSA MLPA KIT P018-E1 *SHOX* y P018-F1 versión actualizada), los cuales contienen sondas para cada exón del gen *SHOX* humano, una sonda ubicada antes de la región promotora del gen y diferentes sondas para detectar secuencias corriente abajo del *SHOX*, las cuales han sido implicadas en la regulación de la transcripción del gen (ANEXO N° 4 y ANEXO N° 7).

La técnica MLPA o amplificación de sondas dependiente de ligamiento múltiple, es una técnica diseñada por MRC Holland, que consiste de cuatro grandes pasos (Figura N° 15):

1. Denaturación e hibridación de las sondas de MLPA, en el cual el DNA es denaturado e incubado toda la noche con una mezcla de sondas. Las

sondas están compuestas de dos oligonucleótidos separados los cuales hibridizan con su secuencia diana complementaria.

2. Reacción de ligamiento: las sondas previamente hibridizadas son ligadas a la secuencia diana por medio de una ligasa termoestable.
3. Reacción de PCR: solamente las sondas ligadas son exponencialmente amplificadas mediante PCR, empleando primers diseñados a partir de secuencias altamente conservadas.
4. Separación y amplificación de productos empleando electroforesis capilar.

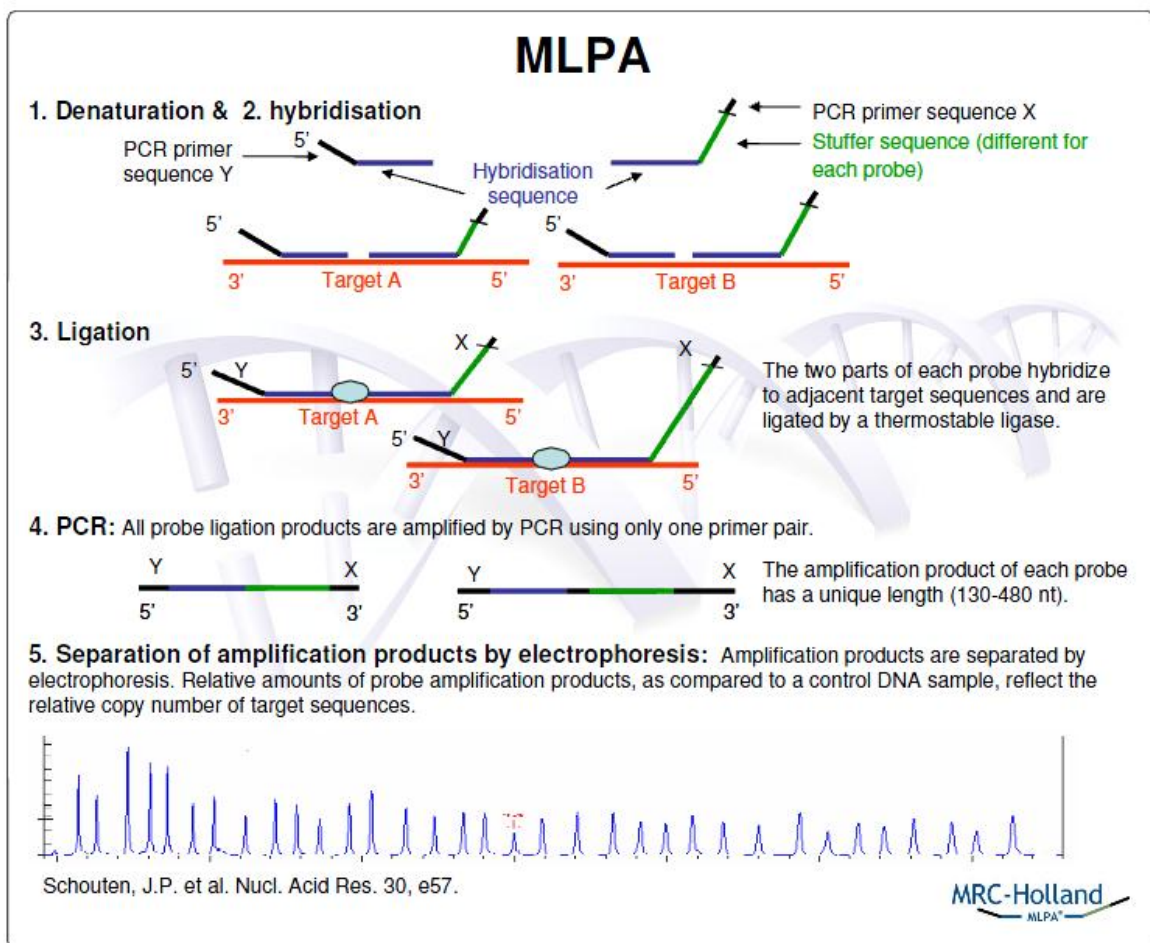


Figura N° 15: principio de la tecnica MLPA (Tomado de www.mlpa.com)

El procedimiento se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante, las cuales se detallan a continuación:

Denaturación del DNA (Dia 1)

- Marcar tubos de PCR de 0.2 ul para cada una de las muestras.
- Adicionar 5uL de DNA en cada tubo y en otro solución TE o agua para el control.
- Colocar los tubos en el termociclador e iniciar el procedimiento de denaturación: 5 minutos a 98°C, enfriar las muestras a 25°C.
- Continuar con el proceso de hibridación

Reacción de Hibridación (Dia1)

- Preparar el Master Mix de hibridación que contiene para cada reacción: 1.5uL de buffer MLPA + 1.5uL de Mix de sondas. Mezclar bien por pipeteo o vortex.
- Sin sacar los tubos del termociclador, y mientras este en 25°C, adicionar 3uL de master mix de hibridación a cada tubo, mezclar bien por pipeteo.
- Continuar el programa de termociclado: Incubar por 1 minuto a 95°C, dejar de 16 a 20 horas a 60°C.

Ligamiento (Día 2)

- Preparar el Master mix de ligamiento: 3uL de buffer A Ligasa-65 + 3uL de buffer B Ligasa-65 + 25uL de dH₂O, mezclar bien por pipeteo o vortex.
- Adicionar 1uL de Ligasa-65 por cada reacción al Master mix de ligamiento. Mezclar gentilmente por pipeteo, nunca por vortex.
- Continuar con el programa de termociclado a 54°C.
- En el termociclador, a 54°C, adicionar 32 uL del master mix de Ligamiento a cada tubo, mezclar por pipeteo.

- Continuar el programa de termociclado: 15 minutos a 54°C (para el ligamiento), seguido por 98°C para inactivación por calor de la Ligasa-65. Pausar el termociclador a 15°C.

Nota: En este punto el procedimiento puede detenerse. Los productos de ligamiento pueden ser almacenados a 4°C hasta por una semana y a -20°C por largos periodos de tiempo.

Reacción de PCR (Día 2)

- Marcar nuevos tubos de 0.2uL para la reacción de PCR, cubrirlos con papel aluminio.
- Preparar el buffer mix PCR que contiene para cada reacción: 4uL de SALSA PCR buffer + 26uL de dH₂O. Mezclar brevemente por vortex
- Adicionar 30uL de buffer mix PCR a cada tubo nuevo.
- A temperatura ambiente, transferir 10uL del producto de ligamiento (paso 12) a su respectivo tubo de PCR.
- Preparar el master mix polimerasa que contiene para cada reacción: 2uL de primers SALSA PCR + 2 uL de buffer de dilución de enzima SALSA PCR + 5.5uL de dH₂O + 0.5uL de SALSA polimerasa. Mezclar bien por pipeteo, no vortex, almacenar en hielo hasta su uso.
- Colocar los tubos en el termociclador, iniciar programa a 60°C.
- Mientras los tubos están en el termociclador a 60°C, adicionar 10uL del mix de polimerasa a cada tubo, mezclar por pipeteo y continuar inmediatamente el programa de termociclado: 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C. Finalizar con 20 minutos de incubación a 72°C y llevar a temperatura de 15°C hasta iniciar la electroforesis capilar.

Nota: Los productos de PCR pueden ser almacenados a 4°C hasta por una semana y a -20°C por largos periodos de tiempo.

Los amplificadores se analizaron por electroforesis capilar en un ABI 310 de Applied Biosystem aplicando el siguiente protocolo:

Pre-tratamiento y características para electroforesis capilar en ABI-Prism 310

Posterior a la reacción de PCR, mezclar 0.75uL de producto de PCR + 0.75uL de agua + 0.5 de marcador de peso (LIZ 500) + 13.5uL de formamida HiDi. Incubar por 2 minutos a 80°C

Capilar de 47cm, POP4, voltaje de inyección de 1.6kV, tiempo de inyección 15 segundos.

6.3 FASE POSTANALITICA

6.3.1 Plan de análisis.

Para el análisis de resultados se emplearon los formatos de verificación (ANEXO N° 6 y ANEXO N° 7) y el Software Coffalyser v 9,4 aportado por MRC Holland el cual calcula el Odds Ratio para cada una de las sondas en cada uno de los pacientes, para este caso un ratio $<0,7$ fue considerado como delección y $>1,3$ correspondía a una duplicación, igualmente para realizar un análisis adecuado los pacientes fueron comparados contra 3 controles pertenecientes a DNA de personas con talla normal para los estándares de la población Colombiana.

Se elaboró una descripción no analítica de las diferentes variables entre los pacientes (variables continuas: medidas de tendencia central y dispersión; y discretas: frecuencia y porcentaje).

7 RESULTADOS

7.1 Descripción de la población de estudio

En este proyecto fueron incluidos 52 pacientes que asistieron a consulta especializada con endocrinólogos peditras del 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 y consulta especializada en genética clínica del Instituto de Genética de la Universidad Nacional (Tabla N° 5)

Tabla N° 5: Cantidad de pacientes incluidos en el estudio según centro de referencia.

CENTRO DE REFERENCIA	Cantidad de pacientes reclutados
Hospital Militar Central	17
Hospital Universitario San Ignacio	4
Hospital La Misericordia	3
Centro nacional de Endocrinología Pediátrica y del Adolescente	4
Centro Nacional de Endocrinología y Metabolismo	5
Instituto de Genética Universidad Nacional	13
Laboratorio de Investigación Hormonal	6
Total pacientes 52	

En cuanto a la procedencia de los pacientes el 78.8% fueron naturales y procedentes de la ciudad de Bogotá (Tabla N° 6)

La descripción detallada de los pacientes se muestra en la Tabla N° 8

Tabla N° 6: Procedencia de los sujetos de investigación

Ciudad de Procedencia	Total de pacientes
Apulo/Cundinamarca	1
Bogotá	41
Neiva/Huila	1
Duitama/Boyacá	1
Gachancipá/Cundinamarca	1
Caparrapí/Cundinamarca	1
Ricaurte/Nariño	1
Chía/Cundinamarca	1
Tunja/Boyacá	1
Ibagué/Tolima	1
Facatativá/Cundinamarca	1
Chocontá/Cundinamarca	1
Total General	52

De los 52 pacientes, 35 fueron mujeres y 17 hombres, con un promedio de edad cronológica de $11,3 \pm 6,3$ años, talla promedio de $122,6 \pm 21,6$ cm y peso promedio de $28,3 \pm 13,6$ gr (Tabla N° 7)

Tabla N° 7: descripción antropométrica de los pacientes según el género

	Mujeres	Hombres	p-valor
	Media \pm SDS	Media \pm SDS	
n	35	17	
Edad cronológica (años)	$11,7 \pm 6,9$	$10,4 \pm 5,7$	0,420
Talla (cm)	$122,8 \pm 21,32$	$122,4 \pm 22,9$	0,001
Peso (kg)	$28,5 \pm 13,6$	$27,5 \pm 13,9$	0,368
SDS* de la talla	$2,5 \pm 1$	$2,97 \pm 1$	0,139
Edad de diagnostico de talla baja	5.17 ± 4.41	4.21 ± 6.2	0.622
Bajo peso al nacer (<2500gr)	7	3	NA
prematuros (<36 semanas)	1	2	NA
pacientes con ISS desproporcionada	5	2	NA

talla medio parental	169,3 ± 20,8	164,6± 21,7	0,008
*SDS:	Desviación		Estándar

Tabla N° 8: pacientes con diagnóstico de talla baja idiopática incluidos en el estudio

	Genero	Edad cronológica (años)	Edad gestacional (semanas)	Talla al nacer (cm)	Peso al nacer (gr)	Talla (cm)	SDS de la talla	Peso (kg)
ISS 01	F	10	36	53	3000	125	-2	22
ISS 02	M	14	40	NR	NR	144	-3,05	32
ISS 03	F	9	35	48	2380	122	-2	25
ISS 04	F	10	36	48	2600	126	-2	23
ISS 05	F	12	40	49	2300	132.5	-3	31
ISS 06	M	16	38	50	2900	151	-3,33	52
ISS 07	F	10	39	51	3500	123	-3	
ISS 08	F	9	39	49	3000	115	-3	20,5
ISS 09	M	11	38	48	3600	133	-2	28
ISS 10	F	4	40	51	3200	88.6	-3,5	12.7
ISS 11	M	13	37	49	2900	143	-2	16.5
ISS 12	F	6	40	48	3080	90	-5	13
ISS 13	M	4	27	35	940	90	-3,5	12
ISS 14	F	11	40	52	3000	127.8	-2,6	30,4
ISS 15	M	14	39	50	3100	146.8	-2,14	45,8
ISS 16	M	6	39	49	3060	105	-3	45
ISS 17	F	8	38	49	2500	119	-4	24,5
ISS 18	F	17	40	48	2460	148.5	-2,2	43,5
ISS 19	M	3	38	47	2420	90	-2,5	11,6
ISS 20	F	22	NR	NR	NR	148	-2	39
ISS 21	F	7	36	45	2378	112	-2,5	17,5
ISS 22	F	4	37	43	1740	94	-3	12
ISS 23	M	17	40	50	3000	146	-4	34
ISS 24	F	11	40	45	2450	131	-2,5	27

	Genero	Edad cronológica (años)	Edad gestacional (semanas)	Talla al nacer (cm)	Peso al nacer (gr)	Talla (cm)	SDS de la talla	Peso (k)
ISS 25	M	6	42	50	3500	102	-3	16
ISS 26	F	16	40	NR	2700	152	-2,5	50
ISS 27	F	11	42	52	3200	125	-2,75	28,5
ISS 28	F	11	40	49	3500	130,5	-2,5	28
ISS 29	F	8	40	48	2800	118	-2	25
ISS 30	F	2	38	47	2790	81	-3,63	11
ISS 31	M	7	32	NR	1300	115	-2	25,5
ISS 32	M	12	40	48	3000	128	-3	33,5
ISS 33	F	9	39	48	2800	115,4	-3,5	21,5
ISS 34	M	4	39	44	2900	92,5	-2	14
ISS 35	F	11	39	45	2500	132	-2,5	30,5
ISS 36	F	4	36	44	2250	102	-1,5	15
ISS 37	F	15	40	50	2500	143	-3	45
ISS 38	M	7	39	50	2850	104,5	-3,44	16
ISS 39	F	12	40	NR	NR	135,5	-2,82	36,1
ISS 40	F	4	37	47	2800	98	-2,5	13,5
ISS 41	F	2	40	43	2200	79	-1	8
ISS 42	M	15	38	49	3400	157,5	-2	51,6
ISS 43	F	14	38	46	3000	150	-1,5	43,5
ISS 44	F	12	38	48,5	2500	144,5	-1,5	33,5
ISS 45	F	16	40	45	2500	144	-5	45
ISS 46	F	14		NR	NR	150	-3,7	55
ISS 47	F	16	40	49	3000	143	-5	63,5
ISS 48	F	14	39	38	2300	137	-3,58	37
ISS 49	F	7	40	42	2900	107	-2	17,8
ISS 50	M	9	40	51	3500	121	-2	22,4

ISS 51	F	4	39	46	3014	89	-3	12,4
ISS 52	F	11	38	47	2750	130	-3,5	25,2

NR: No Reporta

7.2 Análisis Molecular

Para llevar a cabo el análisis de los pacientes con diagnóstico de talla baja idiopática, se empleó la técnica de Amplificación de sondas por ligamiento múltiple o MLPA, por sus siglas en Inglés, a partir de electroforesis capilar se obtuvieron electroferogramas (Figura N° 16) que fueron analizados de acuerdo a la altura y amplitud de los picos para cada sonda del kit, posteriormente se analizaron los odd ratios obtenidos a partir del Software Cofflyser v 9,4 comparados contra 3 controles obtenidos a partir de personas con talla normal dentro los rangos establecidos para la población Colombiana.

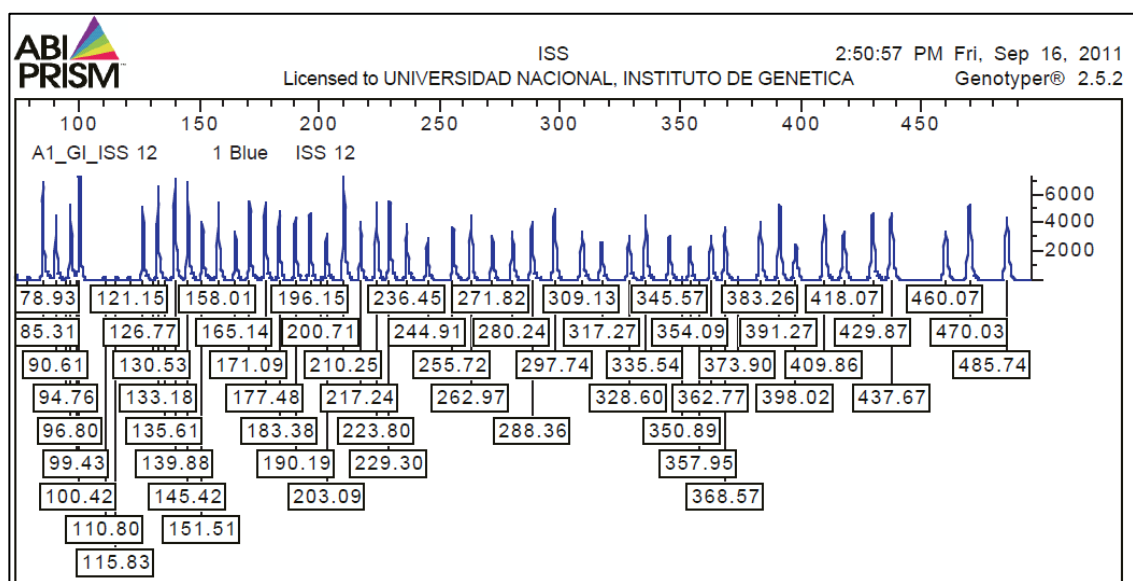


Figura N° 16: electroferogramas obtenidos a partir de electroforesis capilar

La Figura N° 19, presenta un esquema del resultado de todos los pacientes analizados en este estudio, la ausencia de las sondas 44 y 45 en 29 de los 52 pacientes es debido a que estos fueron analizados con el kit P018-E1.

De los 52 pacientes analizados, 4 (2 mujeres, 2 hombres) involucraban pérdida o deleción en región intragénica y uno (paciente ISS 06) presento una duplicación al

final de la región reguladora del gen SHOX, involucrando el elemento regulador no codificante 9 (CNE 9), (Figura N° 17) lo que corresponde a una frecuencia del **9,6%** de alteraciones del gen shox en pacientes colombianos con talla baja idiopática (Figura N° 19). Estos pacientes presentaban un fenotipo normal, acorde con los criterios de inclusión y exclusión tenidos en cuenta para la selección y diagnóstico de los pacientes (Tabla N° 9).

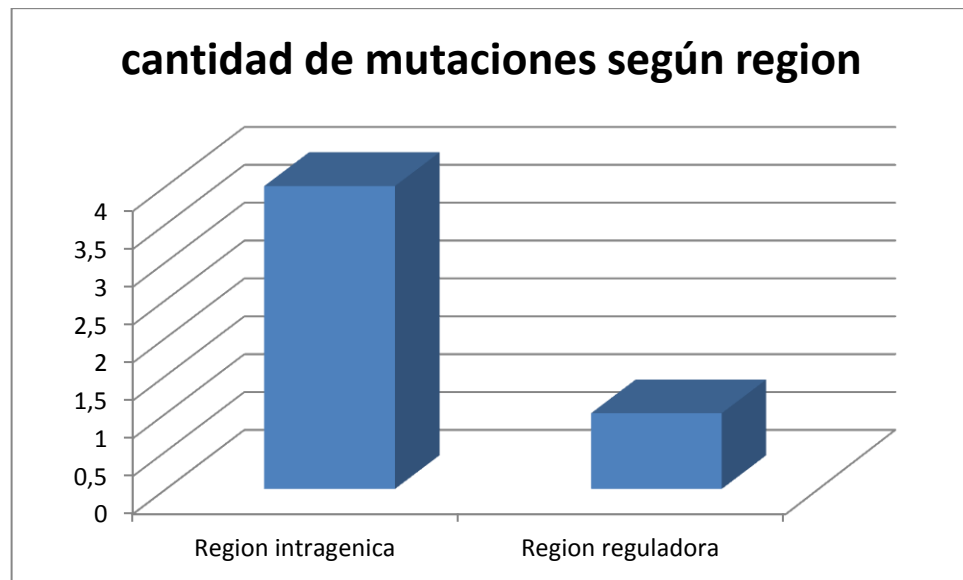


Figura N° 17: numero de mutaciones encontradas en pacientes con ISS según la ubicación en el gen.

Tabla N° 9: Descripción fenotípica de los pacientes con anomalías en el gen SHOX

	Pacientes				
	ISS 02	ISS 06	ISS 14	ISS 38	ISS 39
Genero	M	M	F	M	F
Edad cronológica (años)	14	29	11	7	12
Edad gestacional (semanas)	40	40	40	40	40
Talla al nacer (cm)	NR	NR	52	50	NR
Peso al nacer (gr)	NR	NR	3000	2850	NR

Talla (cm)	144	151	127,8	104,5	135,5
SDS de la talla	-3,05	-3.33	-2,6	-3.44	-2,82
Peso (kg)	32	52	30,4	16	36,1
Talla medio parental	162,5	162	154,5	144,5	168,5
Talla baja proporcionada	Si	Si	Si	Si	Si
Edad de diagnostico de ISS (años)	12	2	5	4	11

NR: No Reporta

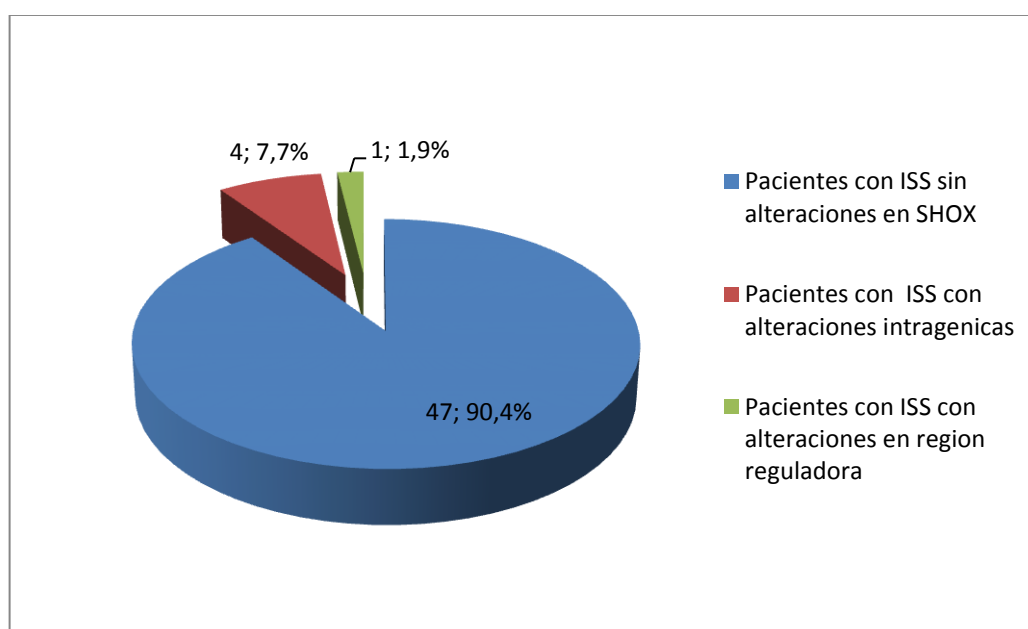


Figura N° 18: Frecuencia de alteraciones del gen shox encontrada en la población de estudio.

Se realizo una correlación entre las medias de los datos del grupo de pacientes sin mutaciones del gen shox y el grupo de pacientes con mutaciones en el gen shox, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Tabla N° 10).

Tabla N° 10: correlacion entre el grupo de pacientes sin alteraciones en Shox y el grupo de pacientes con alteraciones en Shox.

	Pacientes sin alteraciones en shox (Media ± SDS)	Pacientes con alteraciones en shox (Media ± SDS)	p-valor
n	47	5	
Edad	11,06 ± 6,49	12,6 ± 3,5	0,088
Talla	121,6 ± 21,9	132,6 ± 17,9	0,020
Peso	27,62 ± 13,5	12,6 ± 3,5	0,357
SDS	-2,57 ± 1,52	-3,04 ± 0,34	0,686
edad de diagnostico de talla baja	6,3 ± 6,9	6,8 ± 4,8	0.729

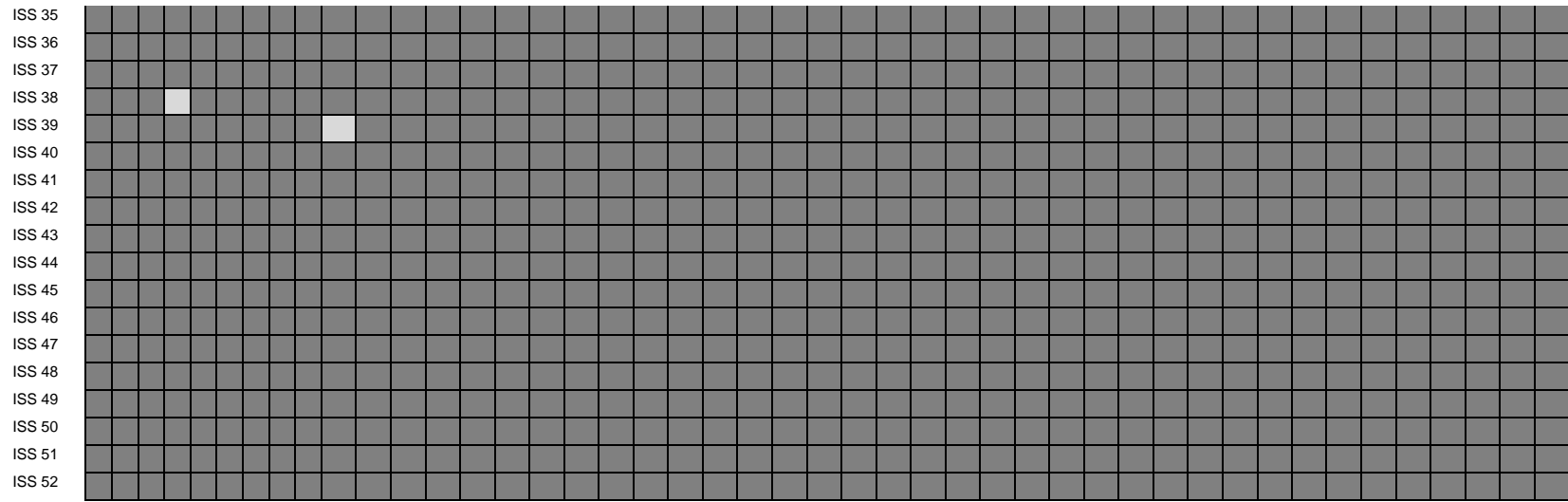
Para establecer si las mutaciones en estos pacientes fueron heredadas o *de novo*, se realizo el procedimiento de MLPA empleando DNA de cada uno de los padres de los pacientes afectados, encontrando que las mutaciones para el paciente ISS 06 y la paciente ISS 14 presentaban herencia via paterna y materna respectivamente. En los padres del paciente ISS 38 no se evidencio presencia de la mutacion hallada en este paciente por lo tanto se refiere como una mutacion *de novo*.

De los pacientes ISS 02 e ISS 39 no se pudo obtener DNA del padre, por lo tanto no se puede establecer si los hallazgos en estos pacientes son heredados o *de novo*.

Tabla N° 11: especificación de mutaciones heredadas y de novo para cada paciente

	Pacientes				
	ISS 02	ISS 06	ISS 14	ISS 38	ISS 39
Mutación heredada	No /sin datos del padre	Si/ vía paterna	Si/ vía materna	<i>De novo</i>	No/ sin datos del padre
Talla del padre (cm)	165*	161	168	162	152*
Talla de la madre (cm)	147	150	154	162	150

* Dato referido por la madre



■ Región normal

□ Perdida/delección

■ ganancia/duplicacion

De los pacientes con hallazgos de pérdidas en región intragénica, el paciente ISS 02 presentó pérdida de heterocigocidad (LOH) en la región del exón 6, la paciente ISS 148 presentó LOH en la región del exón 1 incluyendo parte de la región UTR 5' del gen, el paciente ISS 38 presentó LOH en la región correspondiente al exón 2, y la paciente 39 reportó LOH en el área del intrón 6b (Tabla N° 12)

El paciente ISS 06 presenta una ganancia en el área correspondiente al elemento no codificante conservado 9, que hace parte de la región reguladora del gen SHOX (Tabla N° 12)

Tabla N° 12: descripción de los hallazgos por MLPA en 5 pacientes con talla baja idiopática

	Genero/edad	MLPA	Posición cromosómica	Posición Genica
ISS 02	M/14	Del PAR1 sonda 8	Xp22.33	Exón 6
ISS 14	F/11	Del PAR1 sondas 2-3	Xp22.33	UTR 3' Exon 1
ISS 38	M/7	Del PAR1 sonda 4	Xp22.33	Exón 2
ISS 39	F/12	Del PAR1 sonda 10	Xp22.33	Intrón 6b
ISS 06	M/29	Ganancia PAR1 sondas 22-23	Xp22.33	CNE 9

El reporte obtenido a través del software Coffalyser v. 9.4 para los pacientes con anomalías en el gen shox se muestra en la Tabla N° 13, para este caso la paciente ISS 14 presenta ausencia de dos de las sondas control debido a que fue analizadas con la versión anterior del kit SALSA MLPA P018 E1Shox.

Los electroferogramas obtenidos para cada uno de los pacientes son mostrados en la Figura N° 20, sin embargo en estos no es posible evidenciar la pérdida o

ganancia encontradas en los pacientes debido a que solo permiten un análisis cualitativo y no muy específico.

Tabla N° 13: hoja reporte del software Coffalyser mostrando los OR calculados para cada sonda en los pacientes con anomalías del gen SHOX.

Posicion Cromosomica	longitud	Gen	OR	OR	OR	OR	OR
			ISS 02	ISS 06	ISS 14	ISS 38	ISS 39
Xp22.33	211	X-000.2 PPP2R3B	0,81	0,81	1,2	1,11	1,01
Xp22.33	266	X-000.5 LOC159015	1,14	1,14	0,68	1,17	1,1
Xp22.33	166	X-000.5 SHOX Exon 01	0,88	1,05	0,68	0,95	0,96
Xp22.33	204	X-000.5 SHOX Exon 02	1,21	0,94	0,87	0,52	1,07
Xp22.33	245	X-000.5 SHOX Exon 03	1,15	1,15	0,8	1,04	1,03
Xp22.33	300	X-000.5 SHOX Exon 04	1,13	1,13	0,82	0,98	0,97
Xp22.33	337	X-000.5 SHOX Exon 05	0,73	0,88	1,3	1,13	1,09
Xp22.33	231	X-000.5 SHOX Exon 06	0,56	0,83	1,24	1,06	0,97
Xp22.33	226	X-000.5 SHOX Intron 06A	1	0,87	1,12	0,96	0,97
Xp22.33	392	X-000.5 SHOX Intron 06B	0,82	0,94	1,24	0,98	0,53
Xp22.33	136	X-000.5 SHOX-area	1,01	0,95	1,04	1,07	0,98
Xp22.33	154	X-000.5 SHOX-area	1,07	1,11	0,79	1,01	1,04
Xp22.33	172	X-000.5 SHOX-area	1	0,95	1	0,99	0,98
Xp22.33	199	X-000.5 SHOX-area	0,82	1,12	1,13	1,02	1
Xp22.33	318	X-000.5 SHOX-area	0,92	1	1,16	0,97	0,93
Xp22.33	432	X-000.5 SHOX-area	0,93	1,1	1,08	0,97	1,1
Xp22.33	463	X-000.5 SHOX-area	1,09	0,86	1,25	1,03	1,08
Xp22.33	290	X-000.5 SHOX-area	0,9	1,04	0,85	1	0,95
Xp22.33	185	X-000.5 SHOX-area	0,96	0,93	0,9	0,98	0,96
Xp22.33	148	X-000.5 SHOX-area	1	1,04	0,9	1,07	1,04
Xp22.33	178	X-000.5 SHOX-area	0,99	1,03	0,8	0,88	0,94
Xp22.33	442	X-000.5 SHOX-area	0,85	1,36	0,8	0,89	1,09
Xp22.33	377	X-000.5 SHOX-area	0,92	1,58	0,93	0,99	1,07
Xp22.33	403	X-001.3 CRLF2	0,86	1,12	0,9	1	0,94
Xp22.33	386	X-001.4 CSF2RA	1,14	0,91	0,87	1,07	0,96

Xp22.33	142	X-001.4 IL3RA	0,99	0,96	0,89	1	1,01
Xp22.33	310	X-001.7 ASMT	0,74	0,87	1,29	1,07	1
Xp22.33	453	X-002.4 ZBED1	0,86	1,08	1,25	1,03	1,07
Xp22.33	254	X-003.0 ARSF	0,88	0,97	0,87	1,03	1,08
Xp22.33	328	X-003.6 PRKX	1,05	0,97	1,06	0,92	1,02
Xp22.31	283	X-006.0 NLGN4X	0,78	1,17	0,7	1,04	0,98
Xp22.31	238	X-008.6 KAL1	1,29	0,93	1,07	1,01	0,96
Xp22.2	274	X-014.8 FANCB	0,92	1,05	0,75	0,95	0,96
Xq25	420	X-129.1 AIFM1	0,92	0,9	1,09	0,96	1,08
Xq28	355	X-154.8 VAMP7	0,88	1,01	0,77	0,96	0,92
01p22	160	C	1,12	1	0,71	0,96	0,97
01q32	346	C	0,92	0,94	0,9	1,05	1,01
04p16	191	C	0,75	0,98	0,9	0,93	1,01
05q31	130	C	1,07	1,14	1,11	1,15	1,01
09q31	490	C	1,21	0,86	1,23	0,95	1,05
13q14	219	C	1,05	1,1	0,73	0,95	0,88
15q21	412	C	0,92	0,83	0,75	1,01	1,01
16p13	369	C	1,1	1,19	0,84	1,04	1,08
16p13	474	C	0,9	0,98		1,01	1
18q21	261	C	1,22	1,05		0,98	1

OR: ODDS RATIO



Normal

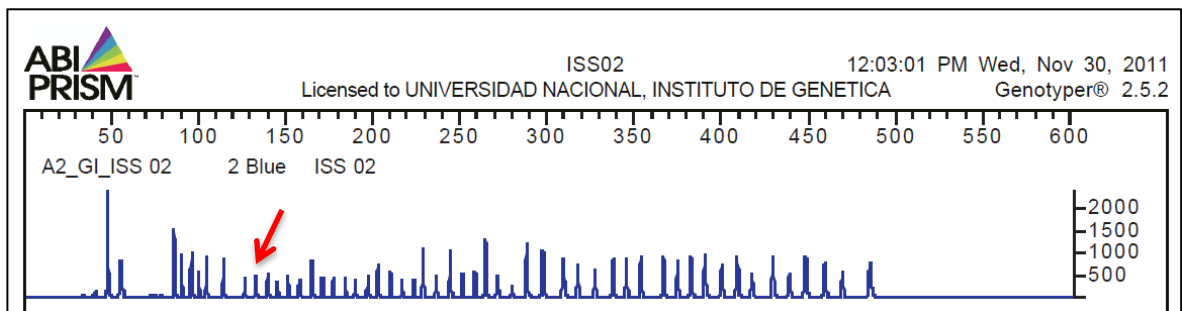


LOH < 0,7

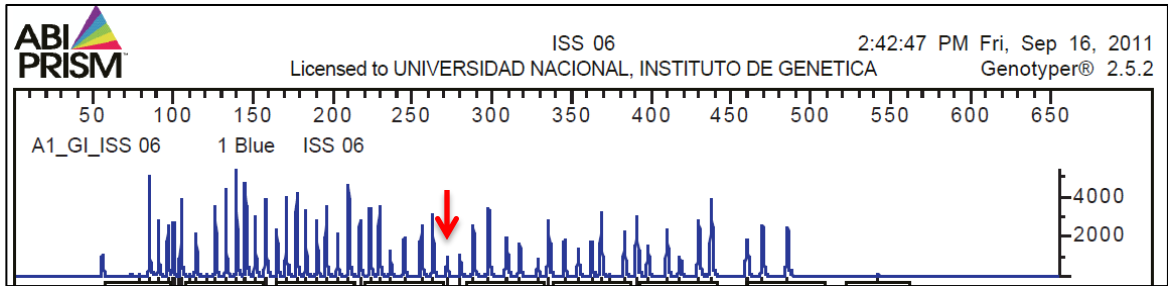


Ganancia > 1,3

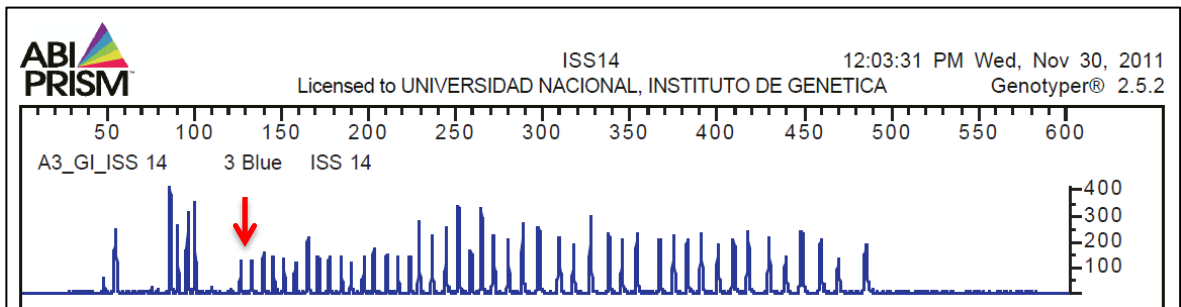
A.



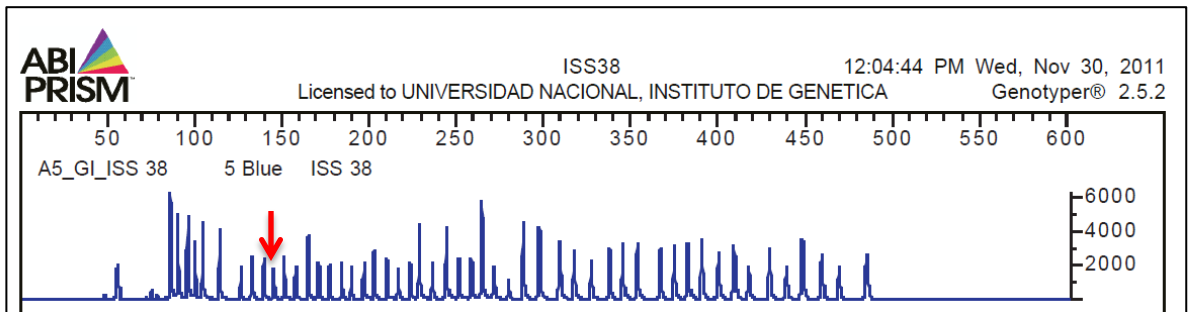
B.



C.



D.



E.

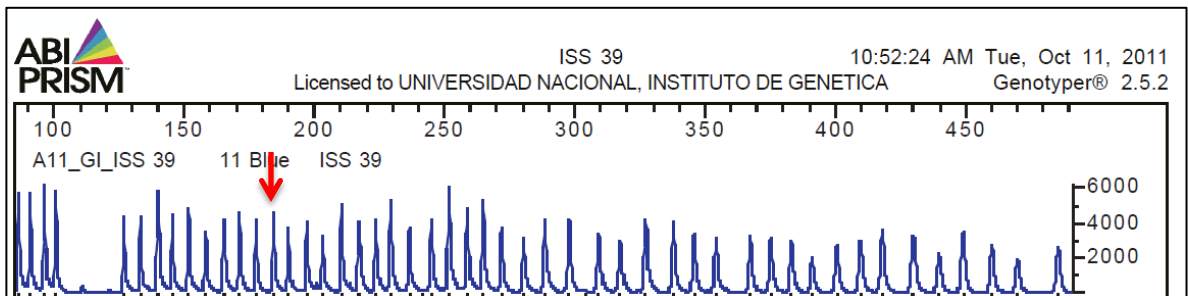


Figura N° 20: electroferogramas de los pacientes con hallazgos de mutaciones en el gen SHOX. A) ISS 02; B) ISS 06; C) ISS 14; D) ISS 38; E) ISS 39. Las flechas rojas indican la posición de la sonda reportada como perdida.

Para confirmar los resultados obtenidos por MLPA, se diseñaron juegos de primers que amplificaran las regiones en donde se encontraba la sonda que se reportaba como delecionada en cada uno de los pacientes y con el fin de secuenciar estas regiones y poder establecer puntos de ruptura a nivel intragenico. Para el paciente con ganancia no se realizo esta confirmación debido a que la región reguladora por ser una secuencia no codificante presenta dificultad para encontrar oligonucleótidos específicos para esa región.

La Tabla N° 14, muestra los juegos de primers diseñados y las condiciones de cada PCR para la amplificación de cada secuencia.

A continuación se presentan las fotografías de los geles de electroforesis obtenidos para cada PCR, en cada una de las amplificaciones se empleo DNA de un control normal y DNA de cada paciente (Figura N° 21). En la que se puede observar una leve disminución en la intensidad de la banda del amplificado del paciente ISS 38 (panel A, carriles 3 y 4) con respecto al control normal (Panel A, carril 2), de la cual se puede sugerir como análisis cualitativo una disminución en la concentración de DNA amplificado posiblemente por la ausencia de la segunda copia del gen, caso similar sucede en los amplificados del paciente ISS 02.

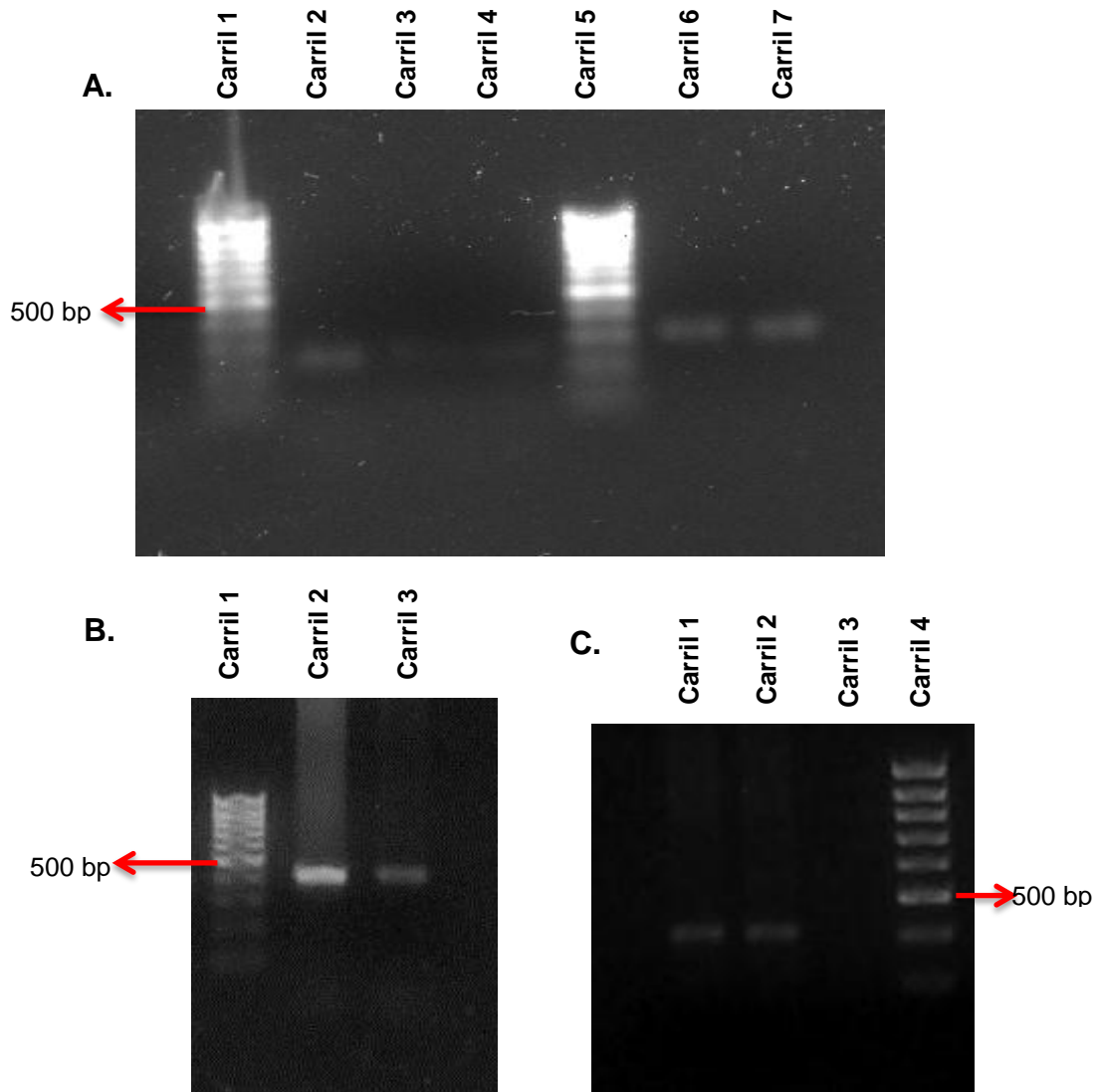


Figura N° 21: geles de electroforesis de los amplificados para control normal y cada uno de los pacientes con hallazgos de delección en región intragénica del gen shox A.) carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control normal, carril 3 y 4: paciente ISS 38 con delección en exón 2; carril 5: marcador de peso molecular, carril 6: control normal, carril 7: paciente ISS 14 con delección de exón 1. B.) carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control normal y carril 3: paciente con

deleción ISS 02 en exón 6. C) carril 1: control normal, carril 2: paciente ISS 39 con deleción en intron 6b y carril 4: marcador de peso molecular.

Tabla N° 14: Condiciones técnicas para el análisis mutacional de cada paciente.

Paciente	Mutacion y N° de Sonda presente en la región a amplificar	Primers	Programa PCR	Condiciones PCR
ISS 02	Del PAR1 sonda 8 exón 6	F 5 GCCAATAGGGGTCTTCGA 3 R 3 TCCAAAACCGAGCTCACC 5	95°C por 5min; 30 ciclos [95°C por 30s; 57.7°C por 30s 72°C por 30s,] 72°C por 10 min.	Volumen de reacción 25 µl DNA genómico a 50 ng/25µl, Buffer 1X; 1.5mM MgCl ₂ , , 200µM dNTPs,0.4µM primers F y R y 1.25U Taq DNA Polimerasa® (INVITROGEN) Amplificado 487pb
ISS 14	Del PAR1 sonda 3 exón 1	F 5 GCCAATAGGGGTCTTCGA 3 R 3 TCCAAAACCGAGCTCACC 5	95°C por 5min; 30 ciclos [95°C por 30s; 56.4°C por 30s 72°C por 30s,] 72°C por 10 min.	Volumen de reacción 25 µl DNA genómico a 50 ng/25µl, Buffer 1X; 1.5mM MgCl ₂ , , 200µM dNTPs,0.4µM primers F y R y 1.25U Taq DNA Polimerasa® (INVITROGEN) Amplificado 307pb
ISS 38	Del PAR1 sonda 4 exón 2	F 5 CAAGGACGGTAACGGCGG 3 R 3 CTTCTGCCACTCTCGCGG 5	95°C por 5min; 30 ciclos [95°C por 30s; 60°C por 30s 72°C por 45s,] 72°C por 10 min	Volumen de reacción 25 µl DNA genómico a 50 ng/25µl, Buffer 1X; 2mM MgCl ₂ , , 200µM dNTPs,0.4µM

				primers F y R y 1.25U Taq DNA Polimerasa® (INVITROGEN) Amplificado 230pb
ISS 39	Del PAR1 sonda 10 intron 6b	F 5 ATGCTGCCCAAGCTGTGT 3 R 5 CTAGAAGGATGGGCAGCA 3	95°C por 5min; 30 ciclos [95°C por 30s; 58.5°C por 30s 72°C por 30s,] 72°C por 10 min	Volumen de reacción 25 µl DNA genómico a 50 ng/25µl, Buffer 1X; 1.5mM MgCl ₂ , , 200µM dNTPs,0.4µM primers F y R y 1.25U Taq DNA Polimerasa® (INVITROGEN) Amplificado 380pb

8 DISCUSION

El crecimiento longitudinal es un proceso complejo, continuo pero no lineal, determinado por factores genéticos, modulado por factores permisivos y reguladores³⁵. El crecimiento anormal resultante en talla baja es comúnmente frecuente y cuenta para un gran número de casos de que requieren atención médica⁶⁰.

El concepto de talla baja incluye tanto a aquellos niños con talla baja patológica como a aquéllos que presentan una talla baja considerada como variante de la normalidad. Las tallas bajas variantes de la normalidad son responsables del 80% de los casos de hipocrecimiento y son debidas a un menor potencial genético de crecimiento (talla baja familiar), a un retraso en la maduración (retraso constitucional del crecimiento y la pubertad) o a una combinación de ambos procesos³⁶

En los últimos años se ha descrito que la haploinsuficiencia del gen SHOX es una de las causas más importantes de la talla baja, y aproximadamente dos de cada 3 pacientes que presentan haploinsuficiencia de este gen es debido a deleciones tanto de tipo intragénico como en región reguladora⁶¹.

En este estudio se empleó la técnica MLPA para establecer la frecuencia de cambios en el número de copias del gen SHOX en pacientes colombianos con ISS, encontrando una frecuencia del 9,6%, acorde con la frecuencia del 2-15% reportada en la literatura⁴⁹, incluyendo el estudio de Rappold y colaboradores quien en una gran cohorte de 1534 pacientes con ISS, detecto 9 mutaciones puntuales y 25 deleciones para una frecuencia mutacional del 2.2%⁵⁶.

Nuestro estudio discrepa del el estudio de Jorge en 2007⁶², quien no reporta deleciones en 63 pacientes brasileños con ISS, por el contrario reporta una frecuencia del 3,2% basado en mutaciones puntuales en 2 de los 63 pacientes que evaluo, sin embargo la técnica empleada para este estudio fue análisis de microsatelites (STRs) la cual se ha demostrado que tiene un poder mas bajo en la detección de deleciones comparado con la técnica de MLPA que se utilizo en nuestro estudio.

En total para este estudio se hallaron 5 de 52 pacientes con ISS que presentaban anormalidades en el gen SHOX dando una posible explicación a su condición de talla baja y convirtiendo a este en el segundo estudio a nivel latinoamericano.

Al comparar el grupo de pacientes sin alteraciones del gen SHOX con el grupo de pacientes con hallazgos en SHOX, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a parámetros como el peso, la edad, desviación estándar de la talla, talla medio parental y edad de diagnostico de la talla baja, sin embargo se reporta un tendencia de que la talla de los pacientes con ISS y alteraciones de SHOX es significativamente mas alta que la de pacientes con ISS sin alteraciones del gen SHOX; dato que no puede ser corroborado con la literatura debido a que los reportes solo muestran correlacion entre las SDS de loa talla de pacientes con y sin alteraciones de shox, datos que no son significativamente diferentes⁶³.

Las correlaciones realizadas entre el grupo de pacientes sin alteraciones de shox y con alteraciones de shox confirma que en pacientes con talla baja idiopática no se puede aseverar una correlación fenotipo-genotipo atribuida al gen shox, Sin embargo, es de anotar que los pacientes con talla baja por alteraciones del gen SHOX tienen una expresión clínica variable, pueden manifestarse solo como talla baja; pueden presentar acortamiento mesomélico pero después de la segunda década de la vida, o pueden presentar las expresiones más severas ya descritas displasia mesomelica de Langer y discondrosteosis de Leri-Weill

Uno de los 5 pacientes, la paciente ISS 14 presento pérdida o delección de las sondas específicas para amplificar el exón 1 del gen, sin embargo no se han reportado mutaciones en esta región del gen teniendo en cuenta que el exón 1 hace parte de la región UTR5³. Análisis adicionales en los realizados a los padres de la paciente demuestran que la mutación fue heredada por vía materna, lo que sugiere que posiblemente si sea la causa de su condición de talla baja, teniendo en cuenta que su madre también presenta un fenotipo de talla baja y se encuentra por debajo de 2 SDS de los estándares de la población.

Para el paciente ISS 02 que presenta delección de la región del exón 6, y el paciente ISS 38 el cual presenta perdida de la región correspondiente al exón 2, se puede atribuir su condición de talla baja a esta pérdida de material genético teniendo en cuenta que estos exones hacen parte de la región codificante del gen Shox, y de acuerdo con lo reportado en la literatura, esta región es la que presenta una mayor frecuencia de delecciones a nivel intragénico³.

Los exones 2 y 6 hacen parte de la región codificante del gen, el exón 2 codifica para una región que conforma el dominio de traslocacion nuclear y el exón 6 codifica el dominio carboxiterminal de la proteína SHOX.

En un estudio realizado por Aza-Carmona, et al en el 2011⁵², se sugiere que las regiones N y C terminal de la proteína SHOX están implicadas en la interacción con SOX 9 durante la condrogenesis, siendo este un complejo esencial para dicho proceso, de igual se demuestra que al emplear el gen SHOX mutado en regiones diferentes al homeodominio las interacciones con SOX 9 disminuyen, lo cual explicaría el fenotipo de los pacientes ISS 38 e ISS 02.

Se reporta en esta investigación un caso atípico de una duplicación en la región del CNE 9, para un paciente de género masculino de 16 años de edad con 4

desviaciones estándar por debajo de la talla promedio para población colombiana la literatura reporta un único caso⁶⁰ similar al obtenido en este estudio, evidenciando el fenotipo inesperado de un paciente con talla baja idiopática al cual se le detectó trisomía del gen SHOX sin embargo este reporte hace referencia a la región intragénica y parte de región reguladora, ofreciendo una posible explicación fundamentada en que específicamente la región del elemento regulador que también se encuentra duplicada este ejerciendo un efecto negativo en la talla.

Lo anterior teniendo en cuenta que los reportes de duplicación de la región intragénica del gen SHOX siempre están relacionados con fenotipos de talla alta, y hasta ahora el estudio de Liughetti y col. en 2010, no se habían reportados casos de duplicaciones que incluyeran la región reguladora⁶⁰.

Thomas y col, 2009⁶⁴, refieren que existe una alta variabilidad fenotípica con relación a duplicaciones del gen SHOX o sus regiones reguladoras, explicando que aun las investigaciones con respecto a este tipo de caso no se han realizado a fondo, por lo tanto sugieren que este tipo de hallazgos debe corroborarse con otro tipo de estudios diferentes a la técnica de MLPA.

De igual forma se sugiere en este estudio que la duplicación en el CNE9 genera una regulación negativa de la transcripción del gen Shox, esto fundamentado en que el CNE9 según reportes de Sabherwal y Col⁵, es el enhancer con mayor importancia en la regulación de la transcripción del gen Shox.

Para la paciente ISS 39, la cual presenta una pérdida en la región del intron 6b, no puede asegurarse que exista una correlación de este hallazgo con su fenotipo de talla baja. Sin embargo esta delección se presenta como nuevo reporte a la base de datos de mutaciones del gen SHOX (Figura N° 12).

De esta manera, este estudio es el primero a nivel nacional y el segundo a nivel latinoamericano que intenta describir el comportamiento del Gen SHOX en pacientes con ISS, encontrando que nuestra población presenta una frecuencia del 9,6% semejante a la reportada en la literatura mundial. Por otro lado nuestro grupo pudo describir dos nuevas mutaciones, la del paciente ISS 39 con una del en el intron 6b del gen SHOX y la del paciente ISS06 con una duplicación en el CNE 9 (región reguladora del gen SHOX), demostrando que en principios estas pérdidas / ganancias son patogénicas.

9 CONCLUSIONES

9.1 Este estudio permitió caracterizar fenotípicamente a 52 pacientes con diagnóstico de talla baja idiopática, encontrando que todos los pacientes tenían un fenotipo normal, de estos 35 fueron mujeres y 17 hombres, con un promedio de edad cronológica de $11,3 \pm 6,3$ años, talla promedio de $122,6 \pm 21,6$ cm y peso promedio de $28,3 \pm 13,6$ gr y solamente 7 pacientes presentaban un fenotipo leve de talla baja desproporcionada.

9.2 Mediante este estudio se logró establecer la frecuencia de mutaciones en el gen SHOX en pacientes colombianos con talla baja idiopática, reportando una frecuencia de 9,6% en 52 pacientes con diagnóstico de ISS.

9.3 En el grupo de pacientes se determinó una frecuencia del 7,7% correspondiente a deleciones, y las duplicaciones se presentaron con una frecuencia del 1,9%.

9.4 No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes sin alteraciones del gen Shox y el grupo con alteraciones del gen Shox.

9.5 Se estableció que 2 de los pacientes heredaron la mutación de uno de sus padres, un paciente presentó mutación *de novo*, y a 2 pacientes con hallazgos en shox no se les pudo determinar el origen de la mutación debido a que no se obtuvieron datos del padre.

9.6 se reportan dos nuevos hallazgos que no habían sido reportados en la literatura, estos corresponden a una deleción en el intron 6b y una duplicación que abarca el CNE 9.

9.6 En este estudio se realizó el hallazgo de una duplicación en uno de los elementos reguladores en un paciente con diagnóstico de talla baja, y esta mutación fue heredada por línea paterna.

9.7 el presente estudio sugiere acorde con la literatura que los pacientes con diagnóstico positivo de SHOX se les debe suministrar tratamiento con hormona de crecimiento.

10 RECOMENDACIONES

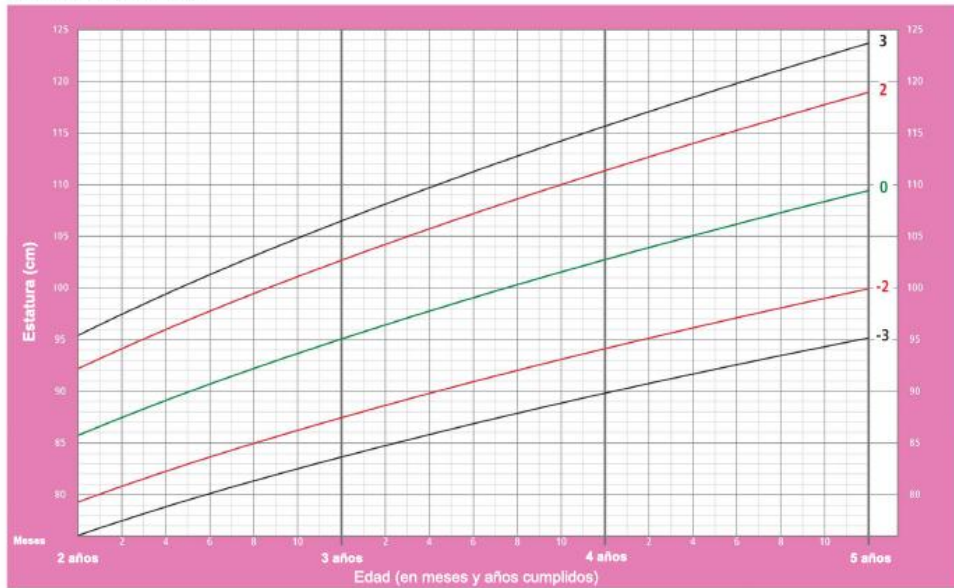
- 10.1** Sugerimos ampliar el grupo de estudio incluyendo pacientes con diagnóstico de talla baja idiopática de todas las regiones del país, para poder confirmar la frecuencia mutacional del gen shox y sus CNE en Colombia.
- 10.2** Se recomienda realizar análisis de expresión génica en los pacientes con hallazgos de mutaciones en SHOX y sus CNE, y especialmente en el paciente que presenta la duplicación en el CNE 9.
- 10.3** A los pacientes que salieron con diagnóstico de MLPA negativo para Shox, se sugiere realizarles secuenciación directa a nivel exónico, o bien realizarles estudios a nivel de receptores de hormona de crecimiento y sus ligandos.
- 10.4** Implementar estudios en Colombia en modelo animal para SHOX con el fin de comprender completamente el mecanismo de acción de la proteína Shox.

11 ANEXOS

ANEXO N° 1: Curvas de crecimiento y desarrollo de la OMS

Estatura para la edad Niñas

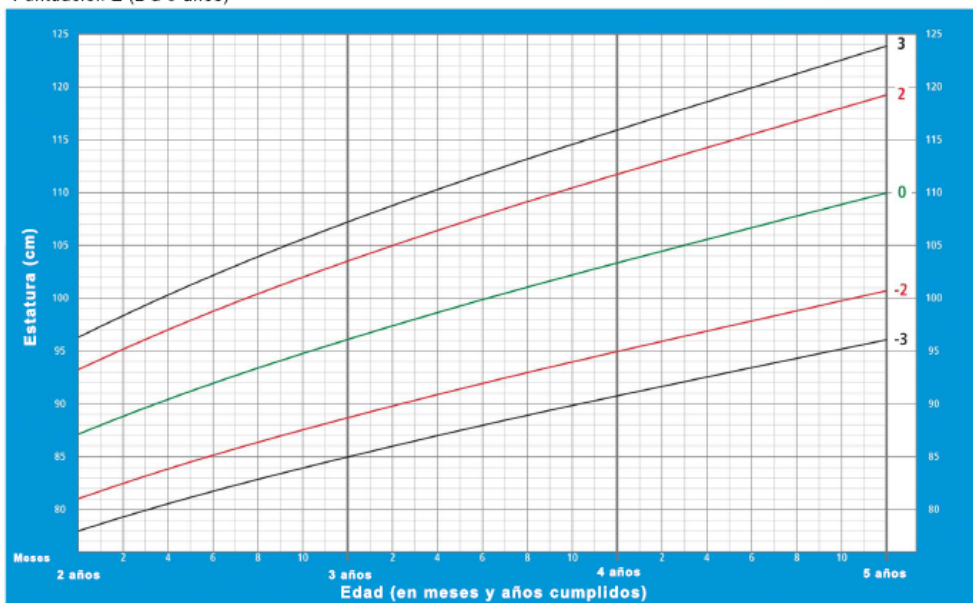
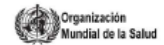
Puntuación Z (2 a 5 años)



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 N° 2: FORMATO DE RECOLECCION DE INFORMACION

**PROYECTO GENESER: CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN SHOX Y SUS REGIONES
REGULADORAS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPATICA DE LA CIUDAD DE
BOGOTA
FORMATO DE RECOLECCION DE INFORMACION**

Fecha: ___/___/___	Cod. _____
Nombre <input style="width: 95%;" type="text"/>	
Edad <input style="width: 15%;" type="text"/>	Fecha Nacimiento: <input style="width: 40%;" type="text"/>
Natural y procedente <input style="width: 95%;" type="text"/>	
Identificación:	<input type="checkbox"/> C.C. <input type="checkbox"/> T.I. <input type="checkbox"/> R.C. <input type="checkbox"/> C.E. <input type="checkbox"/> CNV <input type="checkbox"/> NUIP <input style="width: 100px;" type="text"/>
Género: <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	Teléfonos: _____
Centro de Referencia: _____	

Antecedentes Familiares	
• Talla materna : <input style="width: 50px;" type="text"/> (Percentil _____)	Talla paterna : <input style="width: 50px;" type="text"/> (Percentil _____)
Antecedentes perinatales	
• Edad gestacional al nacer: <input style="width: 60px;" type="text"/> Semanas	Peso: <input style="width: 60px;" type="text"/> Gramos P _____
	Talla: <input style="width: 50px;" type="text"/> (P _____)
• Presentó RCIU : <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
Antecedentes Patológicos	
• Edad de Diagnóstico: <input style="width: 60px;" type="text"/>	
Antecedentes farmacológicos:	
• Uso de hormona de crecimiento: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Edad de inicio de tto: <input style="width: 60px;" type="text"/>

Fenotipificación	
• Medidas antropométricas:	
○ Talla: <input style="width: 50px;" type="text"/> (P _____)	Envergadura: <input style="width: 50px;" type="text"/> Peso: <input style="width: 50px;" type="text"/>
○ Segmento superior: <input style="width: 50px;" type="text"/>	Segmento inferior: <input style="width: 50px;" type="text"/>

CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION DEL ESTUDIO:

INCLUSIÓN	EXCLUSIÓN
<ul style="list-style-type: none"> Niños entre 2 y 16 años Talla por debajo de 2 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 estímulo, adecuado para la edad. 	<ul style="list-style-type: none"> 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 RCIU (Restricción del Crecimiento Intra Uterino)

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

PROYECTO GENESER: CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN SHOX Y SUS REGIONES REGULADORAS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES DE BASE HOSPITALARIA CON TALLA BAJA IDIOPATICA

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL PACIENTE Y SU FAMILIA

OBJETIVO: Caracterizar molecularmente el gen SHOX y sus elementos conservados no codificantes (CNE) en una muestra de pacientes con talla baja idiopática de la ciudad de Bogotá

PROCEDIMIENTO: Se realizará una entrevista clínica con el paciente y sus familiares o personal responsable del menor con el fin de recolectar la información clínica necesaria. Se procederá a tomar una muestra de máximo 7 mililitros de sangre por venopunción en el brazo del paciente. 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. Las muestras serán enviadas posteriormente al Instituto de Genética de la Universidad Nacional para la realización de los estudios moleculares.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa riesgo mínimo para la salud e integridad del menor y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestras referida en el procedimiento que pueden incluir dolor mínimo, infecciones, sangrado y/o hematomas (morados).

BENEFICIOS ADICIONALES: Este estudio tiene para usted el (los) siguiente(s) beneficio(s) adicional(es): 1. Detección de mutaciones en el gen SHOX en su hijo o menor a cargo, en el caso que las tuviese. 2. Proporcionar mas información al médico tratante de su hijo o menor a cargo, sobre la etiología de la talla baja, en este caso, por mutaciones en el gen SHOX. 3. Colaborar en el proceso clínico para dar un mejor abordaje en esta patología, de modo que con el resultado de este estudio, se contemplen determinadas medidas terapéuticas.

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 algunos casos, la información y muestras suministradas por usted se pueden emplear en otros estudios clínicos o de ciencias básicas. SIEMPRE SE LE PEDIRA una autorización por escrito en caso de que usted autorice que su información y muestras o la información y muestras DEL MENOR A SU CARGO, sean empleadas en otros estudios. Por ello le solicitamos que revise el formato de AUTORIZACION 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 anteriormente

Hoja 2/3

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 y el Servicio de Pediatría de la Universidad Nacional, el Hospital Universitario de la Misericordia, el Hospital Militar Central y el Departamento de Medicina Interna de la Universidad Javeriana – Hospital San Ignacio. 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 SHOX, las cuales explicaran la causa de la talla baja de usted o su familiar y de acuerdo a estos datos, el médico tratante podrá ofrecerle determinadas alternativas terapéuticas. Además, esta investigación nos permitirá clarificar muchos conceptos sobre el desarrollo de la TALLA BAJA IDIOPATICA.

(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 a continuación y será 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, le contestará sus preguntas.

Para mayor información, llame en Colombia al 3165000 EXT 11631, para comunicarse con el Instituto de Genética Humana de la Universidad Nacional, Carrera 44 Numero 26 - 85 o al correo por Internet: hmvelasco@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 para realizar estudios sobre la PRESENCIA DE MUTACIONES DEL GEN SHOX EN PACIENTES CON TALLA BAJA IDIOPATICA. Sin embargo usted también puede autorizar el uso de su muestra en estas circunstancias:

- En estudios de investigación de patologías distintas a la entidad objeto Si No de esta investigación (TALLA BAJA IDIOPATICA), siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación y los del menor a mi cargo
- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones Si No nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación y los del menor a mi cargo

AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:
 "PROYECTO GENESER: CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN SHOX Y SUS REGIONES REGULADORAS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES DE BASE HOSPITALARIA CON TALLA BAJA IDIOPATICA

-
- 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 MUTACIONES DEL GEN SHOX. 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 N° 4: SALSA MLPA KIT P018-E1 SHOX, MRC HOLLAND

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene / exon	Ligation site NM_000451.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
P-telomere / start PAR1 region					227 kb
211 ~	09333-L10292	PPP2R3B gene		CGTCCGAGTTC-ACTCGCGCTACA	273.0 kb
265	01341-L06221	SHOX region LOC159015	4.7 kb before start SHOX gene	GCCTGGAACAGA-ACTTCCCGGGG	4.7 kb
		<i>SHOX startcodon</i>	<i>692-694</i>		
166	01145-L00702	SHOX exon 1	99-100	TTTCTACTGCAA-ACAGAAATGGGA	6.7 kb
204	01146-L06220	SHOX exon 2	920-921	ACCACGTAGACA-ATGACAAGGAGA	3.6 kb
245	01147-L00802	SHOX exon 3	1032-1034	CGGGCAGACCAA-GCTGAAACAGAG	6.2 kb
300	01148-L15501	SHOX exon 4	1198-1199	CAGAACCGGAGA-GCCAAGTGCCGC	0.2 kb
335	01149-L00910	SHOX exon 5	1261-1262	ACAGCCAACCAC-CTAGACGCTGC	3.5 kb
231	09337-L00911	SHOX exon 6 (6a)	1506-1507	AAGCAACAGCAA-GAATTCAGCAT	6.4 kb
		<i>SHOX stopcodon</i>	<i>1568-1570</i>		
226	09336-L00708	SHOX intron 6	6.4 kb after exon 6	TGGCTTCACGAG-TTCAGCCCATTG	6.4 kb
392	09338-L15503	SHOX exon 7 (7b)	1.4 kb before exon 7 (only present in NM_006883.2)	TCCCACATTCTT-GGAATCACAATG	56.8 kb
136	05642-L05096	Xp22.32-PAR1		GCAGCAGTAAA-GTGAGCATTCCC	19.8 kb
154	13821-L14642	Xp22.32-PAR1		GATGGCTGATAA-TTACTCCGTATG	11.4 kb
172 ±	05643-L15705	Xp22.32-PAR1		ACACCACCAGAGT-TACTTGAATCAA	45.4 kb
198	13296-L15336	Xp22.32-PAR1		GGAAAACCCACGT-TCCTATCGATCC	57.7 kb
318 §	05645-L05099	Xp22.32-PAR1		TGTTCCCACCGT-AAAACACTCTCC	8.5 kb
432 §	05646-L15507	Xp22.32-PAR1		TGCATGTCTGCT-TTTTGAATGGCC	10.7 kb
463 §	13297-L15510	Xp22.32-PAR1		TACAGCAAATGA-TACGTATAAATT	6.3 kb
290 §	06291-L06222	Xp22.32-PAR1		CTTGAAAGGGCA-GGAACCTAATT	0.4 kb
184 §	06293-L06219	Xp22.32-PAR1		TAATTGATGAGA-TGCAGAAGCCAG	15.4 kb
148	05648-L06218	Xp22.32-PAR1		TGGTGCTGAAAT-GAGGAAGCCCTG	48.7 kb
178	05649-L15335	Xp22.32-PAR1		TGAGGAGGTACC-TCAAAGCTAAAC	64.4 kb
439	09335-L15508	Xp22.32-PAR1		GAAATTCAGTTT-TAATAACACAGA	66.0 kb
370	14697-L16348	Xp22.32-PAR1		CTCTGGTGAGAT-GCCATCTAGAGA	338.0 kb
400	13911-L16505	CRLF2 gene		GAATGCCAGCAA-ATACTCCAGGAC	73.9 kb
386	10251-L15502	CSF2RA gene		GACAAGCCTTCT-GCTCTGTGAGTT	69.8 kb
142	13597-L15055	IL3RA gene		TGCACAGATAAG-TTTGTCGTCTTT	280.7 kb
310 ~	01153-L00712	ASMT gene		GACATCCAGAA-GTGGTGTGGACG	4443.7 kb
End of PAR1 region					
283 +	05587-L04577	NLGN4X gene	Xp22.32	GACGGCTTGGGT-GATGCACGAAAT	2311.9 kb
238 +	06402-L09795	KAL1 gene	Xp22.31	GTTTCCTGAAGC-GTGTGCCACAA	1208.9 kb
328 +	02566-L10170	GPR143 gene	Xp22.2	GGGCGCTGGAGT-CCCAACTTACCT	5095.4 kb
274 +	03906-L03066	FANCB gene	Xp22.2	TCTCATCAGAAT-TCTCCCTATAAA	114321.4 kb
420 +	00820-L15506	AIFM1 gene	Xq25	TATTGGTCTTGT-GGACAGTAGTTT	25732.3 kb
Start of PAR2 region					
355~±	01156-L00659	VAMP7 gene (PAR2)	Xq28	TGTGGGAAAAGT-GTTTCCATTCTG	Very close to q-telomere

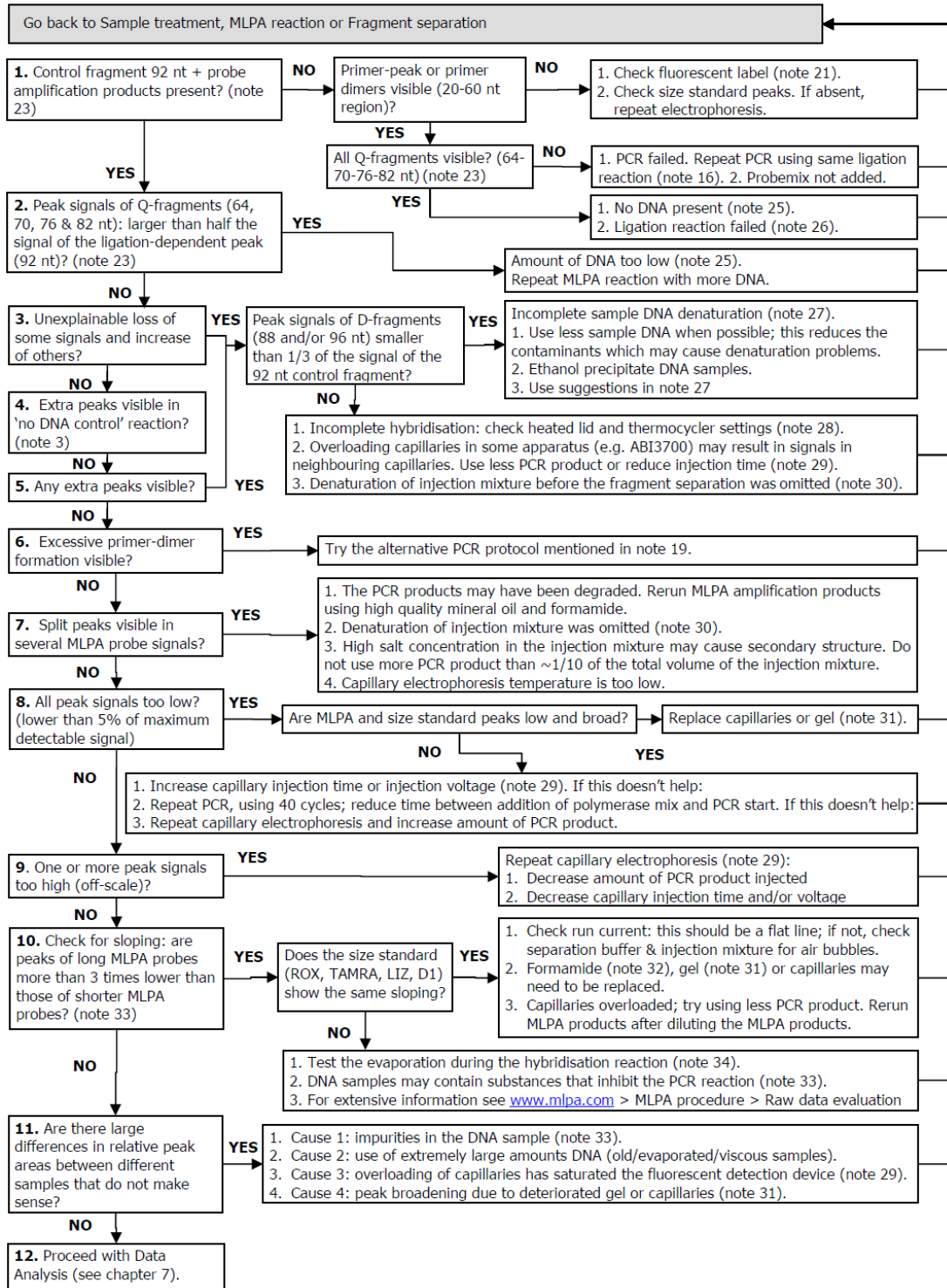
ANEXO N° 5: SALSA MLPA KIT P018-F1 SHOX, MRC HOLLAND

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene / exon	Ligation site NM_000451.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
P-telomere / start PAR1 region					227 kb
211 ~	09333-L10292	PPP2R3B gene		CGTCCGAGTTCC-ACTCGCGCTACA	273.0 kb
266	01341-L20651	SHOX region LOC159015	4.7 kb before start SHOX gene	GCCTGGAACAGA-ACTTCCGCGGGG	4.7 kb
		<i>SHOX startcodon</i>	<i>692-694</i>		
166	01145-L00702	SHOX exon 1	99-100	TTTCTACTGCAA-ACAGAAATGGGA	6.7 kb
204	01146-L06220	SHOX exon 2	920-921	ACCACGTAGACA-ATGACAAGGAGA	3.6 kb
245	01147-L00802	SHOX exon 3	1032-1034	CGGGCAGACCAA-GCTGAAACAGAG	6.2 kb
300	01148-L15501	SHOX exon 4	1198-1199	CAGAAACCGAGA-GCCAAGTGCCGC	0.2 kb
337	01149-L19676	SHOX exon 5	1261-1262	ACAGCCAACCAC-CTAGACGCCTGC	3.5 kb
231	09337-L00911	SHOX exon 6 (6a)	1506-1507	AAGCAACAGCAA-GAATTCAGCAT	6.4 kb
		<i>SHOX stopcodon</i>	<i>1568-1570</i>		
226	09336-L20178	SHOX intron 6	6.4 kb after exon 6	TGGCTTCACGAG-TTCAGCCCATG	6.4 kb
392	09338-L15503	SHOX intron 6	1.4 kb before exon 7 (only present in NM_006883.2)	TCCCACATTCTT-GGAATCACAATG	56.8 kb
136	05642-L05096	Xp22.32-PAR1		GCAGCAGTGAAG-GTGAGCATTCCC	19.8 kb
154	13821-L14642	Xp22.32-PAR1		GATGGCTGATAA-TTACTCCGTATG	11.4 kb
172	05643-L15705	Xp22.32-PAR1		ACACCACCAGAGT-TACTTGAATCAA	45.4 kb
199	13296-L20175	Xp22.32-PAR1		GGAAAACCACGT-TCCTATCGATCC	57.7 kb
318 §	05645-L05099	Xp22.32-PAR1		TGTTCCACCCTG-AAAACACTCC	8.5 kb
432 §	05646-L15507	Xp22.32-PAR1		TGCATGTCTGCT-TTTTGAATGGCC	10.7 kb
463 §	13297-L15510	Xp22.32-PAR1		TACAGCAAATGA-TACGTATAAAT	6.3 kb
290 §	06291-L06222	Xp22.32-PAR1		CTTGAAGGGCA-GGAACCTAATT	0.4 kb
185 §	06293-L20177	Xp22.32-PAR1		TAATTGATGAGA-TGCAGAGCCAG	15.4 kb
148	05648-L06218	Xp22.32-PAR1		TGGTGTGAAAT-GAGGAAGCCCTG	48.7 kb
178	05649-L20176	Xp22.32-PAR1		TGAGGAGGTACC-TCAAAGCTAAC	64.4 kb
442	09335-L19679	Xp22.32-PAR1		GAAATTCAGTTT-TAATAACACAGA	66.0 kb
377	14697-L19677	Xp22.32-PAR1		CTCTGGTGAGAT-GCCATCTAGAGA	338.0 kb
403	13911-L19678	CRLF2 gene		GAATGCCAGCAA-ATACTCCAGGAC	73.9 kb
386	10251-L15502	CSF2RA gene		GACAAGCCTTCT-GCTCTGTGAGTT	69.8 kb
142	13597-L15055	IL3RA gene		TGCACAGATAAG-TTTGTCTCTTT	280.7 kb
310 ~	01153-L00712	ASMT gene		GACATCCCAGAA-GTGGTGTGGACG	706.4 kb
453	16858-L15742	ZBED1 gene		TCGTCAAGAGCA-ACACGGAGCAGA	593.8 kb
End of PAR1 region					
254 +	16846-L20647	ARSF gene	Xp22.33	CATCCATATAAT-TATGGGTTTGAC	536.9 kb
328 +	16898-L19768	PRKX gene	Xp22.33	CGATTAGGAAAC-ATGAAGGTCAGT	2606.5 kb
283 +	05587-L04577	NLGN4X gene	Xp22.31	GACGGCTTGGGT-GATGCACGAAAT	2311.9 kb
238 +	06402-L09795	KAL1 gene	Xp22.31	GTTTCCTGAAGC-GTGTGCCACAA	6304.2 kb
274 +	03906-L03066	FANCB gene	Xp22.2	TCTCATCAGAAT-TCTCCCTATAAA	114321.4 kb
420 +	00820-L15506	AIFM1 gene	Xq26.1	TATTGGTCTTGT-GGACAGTAGTTT	25732.3 kb
Start of PAR2 region					
355~±	01156-L00659	VAMP7 gene (PAR2)	Xq28	TGTGGGAAAAGT-GTTTCCATTCTG	Very close to q-telomere

ANEXO N° 6: LISTA DE REVISION DE DATOS CRUDOS

6.1. Raw data checklist	Yes	No
1. Is there a very high baseline?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Are high background signals and/or shoulder peaks / split peaks present?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Is the size standard pattern unusual, e.g. sloping, broad peaks?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Do you see spectral pull up/pull down patterns in the colours?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Are there irregular current patterns?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Are all peaks lower than ~5 % of the fluorescence maximum of the sequencer?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Are one or more peaks above the fluorescence maximum of the sequencer?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Is there too much signal sloping?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Have the longer peaks a much broader base than the shorter peaks?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Are spiky peaks present?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Are there any peaks in the 'No DNA' reaction that are longer than 100 nt and higher than 50% of the Q fragments at 64-70-76-82 nt? (see note 3)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Are all four Q-fragments higher than one third of the height of the 92 nt ligation-dependent control fragment and the longer MLPA probes (see note 23)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ANEXO N° 7: CARTOGRAMA DE FLUJO PARA LA EVALUACION DEL PATRON DE PICOS OBTENIDO POR ELECTROFORESIS CAPILAR



12 BIBLIOGRAFIA

1 Rodriguez, A. (2005) Hipocrecimiento. <http://www.avpap.org/documentos/bilbao2005/hipocrecimiento.htm>

2 Jorge A, Souza S, Nishi M, Billerbeck A, Libório D, Kim C, Arnhold I, Mendonca B. (2008) *SHOX* mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clinical Endocrinology* 66, 130–135.

3 Marchini A, Rappold G, Schneider K (2007), *SHOX* at a glance: from gene to protein. *Archives of physiology and Biochemistry* 113(3): 116-123

4 Chen J, Wildhart G, Zhong Z, Röth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum W, Rappold G (2009) Enhancer mutations of the *SHOX* gene as a frequent cause of short stature - the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J.Med Genet*: published online July 2. doi:10.1136/jmg.2009.067785.

5 Sabherwal N, Bangs F, Röth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, van der Kamp H, Kapeller J, Tickle C, Rappold G (2007) Long-range conserved non-coding *SHOX* sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet* 16: 210-222

6 Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. (1997) *PHOG*, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet.* 6: 1341-1347

7 Flanagan SF, Munns CF, Hayes M, Williams B, Berry M, Vickers D, Rao E, Rappold GA, Batch JA, Hyland VJ, Glass IA. (2002) Prevalence of mutations in the short stature homeobox containing gene (SHOX) in Madelung deformity of childhood. *J Med Genet*;39(10):758-63

8 Wit JM, Reiter EO, Ross JL, Saenger PH, Savage MO, Rogol AD, Cohen P. (2008) Idiopathic short stature: management and growth hormone treatment. *Growth Horm IGF Res.* ;18(2):111-35

9 Gubitosi-Klug RA, Cuttler L. (2005) Idiopathic short stature. *Endocrinol Metab Clin North Am*;34(3):565-80, viii.

10 A.A. Green, J.A. Macfarlane, (1983) Method for the earlier recognition of abnormal stature, *Arch. Dis. Child.* 58 535–537

11 Mcgregor S, Cornes B, Martin N, Visscher P (2006) Bias, precision and heritability of self-reported and clinically measured height in Australian Twins. *Hum Genet* 120: 571-580.

12 Silventoinen K, Sammalisto S, Perola M, Boomsma DI, Cornes B, Davis C, Dunkel L, de Lange L, Harris JR, Hjelmborg J V.B, Luciano M, Martin N.G, Mortensen J, Nisticò L, Pedersen N.L, Skytthe A, Spector T.D, Stazi M.A, Willemsen G, Kaprio J (2003) Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Res* 6: 399-408.

13 Liu YZ, Xu FH, Shen H, Liu YJ, Zhao LJ, Long JR, Zhang YY, Xiao P, Xiong DH, Dvornyk V, Li JL, Conway T, Davies KM, Recker RR, Deng HW (2004). Genetic dissection of human stature in a large sample of multiplex pedigrees. *Ann Hum Genet*;68(Pt 5):472-88.

14 Sovio U, Bennet A, Millwood I, Molitor J, O'Reilly P, Timpson N. J, Kaakinen M, Laitinen J, Haukka J, Pillas D, Tzoulaki I, Molitor J, Hoggart C, Coin L. J. M, Whittaker J, Pouta A, Hartikainen A-L, Freimer N. B, Widen E, Peltonen L, Elliott P, McCarthy M. I, Jarvelin M-R (2009) Genetic determinants of height growth assessed longitudinally from infancy to adulthood in the northern finland birth cohort 1966. *Plos Genet* 5: e409.

15 Molinari L, Gassert T (2004) the human growth curve: distance, velocity and acceleration. En: Sovio U, Bennet A, Millwood I, Molitor J, O'Reilly P, Timpson N. J, Kaakinen M, Laitinen J, Haukka J, Pillas D, Tzoulaki I, Molitor J, Hoggart C, Coin L. J. M, Whittaker J, Pouta A, Hartikainen A-L, Freimer N. B, Widen E, Peltonen L, Elliott P, McCarthy M. I, Jarvelin M-R (2009) Genetic determinants of height growth assessed longitudinally from infancy to adulthood in the northern finland birth cohort 1966. *Plos Genet* 5: e409.

16 Geller F, Dempfle A, Görg T (2003) Genome scan for body mass index and height in the Framingham Heart Study. *BMC genetics* 4

17 Liu Y-Z, Xiao P, Guo Y-F, Xiong D-H, Zhao L-J, Shen H, Liu Y-J Dvornyk V, Long J-R, Deng H-Y, Li J-L, Recker R, Deng H-W. (2006) Genetic linkage of human height is confirmed to 9q22 y Xq24. *Hum Genet* 119: 295-304.

18 Jones KL: Smith's(2005) *Recognizable Patterns of Human Malformation*, ed 6. Philadelphia, Saunders.

19 Rosenbloom AL: (2007) Recombinant human insulin- like growth factor-I (rhIGF-I) and rhIGF-I/rhIGF-binding-protein-3:new growth treatment options? *J Pediatr*; 150: 7–11.

20 Smith DW, Truog W, Rogers JE, (1976) Shifting linear growth during infancy: illustration of genetic factors in growth from fetal life through infancy. *J Pediatr*; 89: 225– 230.

21 Root AW, Diamond FB Jr. (2007) Overgrowth syndromes: evaluation and management of the child with excessive linear growth; in Lifshitz F (ed): *Pediatric Endocrinology*, ed 5. New York, Informa Health Care, vol 2, pp 163–194.

22 Rosenbloom AL: (2007) Fisiología del crecimiento. *Ann Nestlé [Esp]* 65:99–110

23 Karsenty G, (2003). The complexities of skeletal biology. *Nature*, vol 423.

24 Harada S, Rodan G. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, vol 423

25 Kronenberg H. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, Vol 423.

26 Boyle W, Simonet S, Lacey D. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, vol 423.

27 Bendall, A. J., Abate-Shen, C. Roles. (2000) Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* **247**, 17–31

28 Ferraro Mabel. (2009). Tablas OMS. Hospital Pedro de Elizalde. Argentina. http://www.elizalde.gov.ar/area_medica/area_ateneos.asp

29 Calzada L. R: (2007) Identificación y manejo del niño con talla baja. Intersistemas S.A. de C. V. Mexico.

30 Organización mundial de la Salud. 2006. Patrones de crecimiento infantil de la OMS Longitud/estatura para la edad, peso para la edad, peso para la longitud, peso para la estatura e índice de masa corporal para la edad. Métodos y desarrollo (Resumen de orientación). Departamento de Nutrición para la Salud y el Desarrollo.

31 Duran Pablo. (2009). Valoración del crecimiento en pediatría y Nuevas referencias. Desafíos a futuro de la nueva referencia internacional de crecimiento de la OMS. Hospital Pedro de Elizalde. Argentina.
http://www.elizalde.gov.ar/area_medica/area_ateneos.asp

32 WHO. (2009) Child Growth Standards Growth velocity based on weight, length and head circumference Methods and development. World Health Organization

33 Organización mundial de la salud. (2009) Patrones de crecimiento infantil de la OMS, Nota descriptiva no. 1. OMS

34 Cassorla F., Gaete X., Roman R. (2000) Talla baja en pediatría. Revista chilena de pediatría,. doi: 10.4067/S0370-41062000000300009

35 Del Toro K., Duran P., Llano M. Enfoque del paciente con talla baja en pediatría. CCAP. Volumen 7 Número 2

36 Aguirrezabalaga B., Pérez C. (2006) **Protocolos de Endocrinología** Talla baja: Diagnóstico y seguimiento desde Atención Primaria. BOL PEDIATR 2006; 46: 261-264

37 Kant S.G, Wit J.M, Breuning M.H. (2003) Genetic Analysis of short Stature. *Horm Res* 60: 157-165.

38 A. Grimberg, J.K. Kutikov, A.J. Cucchiara, (2005) Sex differences in patients referred for evaluation of poor growth, *J. Pediatr.* 146 212–216

39 Cohen P, Rogol AD, Deal CL, (2008) 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*;93(11):4210-7.

40 Neufeld L., Rubio M., Pinzon L., Tolentino L. (2010) Nutrición en Colombia: estrategia de país 2011-2014. Banco Interamericano de Desarrollo, División de Protección Social y Salud NOTAS TÉCNICAS # 243

41 Wit J.M, Clayton P.E, Rogol A.D, Savage M.O, Saenger P.H, Cohen P (2008) Idiopathic short stature: Definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Hormone & IGF Research* 18: 89–110.

42 Noeker Meinolf, (2009) Management of Idiopathic Short Stature: Psychological Endpoints, Assessment Strategies and Cognitive-Behavioral Intervention. *Horm Res*;71(suppl 1):75–81

43 Cohen P, Rogol A, Deal C, Saenger P, Reiter E, Ross J, Chernausek S, Savage MO, Wit JM; (2008) on behalf of the 2007 ISS Consensus Workshop participants. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary statement of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Pediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (11): 4210

44 Ranke MB, (1996) Towards a consensus on the definition of short stature idiopathic. *Horm Res* 45:suppl 2, 64-66

45 Seaver L, Irons M, (2009) ACMG practice guideline: genetic evaluation of short stature. *Genetics in Medicine* 11: number 6.

46 Rosenfeld R. (2005) The molecular basis of idiopathic short stature *Growth Hormone & IGF Research* 15 (2005) S3–S5

47 Jorge A, Nish M, Funari M, Souza S, Arnhold N, Mendonça B (2008) Baixa Estatura por Haploinsuficiência do Gene SHOX: do Diagnóstico ao Tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metab*; 52/5, 765-773

48 Blaschke R, Rappold G (2006). The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16:233–239

49 Binder Gerhard. 2010. Short Stature due to SHOX Deficiency: Genotype, Phenotype, and Therapy *Horm Res Paediatr*;75:81–89

50 Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, et al. (1997). Pseudoautosomal deletions

encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16:54 – 63.

51 Marchini A, Martila T, Winter a, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke R, Hacker B, Rao E, Karperien M, Wit J, Richter W, Tommasino M, Rappol G (2004). The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J. Biol. Chem* 279 (35): 37103-37114.

52 Aza-Carmona M, Shears D, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchon A, Benito-Sanz S, Rodriguez J. I, Argente J, Campos-Barros A, Scambler P, Heath K. 2011. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Human Molecular Genetics*, Vol. 20, No. 8 1547–1559

53 MIM 312865. <http://omim.org/entry/312865#reference27>

54 Ogata, T., Yoshizawa, A., Muroya, K., Matsuo, N., Fukushima, Y., Rappold, G., Yokoya, S. (1995). Short stature in a girl with partial monosomy of the pseudoautosomal region distal to DXYS15: further evidence for the assignment of the critical region for a pseudoautosomal growth gene(s). *J. Med. Genet.* 32: 831-834

55 Ellison, J. W., Wardak, Z., Webster, M., Chiong, W. (1996) PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 59 (suppl.): A32.

56 Rappold G, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadopoulou E, Reinehr T, Onigata K, Ogata T. (2002)

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.* 87(3):1402–1406

57 Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V (2006) High incidence of *SHOX* anomalies in individuals with short stature. *Med Genet*;43:735–739.

58 Fokkema IFAC, Den Dunnen JT and Taschner PEM (2005). *LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-Box" approach.* [Hum Mutat. 2005 Aug;26\(2\):63-8.](#)

59 Ezquieta B, Cueva E, Oliver A, Gracia R. (2002) *SHOX* intragenic microsatellite analysis in patients with short stature. *J Pediatr Endocrinol Metab.*;15(2):139-48

60 Iughetti L., Capone I., Elsedfy H., Bertorelli R., Predieri B., Bruzzi P., Forabosco A., El Kholi M. (2010) Unexpected phenotype in a boy with trisomy of the *SHOX* gene. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* 23, 159-169.

61 Funari M, Jorge A, Souza S, Billerbeck A, Arnhold I, Mendonca B, Nishi M. 2010. Usefulness of MLPA in the detection of *SHOX* deletions. *European Journal of Medical Genetics* xxx 1-5.

62 Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Liborio DC, Kim CA, et al. 2007. *SHOX* mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)*. ;66:130-5.

63 Rappold G, Blum W, Shavrikova E, Crowe B, Roeth R, Quigley Ch, Ross J, Niesler B. (2007) Genotypes And Phenotypes In Children With Short Stature: Clinical Indicators Of Shox Haploinsufficiency. J. Med. Genet; 44;306-313

64 Thomas NS, Harvey JF, Bunyan DJ, Rankin J, Grigelioniene G, Bruno DL, Tan TY, Tomkins S, Hastings R 2009 Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the humanSHOXgene reveal a variable effectonstature.AmJMedGenetA149A:1407–1414