



Facultad de Medicina  
Departamento de Pediatría

**CARACTERIZACION CLÍNICA, RADIOLOGICA Y  
MOLECULAR DE PACIENTES CON TALLA BAJA  
Y ANOMALÍAS ESQUELÉTICAS LEVES.  
RENDIMIENTO DE UN PANEL DE  
SECUENCIACIÓN MASIVA DE GENES  
IMPLICADOS EN DISPLASIAS ESQUELÉTICAS**

**Memoria para optar al grado de doctor de:**

Lucía Sentchordi Montané

**Directoras de Tesis:**

Dra. Karen E. Heath

Dra. Purificación Ros Pérez

Madrid, 2022.

A mis padres, me dieron la vida

A Óscar y África, se tuvieron que ir pronto, no pudieron disfrutar mucho tiempo ser pediatras

## Agradecimientos

Siento una inmensa gratitud por todas las personas que me han acompañado en esta etapa de mi vida. Gracias a todos por creer en mí, por vuestro aliento y vuestro cariño.

Esta tesis me ha hecho crecer como pediatra en particular, como médico en general y como persona de forma muy especial. Profundizar en un campo del conocimiento y haberlo hecho desde otro ámbito, acompañada de personas con profesiones diferentes a la de pediatra, han sido las claves para enriquecerme. Han sido unos años de oportunidades infinitas.

Gracias sobre todo a Karen Heath, mi directora, por abrirme todas las puertas de forma generosa, excitante y segura. Karen es contagiosa, pero sobre todo es un gran ejemplo y una fuente de inspiración. Gracias por tu inteligencia, tu constancia, tu alegría, tu ilusión. Y por respetar mi ritmo. Al compartir tu trabajo conmigo he tenido la grandísima oportunidad de ver qué detrás de las urgencias, las consultas y las plantas de hospitalización hay muchos profesionales cuyo trabajo parece invisible. Yo he tenido la suerte de que todos me enseñaran qué hacen, cómo lo hacen, lo difícil y duro que resulta muchas veces y cómo lo aman. Gracias mil a todos esos compañeros de la parte de atrás. Gracias Karen Heath, Sara Benito, Miriam Aza, Paqui Díaz, Silvia Modamio, Angel Campos, Carolina González, Alberta Belinchón, Alfonso Hisado, Beatriz Paumard y Javier Gayarre. Gracias por tantas y tantas explicaciones, por vuestro interés y vuestra profesionalidad, por todas las buenas tardes, por los viajes y las charletas, por ayudarme con los sinsabores. Habéis sido un auténtico regalo para mí.

Gracias Puri Ros, mi otra directora, por tu disponibilidad y tu apoyo. Por haber estado en la retaguardia esperando tu momento, por tu visión profesional de las cosas, tu tenacidad y tu capacidad.

Me siento profundamente afortunada también por la oportunidad que tuve de ir al H. Necker de París. Gracias a las doctoras Genevieve Baujat y Valerie Cormier-Daire por compartir su trabajo conmigo, por tratarme como una más del equipo desde el primer día y haber alimentado mi entusiasmo.

Además he tenido la suerte de trabajar con excelentes compañeros pediatras endocrinos, que colaboraron conmigo y atendieron siempre mis peticiones. Gracias a mi amiga de siempre, Carolina Bezanilla. Y gracias a los que en estos años se han ido convirtiendo también en amigos: Pilar Bahillo, Pablo Ruiz-Ocaña, Pablo Prieto, Inés Mulero, Jesús González-Buitrago, Atilano Carcavilla, Alfonso Lechuga, Ana Barreda, Gabriel Martos y otros muchos.

También me siento agradecida a los miembros de la UMDE, por haber logrado impulsar ese grupo profesional tan necesario. En especial gracias a Fernando Santos y Manuel Parrón, con quienes he compartido pacientes, proyectos e inquietudes.

Gracias a todos mis compañeros del hospital Infanta Leonor. Mis jefes durante estos años, Luis Sancho y Begoña Pérez-Moneo, siempre confiaron en mí. Los pediatras escucharon “mis rollos”, aguantaron mis tensiones y se alegraron conmigo. Los residentes se emocionaron con mis logros. Las enfermeras y auxiliares extrajeron las muestras y me ayudaron a explorar a los pacientes.

Gracias siempre a los pacientes y sus familias. A lo largo de estos años no he parado de encontrarme con gente colaboradora y comprensiva; trajeron a sus hijos, a sus hermanos y a sus padres todas las veces que fueron necesarias; se dejaron pinchar, explorar y fotografiar y fueron pacientes con las explicaciones y los resultados. Sin pacientes no hay médicos ni investigadores, ellos nos motivan a diario y nos devuelven su gratitud. Gracias en especial a la paciente P.V. por compartir su enfermedad conmigo, por enseñarme cómo es vivir feliz de otra manera, por permitirme acompañarla.

Gracias a todos los amigos que siguieron de cerca mis pasos. Gracias por su interés en mis dificultades y mis logros, gracias por su apoyo incondicional. Tengo muchísima suerte. Millones de gracias Elena, Rocío, Natxo, Belén, Jota, Ana, Carolina, Clara, Teresa, Bruno, Paloma, Clara, Male, Luis, Fausto, David y muchos más.

Gracias a mi familia, que siempre ha sido mi pilar. A mis padres que por temporadas me preguntaron por la tesis a diario, hasta que les dije que el proceso era largo. Que se ofrecieron “a ayudarme” en unas semanas en que andaba desesperada. No hay palabras. A mi hermano, a mis tías y mis tíos, gracias por su compañía, su interés y su cariño, por participar en mi educación y en la búsqueda de mi vocación.

Gracias a mi Peter. Te he robado unos cuantos paseos, pero te voy a compensar. Tenerte a mi lado es un regalo.

Gracias a Gonzalo, que apareció al final, dando luz.

## Resumen

La talla baja es un motivo de consulta frecuente en endocrinología infantil. Su caracterización y diagnóstico han sufrido un enorme cambio en las dos últimas décadas y gracias a los estudios de secuenciación masiva se han podido dilucidar multitud de nuevas causas de talla baja. Entre ellas, las relacionadas con la condrogénesis ocupan un lugar relevante. La descripción de pacientes con deficiencia de *SHOX* o variantes en heterocigosis en *NPR2* y *FGFR3*, fueron los primeros indicios de la importancia de los genes relacionados con displasias esqueléticas en pacientes con talla baja de etiología desconocida. La ausencia de fenotipos característicos de displasias esqueléticas en muchos de estos pacientes llevó a la búsqueda de signos músculo-esqueléticos, tanto clínicos como radiológicos, así como al estudio de otros genes relacionados con displasias esqueléticas en pacientes con talla baja de etiología desconocida.

La presente investigación reúne los resultados del examen clínico y radiológico de pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves, sometidos a un panel de secuenciación masiva de genes implicados en displasias esqueléticas, encontrando variantes genéticas en 19.4% de ellos. Entre los resultados destaca la elevada prevalencia de pacientes con variantes en heterocigosis en el gen de agregano, *ACAN*, caracterizados por presentar talla baja leve-moderada y braquidactilia, no siendo la maduración esquelética adelantada ni las complicaciones articulares criterios imprescindibles. El segundo lugar en relevancia lo ocupan las variantes en heterocigosis en el gen *Indian hedgehog*, *IHH* en los que la braquidactilia A1 no es el fenotipo más observado, sino talla baja de severidad variable, acortamiento de la falange media del 5º dedo y micromelia leve. Ambas entidades se caracterizan por la heterogeneidad de su fenotipo, así como por presentar signos leves e inespecíficos. El panel de secuenciación masiva demuestra utilidad en el diagnóstico no sólo en estas entidades sino también en formas atípicas o atenuadas, o en estadios precoces de enfermedades conocidas.

La posibilidad de encontrar una variante genética en pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves aumenta en presencia de desproporción a expensas de miembros inferiores y de que el paciente tenga un progenitor con talla baja y anomalías esqueléticas. La braquidactilia es el hallazgo radiológico más común entre los pacientes con variantes patogénicas en los genes implicados en displasias esqueléticas. La presencia de desproporción corporal, alteraciones esqueléticas externas, anomalías radiológicas y progenitores con talla baja desproporcionada y/o rasgos esqueléticos orientan a sospechar entidades relacionadas con genes que intervienen en la condrogénesis. El fenotipado esquelético sistemático enriquece el abordaje de pacientes con talla baja, y orienta la realización de estudios genéticos.

## Summary

Short stature is a frequent reason for pediatric endocrinology consultations. Its characterization and diagnosis have undergone an enormous evolution in the last two decades. Thanks to next generation sequencing studies (NGS), a multitude of new causes of short stature have been elucidated. Among them, those related to chondrogenesis are of special relevance. The description of patients with *SHOX* deficiency or heterozygous variants in *NPR2* and *FGFR3* were the first indicators of the importance of genes related to skeletal dysplasias in patients with short stature of unknown etiology. The absence of characteristic phenotypes of skeletal dysplasias in many of them encouraged the search for musculoskeletal signs, both clinical and radiological, as well as the probable involvement of other genes related to skeletal dysplasias in patients with short stature of unknown etiology.

The present investigation brings together the results of the clinical and radiological examination of patients with short stature and mild skeletal abnormalities who underwent a NGS panel of genes involved in skeletal dysplasias, finding genetic variants in 19.4% of them. The results highlight the high prevalence of patients with heterozygous variants in the aggrecan gene, *ACAN*, characterized by mild-moderate short stature and brachydactyly, with neither advanced skeletal maturation nor joint complications being essential criteria. The second most found is heterozygous mutations in the Indian hedgehog gene, *IHH* in which brachydactyly A1 is not the most observed phenotype, but short stature of variable severity, shortening of the middle phalanx of the 5th finger and mild micromelia. Both entities are characterized by the clinical heterogeneity as well as mild and non-specific signs. The skeletal dysplasia NGS panel demonstrates diagnostic utility not only in these entities but also in atypical, attenuated forms or early stages of known disease.

The possibility of finding a genetic variant in patients with short stature and mild skeletal abnormalities increases in the presence of disproportion at the expense of lower limbs and the patient having a parent with short stature and skeletal abnormalities. Brachydactyly is the most common radiological finding among patients with pathogenic variants in genes implicated in skeletal dysplasias. The presence of body disproportion, external skeletal alterations, radiological abnormalities and parents with disproportionate short stature and/or skeletal features lead to suspect entities related to genes involved in chondrogenesis. Systematic skeletal phenotyping enriches the approach to patients with short stature and guides the performance of genetic studies.

## INDICE

Abreviaturas .....	3
Introducción .....	6
1. Crecimiento y desarrollo .....	6
1.1 Crecimiento normal. Patrón de crecimiento. ....	7
1.2 Rasgos propios del crecimiento en humanos: cambios en las proporciones corporales, crecimiento de recuperación y canalización. ....	10
2. Fisiología del crecimiento: Condrogénesis y la placa de crecimiento. ....	11
3. Talla baja.....	19
3.1 Concepto y epidemiología .....	19
3.2 Clasificación de la talla baja .....	20
4. Displasias esqueléticas .....	26
4.1. Haploinsuficiencia o ausencia de <i>SHOX</i> .....	29
4.2 Otras displasias esqueléticas que cursan con talla baja .....	35
5. Evaluación de la talla baja .....	36
5.1. Estudios genéticos en pacientes con talla baja .....	37
5.2. Secuenciación masiva: Next Generation Sequencing.....	38
6. Otras casusas de talla baja de origen primario .....	42
6.1. Síndrome de Noonan.....	43
6.2. Síndrome de Silver Russell.....	43
6.3. Talla baja relacionada con variantes en heterocigosis en <i>NPR2</i> .....	44
6.4. Talla baja relacionada con variantes en heterocigosis en <i>NPPC</i> .....	45
6.5. Talla baja relacionada con variantes en heterocigosis en <i>ACAN</i> .....	46
7. Tratamiento de pacientes con talla baja .....	46
7.1. Hormona de crecimiento recombinante (GHr) .....	47
7.2. IGF-1 recombinante (IGF-1r).....	48
7.3. Moduladores de la pubertad .....	49
7.4. Alargamiento óseo.....	49
8. Nuevas perspectivas terapéuticas en talla baja .....	50
8.1. Terapéutica en acondroplasia .....	50
8.2. Terapia en otras displasias esqueléticas.....	52
Hipótesis.....	53
Objetivos .....	54

Artículos publicados durante el desarrollo de la investigación .....	55
Resumen de los trabajos originales publicados .....	58
Artículo 1 .....	58
Artículo 2 .....	74
Artículo 3 .....	88
Artículo 4 .....	99
Discusión .....	111
1.Aspectos fenotípicos .....	112
1.1 Serie de pacientes con variantes en heterocigosis en <i>ACAN</i> .....	112
1.2. Serie de pacientes con variantes en heterocigosis en <i>IHH</i> .....	113
1.3. Examen clínico en el probando: Desproporción corporal .....	113
1.4. Examen clínico en los progenitores .....	115
2.Importancia de la caracterización radiológica.....	116
3.Fenotipos leves, heterogéneos e inespecíficos .....	117
4.Caracterización molecular .....	118
4.1. Ventajas del diagnóstico molecular .....	118
4.2. Problemas derivados de la interpretación de variantes de significado incierto (VUS) .....	120
4.3. Correlación fenotipo-genotipo .....	122
4.4. ¿Cuál es la técnica de diagnóstico ideal? ¿Paneles de genes o exomas?.....	123
5.Limitaciones de la investigación .....	125
6.“Displasias esqueléticas leves”: nueva categoría diagnóstica.....	128
7.Importancia del fenotipado esquelético sistemático.....	128
8.Consideraciones finales y futuras líneas de investigación .....	133
Conclusiones .....	134
Referencias.....	135



## Abreviaturas

ACMG: *American College Medical Genetics and Genomics*, Academia Americana de Genética Médica y Genómica

ACTH: *Adrenocorticotropic hormone*, hormona adrenocorticotropa

AD: Autosómico dominante

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AR: Autosómico recesivo

ALS: *Acid-labile subunit*, Subunidad ácido-lábil

Array CGH: *Comparative genome hybridization-array*, array (matriz) de hibridación genómica comparada

BMPs: *Bone morphogenetic proteins*, proteínas morfogenéticas del hueso

CNP: *C-natriuretic peptide*, péptido natriurético C

CNV: *Copy number variant*, variante del número de copias

COMP: *Cartilage oligomeric matrix protein*, proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa

DE: Desviación estándar

DEM: Displasia epifisaria múltiple

DLW: Discondrosteosis de Léri-Weill

DML: Displasia mesomélica de Langer

EMA: *European Medicines Agency*, Agencia Europea del medicamento

EO: Edad ósea

FDA: *Food and Drug Administration*, Administración de Medicamentos y Alimentos

FGFs: *Fibroblast growth factors*, factores de crecimiento fibroblástico

FGFR3: Fibroblast growing factor receptor-3, receptor del factor de crecimiento fibroblástico 3

FSH: *Follicle stimulating hormone*, hormona folículo estimulante

GH: *Growth hormone*, hormona de crecimiento

GHBP: *Growth hormone binding protein*, proteína transportadora de hormona de crecimiento

GHR: *Growth hormone receptor*, receptor de la hormona de crecimiento

GHRH: *Growth hormone releasing hormone*, hormona liberadora de hormona de crecimiento

GnRH: *Gonadotropin releasing hormone*, hormona liberadora de gonadotropinas

GWAS: *Genome Wide Association Studies*, estudios asociación genoma

IGFs: *Insulin-like growth factors*, factores de crecimiento similares a insulina

IGFBPs: *IGF binding proteins*, proteínas transportadoras de IGF

IHH: *Indian hedgehog*

IL-1: Interleuquina 1

IL-6: Interleuquina 6

ICPED: *International Classification of Pediatric Endocrine Diagnoses*, Clasificación Internacional de Diagnósticos en Endocrinología Pediátrica

LH: *Luteinizing hormone*, hormona luteinizante

IMC: Índice de masa corporal

Indels: Inserciones y deleciones

MAPK: *Mitogen activated protein kinase*, proteínas quinasas activadas por mitógenos

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, amplificación de sondas tras ligación múltiple

NGS: *Next generation sequencing*, secuenciación masiva

NPR-B: *Natriuretic peptide receptor-B*, receptor de péptido natriurético B

PAPP-A: *Pregnancy-associated plasma protein*, proteína plasmática asociada a la gestación

Pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PEG: Pequeños para la edad gestacional

PI3-K: *Phosphatidylinositol-OH kinase*, fosfoinositol 3-quinasa

PTA: Predicción de talla adulta

PTH: *Parathyroid hormone*, hormona paratiroidea

PTH1R: *Parathyroid hormone 1 receptor*, receptor hormona paratiroidea 1

PTHrP: *Parathyroid hormone-related protein*, proteína relacionada con la hormona paratiroidea

RCCD: Retraso constitucional del crecimiento y desarrollo

SEDK: *Spondyloepiphyseal dysplasia Kimberly type*, Displasia espondiloepifisaria tipo Kimberly

SEMD: *Spondyloepimetaphyseal dysplasia*, Displasia espondiloepimetafisaria

SHOX: *Short stature homeobox protein*

SNP: *Single nucleotide polymorphism*, polimorfismo único de nucleótido

SNV: *Single nucleotide variants*, variante única de nucleótido

SRS: Síndrome de Silver-Russell

STAT5: *Signal transducer and activator of transcription 5*, transductor de señal y activador de transcripción 5

TBI: Talla baja idiopática

TBF: Talla baja familiar

TD: Talla diana

TNF $\alpha$ : *Tumoral necrosis factor  $\alpha$* , factor de necrosis tumoral  $\alpha$

TSH: *Thyroid stimulating hormone*, hormona estimuladora del tiroides

Ts: Talla sentado

Ts/T: Ratio talla sentado/talla

VC: Velocidad de crecimiento

VUS: *Variant of unknown significance*, variante de significado incierto

WES: *Whole exome sequencing*, secuenciación exoma completo

WGS: *Whole genome sequencing*, secuenciación genoma completo

XLR: *X linked recessive inheritance*, herencia recesiva ligada a X

# Introducción

## 1. Crecimiento y desarrollo

Los procesos de crecimiento y desarrollo caracterizan la vida del niño desde su nacimiento hasta alcanzar la edad adulta. Ambos hacen referencia al complejo proceso de transformación desde el óvulo fecundado hasta el individuo adulto maduro <sup>[1]</sup>. El crecimiento es el incremento de las dimensiones corporales originado por el aumento del número y tamaño celular. El desarrollo es un proceso en el que, a partir de una célula pluripotencial e indiferenciada, se lleva a cabo la diferenciación, maduración y organización de tejidos, órganos y aparatos, que forman en su conjunto el organismo humano.

En ambos procesos existe una continua interacción entre la herencia y el ambiente social y ecológico; cada individuo tiene una base genética con un potencial definido, que es modulado por un amplio grupo de factores extra-génicos, determinando trayectorias y resultados. Cuando el crecimiento y el desarrollo de un niño son adecuados solemos atribuir a ese niño en concreto bienestar general. Así, ambos son “centinelas” de la salud del niño y predictores objetivos del cumplimiento del potencial genético predeterminado de cada individuo <sup>[2]</sup>. El crecimiento corporal máximo, la madurez de órganos y sistemas y la capacidad reproductiva se alcanzan al final de la pubertad, siendo la duración de esta etapa mucho mayor que en el resto de los mamíferos <sup>[2]</sup>.

La pediatría surge como especialidad médica hace más de un siglo, con el objetivo de estudiar la salud de los niños, su desarrollo y crecimiento y sus posibilidades para alcanzar el máximo potencial genético, tanto desde el punto de vista físico como intelectual. Su ámbito y prioridades se hallan en continuo cambio al ser reflejo de circunstancias, recursos y necesidades locales. La progresión de los conocimientos científicos, que sucede en paralelo al desarrollo económico y tecnológico acaecido en el último siglo, revoluciona el cuidado de la salud y la enfermedad <sup>[3]</sup>. Tras lograr un mejor control de la nutrición y las infecciones, la medicina pediátrica se enfoca en procesos que afectan a un número relativamente pequeño de niños como los defectos genéticos, la discapacidad intelectual, las enfermedades oncológicas, los procesos reumáticos, las enfermedades renales o las alteraciones metabólicas y endocrinas entre otras.

Los conocimientos actuales sobre el crecimiento reflejan la contribución de la genética y la biología molecular <sup>[4]</sup>. El estudio de su fisiología permite comprender gran parte del crecimiento patológico y abre la puerta a las posibilidades terapéuticas, acercando la práctica clínica a la medicina personalizada y de precisión.

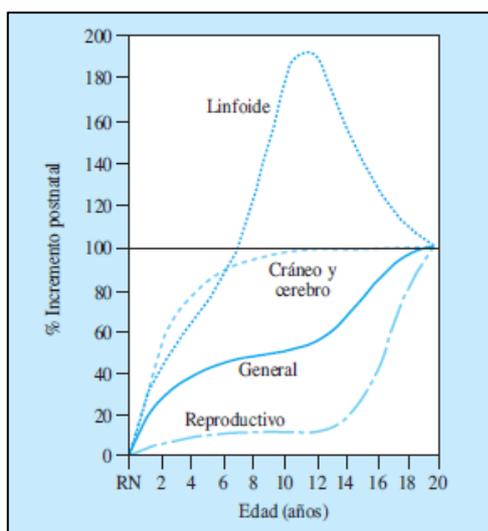
## 1.1 Crecimiento normal. Patrón de crecimiento.

La talla a lo largo de la infancia, y la talla adulta que se alcanzará, es un motivo de preocupación para padres y niños, y supone una causa frecuente de consulta en Pediatría y en Endocrinología Pediátrica. Desde el punto de vista médico, la talla baja puede ser un síntoma de múltiples patologías; sin embargo, en la mayoría de los casos, es simplemente la expresión de uno de los extremos de la distribución normal de la talla y del ritmo madurativo del ser humano <sup>[5]</sup>.

Comprobar el crecimiento y desarrollo de un niño es una de las actividades preventivas de los programas de salud en pediatría <sup>[6]</sup>. Aunque ambos procesos se encuentran íntimamente ligados, no suceden de forma sincrónica y la variabilidad en la forma y el tiempo es muy marcada entre unos individuos y otros. Cada órgano y tejido, cada segmento corporal crece y se desarrolla con su propia secuencia, con distinta duración y a diferente velocidad, alcanzando el tamaño adulto a distintas edades <sup>[4]</sup>. Cuando el crecimiento se aleja del patrón considerado para edad y “tempo” (tiempo biológico de crecimiento y desarrollo) se podrá plantear la existencia de una patología.

Existen cinco patrones de crecimiento propios de cada tejido <sup>[3]</sup> <sup>[7]</sup>. En la figura 1 se muestra de forma esquemática los distintos patrones en relación con la edad y el tamaño adulto definitivo.

- Patrón general del crecimiento humano. Es la curva que sigue el organismo en su conjunto. La masa esquelética y muscular, órganos internos como hígado, riñón y bazo, siguen este patrón de crecimiento.
- Patrón de crecimiento neural, cerebral o craneal. El sistema nervioso central presenta un crecimiento extremadamente rápido en el periodo prenatal y en los primeros años de vida, alcanzando el 90% de su peso de adulto a los 5 años, mientras que de los 6 a los 15-20 años solo aumenta el 10% restante. Algo similar acontece con el cráneo; su circunferencia pasa de 35 cm al nacimiento a 50 cm a los 2 años.
- Patrón de crecimiento de los órganos linfoides. Experimentan un gran desarrollo en los primeros años de la vida; a los 5 años alcanzan el 100% del tamaño adulto.
- Patrón de crecimiento del aparato reproductor. Tras la diferenciación sexual que sucede en la etapa embrionaria-fetal, sigue un periodo largo de letargo y crecimiento muy lento. Con el comienzo de la pubertad tiene lugar la segunda fase de crecimiento rápido donde se completa el desarrollo de las gónadas y los caracteres sexuales externos, y se alcanza la capacidad reproductora.
- Patrón de crecimiento del tejido adiposo. Se caracteriza por un crecimiento rápido en el primer año de vida. Alrededor de 4-8 años se experimenta un descenso y, a partir de los 10 años, un nuevo aumento significativo, más manifiesto en las mujeres, que continúa en la pubertad.



**Figura 1:** Patrones de crecimiento de diferentes partes y tejidos corporales. Reproducido de Tanner y cols. [3]

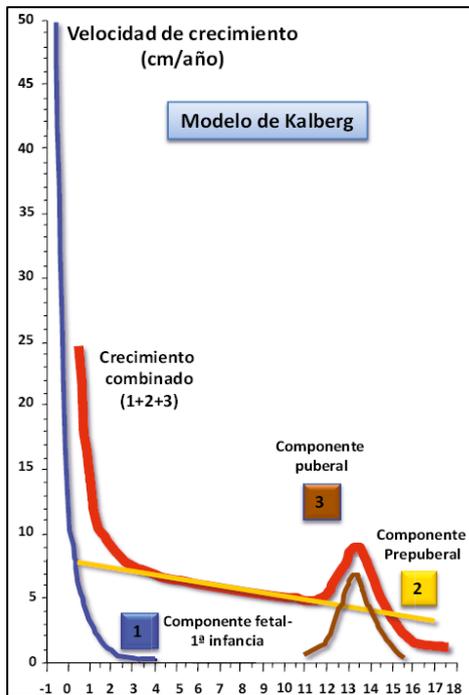
El foco de la presente investigación se dirige al crecimiento longitudinal y la talla baja, por lo que nos centraremos en lo que sucede en músculos y esqueleto. Ambos se comportan según el “patrón general” que cuenta con tres etapas diferenciadas. El conocido modelo de Kalberg (reproducido en la figura 2) representa el crecimiento en tres fases en relación con los factores biológicos responsables del mismo basándose en datos experimentales [8]; también se conoce como *modelo ICP (infancy, childhood, puberty)*. Se detallan a continuación las etapas y sus características [2] [5].

- Componente fetal-1ª infancia (I: Infancy):** Abarca desde la mitad de la gestación hasta aproximadamente los 2-3 años. La velocidad de crecimiento (VC: incremento talla/año) es máxima en el periodo fetal y continúa siendo elevada en los tres primeros años de vida; si bien, la caída postnatal es clara y progresiva respecto a la vida intrauterina. El crecimiento fetal, en ausencia de anomalías genéticas, no depende tanto del genotipo como del espacio disponible para crecer (tamaño uterino y materno) y de la nutrición, que depende, a su vez, de la función placentaria [9]. Tras el nacimiento y durante los primeros meses de vida, la nutrición continúa siendo el principal factor determinante del crecimiento. La influencia del genotipo se pone de manifiesto progresivamente y se producen aceleraciones o deceleraciones en el ritmo de crecimiento de los niños en función de su potencial de crecimiento (talla familiar alta, media o baja) y/o de su ritmo biológico de maduración (rápido, normal o lento), rasgos ambos determinados también genéticamente. Ambos determinan que cada niño tenga su propio canal de crecimiento, un carril por el que crecen a lo largo de la infancia y que se mantiene más o menos constante. El fenómeno de “canalización”, que sucede entre el 2º y el 3º año de vida, supone el traslado a este carril y el final de la etapa fetal-1ª infancia.

Los mecanismos hormonales que regulan el crecimiento fetal son, en gran medida, desconocidos; no obstante, la insulina y el sistema de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs), especialmente IGF-1 e IGF-2, parecen tener un papel relevante. Al contrario de lo que ocurre en la vida postnatal, la producción fetal de IGFs no es dependiente de hormona de crecimiento (GH); de hecho, la GH no es determinante en el crecimiento fetal <sup>[10]</sup>. Esta situación se mantiene durante los primeros meses de vida extrauterina; la influencia de la GH se va poniendo de manifiesto de forma gradual y progresiva y está claramente presente a los 6 meses de vida <sup>[5]</sup>.

- **Componente prepuberal o de la segunda infancia (C: Childhood):** Es la etapa más larga; abarca desde los 2-3 años de vida hasta el inicio puberal. Se mantiene la deceleración postnatal de la VC con una reducción progresiva hasta mantener una tasa de crecimiento de 5-7 cm/año. Este enlentecimiento se hace más manifiesto antes de la pubertad donde existe una “depresión prepuberal de la VC”. Esta pasa a ser de 4.5-5 cm/año, pudiendo ser especialmente marcada en los maduradores tardíos, donde llega a alcanzar un ritmo de 2-3 cm/año. El crecimiento en esta etapa depende del genotipo y está regulado principalmente por el eje somatotrofo, con la participación de otras hormonas (insulina, hormonas tiroideas, andrógenos suprarrenales, glucocorticoides, leptina, hormona paratiroidea, vitamina D ...) y factores de crecimiento locales <sup>[8]</sup>.
- **Componente puberal (P: Puberty):** Es el resultado de la sinergia de dos sistemas hormonales, ambos críticos y promotores del crecimiento, uno dependiente de la GH y el otro de los esteroides sexuales. Durante este periodo tiene lugar la aceleración del crecimiento que concluye con el pico de máxima velocidad de este, decelerándose posteriormente hasta alcanzar la talla adulta. El componente puberal se suma al prepuberal a una edad variable, determinado por el genotipo. Su aparición se manifiesta por una clara inflexión en la curva de crecimiento, el llamado “estirón puberal”. En las niñas, la aparición del botón mamario (estadio II de Tanner) marca el inicio puberal, a una edad media de 10,5-11 años, y suele coincidir con el inicio del “estirón puberal”. La menarquia, por el contrario, es un fenómeno tardío, que se produce alrededor de 2 años después del inicio puberal (estadio IV de Tanner), cuando el estirón está prácticamente finalizado. El crecimiento postmenarquia es muy variable, varía entre 4 y 11 cm (media de 6-7 cm) dependiendo, en parte, del “tempo” de maduración. En los varones, el inicio de la pubertad lo marca el incremento del volumen testicular ( $\geq 4$  ml), y se produce a una edad media de 11,5-12 años. El estirón no coincide con el inicio de la pubertad, sino que se inicia en un estadio III de Tanner y unos dos años más tarde que en las niñas. El crecimiento cesa en los mujeres y varones y a una edad media entre los 17 y 21 años, respectivamente. La ganancia de talla, desde el inicio del estirón hasta la finalización del

crecimiento, supone unos 23-27 en las mujeres y 25-30 cm en los varones (15-20% de la talla adulta) [3].

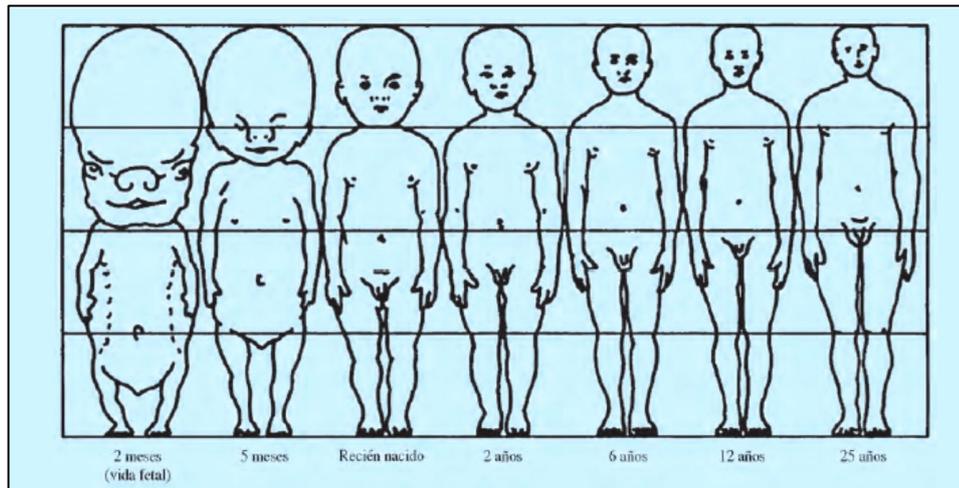


**Figura 2:** Modelo de Kalberg (talla/longitud), donde se ponen de manifiesto los tres componentes de la curva normal de crecimiento humano: 1) fetal-primer infancia (en azul); 2) prepuberal o segunda infancia (en amarillo); y 3) puberal (en marrón). La suma de los tres componentes se representa en rojo y se expresa como crecimiento combinado [8]. Reproducido de Pozo Román y cols. [5]

## 1.2 Rasgos propios del crecimiento en humanos: cambios en las proporciones corporales, crecimiento de recuperación y canalización.

Las diferencias en los patrones de crecimiento de los diferentes órganos y tejidos tienen también expresión en la tasa y tiempo de maduración de las distintas regiones corporales. La talla es la suma de la longitud de los segmentos corporales: cabeza, tronco (columna vertebral y pelvis) y extremidades inferiores. Así la relación entre estas regiones dependerá a lo largo del crecimiento de las medidas relativas de cada uno de los componentes [2] [3]. En la figura 3 se representa esquemáticamente los cambios de las proporciones corporales desde la etapa fetal a la adulta. Desde el nacimiento, la cabeza incrementa cerca de dos veces su longitud, el tronco lo hace tres, los brazos, cuatro y las piernas, cinco. Así, el macizo cráneo-facial representa en el recién nacido el 25%, mientras que en la edad adulta solamente un 10%. La proporción del tronco con relación a la talla permanece bastante estable a todas las edades, representando el 45-50%. La proporcionalidad de las piernas con relación a la talla experimenta una evolución contraria a la del cráneo; en el periodo neonatal sólo representa el 15% y aumenta progresivamente hasta alcanzar en el adulto más del 40%. La envergadura es menor que la longitud en el recién nacido, pero a partir de los 10-12 años, es mayor. Durante la pubertad predomina proporcionalmente el aumento del tronco; las extremidades alcanzan precozmente el tamaño adulto y el tronco finaliza posteriormente.





**Figura 3:** Representación esquemática del cambio de proporciones corporales con relación a la edad durante el crecimiento. Reproducido de Cruz et. al [3].

La capacidad de recuperación de la talla perdida tras la curación o mejoría de una enfermedad crónica es lo que se denomina “crecimiento de recuperación” [11]. Cuando un sujeto, por la acción de una determinada noxa, se desvía de su canal de crecimiento, el organismo no sólo es capaz de percibirlo, sino que, cuando la noxa desaparece, tiende a recuperarlo. Su existencia presupone que cada niño, en condiciones normales, tiende a mantenerse dentro de un estrecho carril de crecimiento (desde que se produce la “canalización” mencionada anteriormente). Se ha postulado la existencia de “periodos críticos” durante los cuales, la actuación de una noxa podría alterar definitivamente la talla adulta. Estos periodos de alta vulnerabilidad corresponderían a los momentos de máximo crecimiento, pubertad y especialmente periodo fetal y primer año de vida.

## 2. Fisiología del crecimiento: Condrogénesis y la placa de crecimiento.

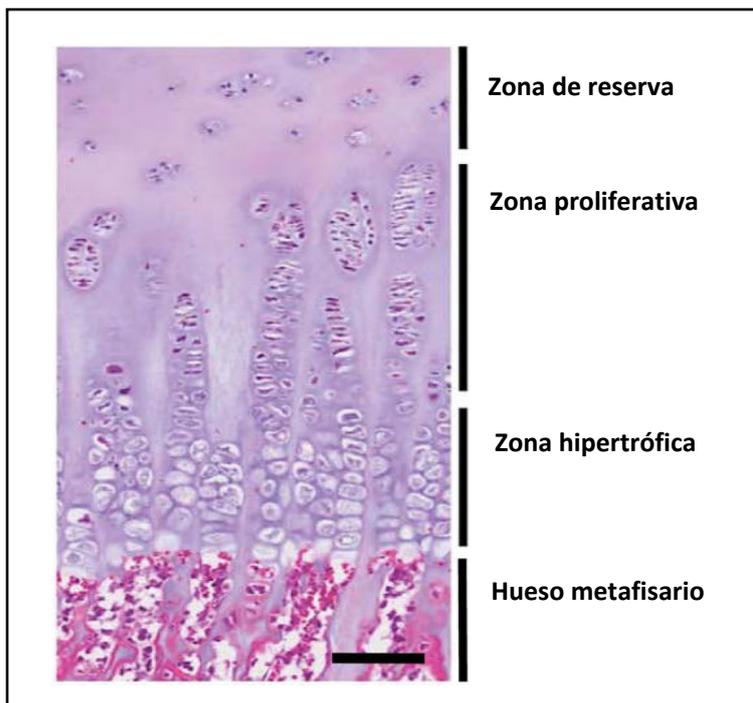
De forma general el crecimiento lineal es un proceso regulado por nutrición, hormonas, genética y salud general. Al igual que entendemos la fisiología respiratoria en términos de la biología del pulmón hemos pasado en los últimos años a comprender el crecimiento lineal y los trastornos del crecimiento en términos del proceso biológico subyacente que tiene lugar en el hueso [6] [12] y, en particular, en la placa o cartílago de crecimiento.

La fisiología del tejido óseo se caracteriza por dos procesos: la formación y el remodelado. La formación o condrogénesis determina el crecimiento longitudinal de los huesos, siendo un proceso complejo en el que una serie de sucesos interrelacionados suceden de forma simultánea. El

remodelado, por el contrario, tiene lugar en el esqueleto durante toda la vida e implica la retirada de hueso mineralizado seguido de la formación y mineralización de matriz ósea <sup>[13]</sup>.

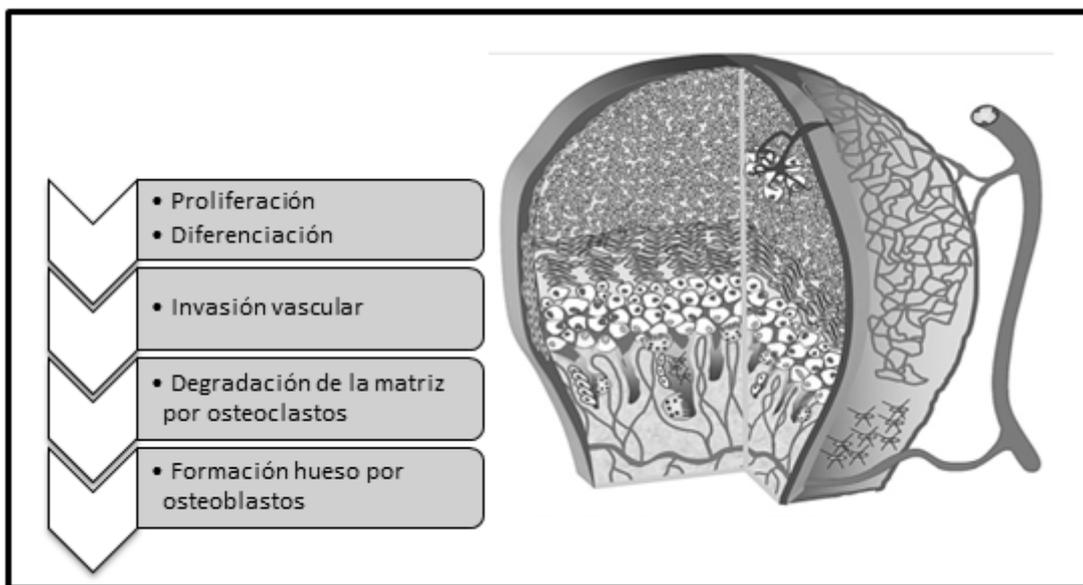
La condrogénesis se inicia durante la etapa fetal y termina al finalizar la pubertad; las células mesenquimales embrionarias derivarán en hueso a través de dos procesos, la osificación membranosa (típica de huesos planos como el cráneo) y la osificación endocondral (típica de los huesos largos, huesos tubulares cortos de manos y pies así como vértebras) <sup>[14]</sup>. Esta última se caracteriza por la transformación de células mesenquimales en condrocitos y la formación de un molde cartilaginoso capaz de crecer, producir matriz y transformarse después en hueso. Estos fenómenos tienen lugar en la placa de crecimiento. Dicha placa de crecimiento es una estructura cartilaginosa localizada cerca del final de la mayoría de los huesos de los niños (entre la epífisis y la metáfisis) formada por condroblastos, condrocitos y una matriz extracelular <sup>[13]</sup>. Los condrocitos se organizan en capas de proliferación; en localización periarticular se disponen de forma circular y más caudalmente en columnas. Se distinguen tres capas: la zona reserva, la zona proliferativa y la zona hipertrófica (representado en figura 4). Cada una de ellas tiene un rol definido.

- Zona reserva: Actúa como reservorio de progenitores de condrocitos; allí se encuentran los condrocitos más indiferenciados, en estado latente.
- Zona proliferativa: Contiene condrocitos apilados en columnas en paralelo al eje del hueso; en ella tiene lugar una proliferación rápida de condrocitos indiferenciados.
- Zona hipertrófica: Se encuentra al final de la zona proliferativa y cercana a la metáfisis. En ella las células detienen su división y aumentan su tamaño para formar condrocitos hipertróficos, más diferenciados y cuya función es preparar la matriz para su mineralización.



**Figura 4:** Imagen histológica (microscopía óptica) de la placa de crecimiento de un niño de 11 años. Se aprecia la disposición en tres capas por encima del hueso metafisario: zonas reserva, proliferativa e hipertrófica. La línea negra en esquina inferior derecha representa 100  $\mu\text{m}$ . Modificada de Baron y cols. <sup>[15]</sup>

La proliferación e hipertrofia celular se acompañan de una diferenciación progresiva de las células cartilaginosas; este fenómeno unido a la secreción de la matriz extracelular da lugar a la condrogénesis. El cartílago formado es avascular pero próximo a la metáfisis es invadido por la red capilar epifisaria. Gracias a este hecho, tiene lugar la reabsorción del cartílago (apoptosis) por los osteoclastos y la formación del hueso sobre el remanente de cartílago. Se produce un reemplazo por hueso y médula ósea. En la figura 5 se representa de forma esquemática la condrogénesis. El resultado neto de este proceso coordinado es que el nuevo hueso se forma en el límite entre la placa de crecimiento y la metáfisis, causando la elongación de los huesos y el aumento en estatura en los niños [13]. La formación ósea finaliza con la pubertad, produciéndose el cierre de las epífisis. De manera sencilla diríamos que la talla baja se origina como consecuencia de una condrogénesis reducida; y la talla alta por un aumento de esta [15].



**Figura 5:** Estructura celular del hueso en formación con la secuencia de procesos en osificación endocondral. Modificado de Maes y cols. [13].

El esqueleto es además un tejido metabólicamente activo que sufre un remodelado continuo durante toda la vida. Esto implica la reabsorción de hueso mineralizado por parte de los osteoclastos, seguido de formación y mineralización de la matriz por parte de osteoblastos.

Formación y remodelado se producen como consecuencia de la interacción de una compleja red de factores. La investigación sobre el control celular y molecular, unida al estudio de sistemas celulares *in vitro* y a los hallazgos derivados de ratones genéticamente alterados, nos han brindado la oportunidad de conocer con detalle las señales que intervienen en la formación y el remodelado del

hueso. El estudio de enfermedades esqueléticas en humanos contribuye a enriquecer los conocimientos <sup>[14] [16] [17] [18]</sup>.

Para sistematizar la descripción de los factores que intervienen en la formación del hueso hablamos de dos grandes grupos:

- Factores extrínsecos a la placa: nutricionales, endocrinos, inflamatorios, fluido extracelular y actividad física
- Factores intrínsecos a la placa, divididos a su vez en: señales paracrinas, factores de la matriz extracelular y factores intracelulares esenciales.

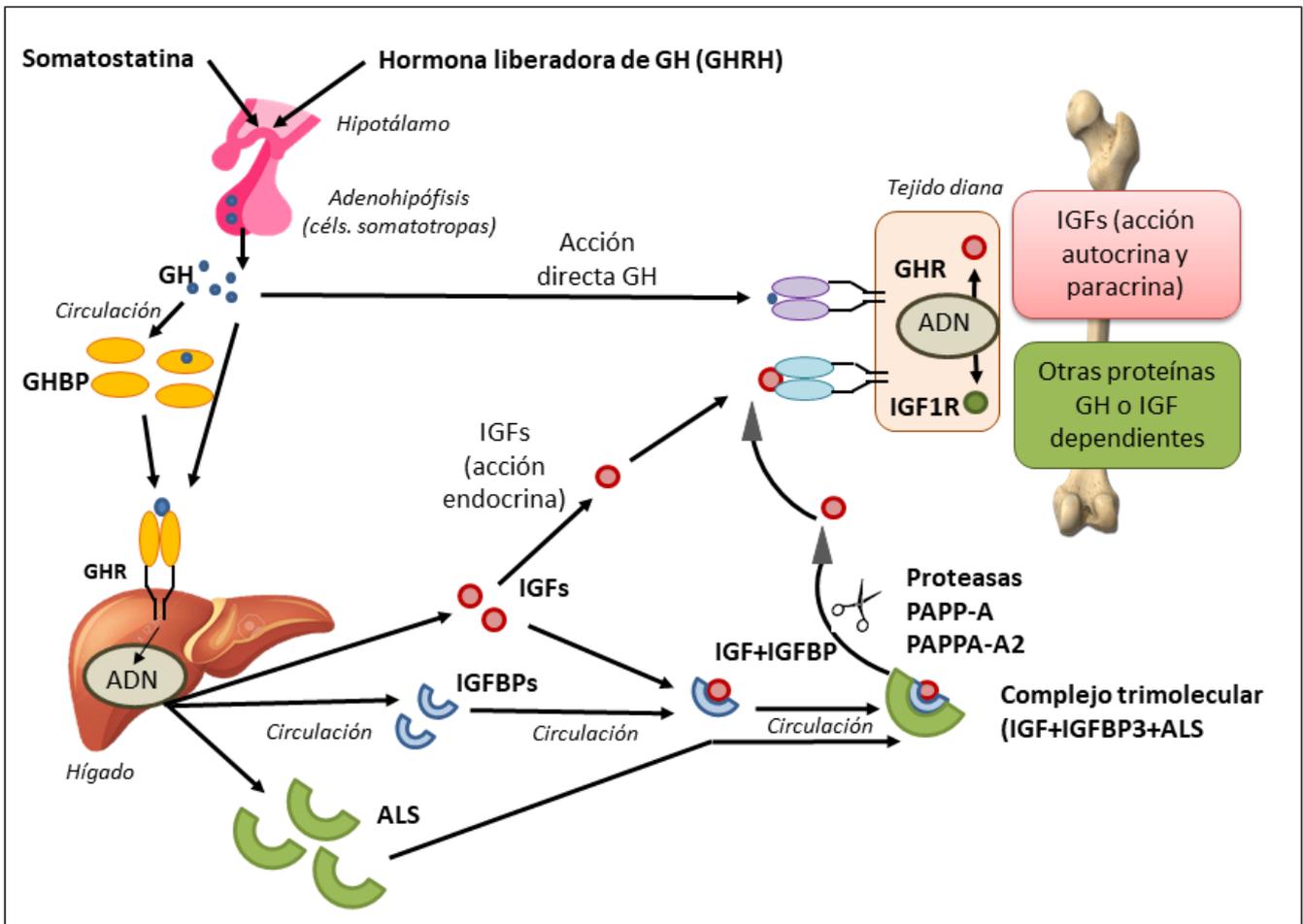
Desarrollaremos de manera resumida todos ellos:

### **Factores extrínsecos:**

- 1- **Nutrientes:** El defecto o exceso nutricional condiciona el crecimiento lineal. Su efecto está mediado por factores endocrinos. En la malnutrición existen niveles bajos de IGF-1, esteroides sexuales y hormonas tiroideas y aumentados de glucocorticoides <sup>[19]</sup>. Se postula que una disminución de la insulina causaría una regulación a la baja de la expresión de GHR (receptor de hormona de crecimiento) y aumento de las concentraciones de FGF-21 (factor de crecimiento fibroblástico 21), ocasionando disminución de la expresión de GHR hepáticos y de STAT5 fosforilado <sup>[20]</sup>. El aumento de FGF-21 modifica además la sensibilidad a la GH no sólo hepática sino también en la placa de crecimiento. Por el contrario los niños obesos tienden a estar en percentiles por encima de su talla diana con maduración esquelética adelantada <sup>[21]</sup>.
- 2- **Hormonas:** Las hormonas tiroideas, los esteroides sexuales, la GH y el IGF-1, son reguladores positivos del crecimiento. Por el contrario, el exceso de glucocorticoides provoca un crecimiento enlentecido. Cada una de estas hormonas tiene efectos locales sobre la condrogénesis, existiendo además complejas interacciones entre ellos <sup>[22]</sup>.
  - Las hormonas tiroideas tienen efecto directo sobre la placa de crecimiento, promoviendo la hipertrofia de condrocitos, e indirecto a través de la estimulación de la secreción de GH. La placa de crecimiento posee receptores de hormonas tiroideas alfa y beta, de manera que el hipotiroidismo retrasa la maduración esquelética y el crecimiento longitudinal y el hipertiroidismo la acelera <sup>[22]</sup>.
  - Los esteroides sexuales ejercen su acción sobre la condrogénesis a partir de la pubertad en condiciones normales. Los estrógenos contribuyen a la aceleración en parte por estimular la producción hipofisaria de GH y de IGF-1. Los andrógenos por su lado contribuyen a través de su conversión a estrógenos (vía aromatasa) y por un efecto directo sobre la placa de crecimiento. Los estrógenos además aceleran la senescencia del cartílago <sup>[20]</sup>.

- El eje somatotropo comienza a ejercer un efecto principal sobre la condrogénesis después del nacimiento (representado de forma esquemática en la figura 6). La GH es sintetizada y secretada de forma pulsátil y con un predominio nocturno por las células somatotropas de la adenohipófisis como consecuencia del efecto neto de dos hormonas hipotalámicas: hormona liberadora de GH (GHRH) y somatostatina. La secreción de ambas está regulada por neurotransmisores y neuropéptidos, al igual que sucede con la GH, que está sometida al impacto de otras hormonas no peptídicas (esteroides sexuales, tiroxina y glucocorticoides) [20]. Además la secreción de GH sufre inhibición por parte de la IGF-1 y la propia GH ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de GHRH [23]. Alrededor del 50% de la GH circula en la sangre unida a una proteína de transporte específica, la GHBP (proteína transportadora de GH) que deriva de la escisión proteolítica del dominio extracelular del receptor de GH (GHR). Cuando la GH se une a GHR se produce la expresión de determinados genes (como *IGF1*) a través de diferentes vías intracelulares, de las cuales, las vías MAPK (proteín quinasa activada por mitógenos), STAT (transductor de señal y activador de transcripción) y PI3-K (fosfoinositol 3-quinasa) son las mejor caracterizadas [20]. La GH posee acciones directas estimulantes del crecimiento sobre el hueso, aunque la mayoría de ellas son mediadas por los IGFs y especialmente por el IGF-1 [5] [24]. IGF-1 e IGF-2, son péptidos de estructura similar a la insulina producidos en el hígado y en los tejidos periféricos, especialmente en hueso y músculo. De forma endocrina (IGFs circulantes) o paracrina-autocrina (IGFs sintetizados en los tejidos), ejercen acciones mitogénicas y anabolizantes sobre la mayoría de las células [25] [26] [27]. La IGF-1 está presente ya en la vida fetal; sus concentraciones aumentan a lo largo de la infancia alcanzando el máximo durante la pubertad y descendiendo tras alcanzar la madurez sexual a lo largo de la vida adulta. Aproximadamente, el 99% de los IGFs que circulan en la sangre lo hacen unidos a proteínas de transporte específicas, las IGFbps (proteínas transportadoras de IGFs). La más importante desde el punto de vista clínico es la IGFBP-3, que transporta un 75-90% de los IGFs circulantes [28]. El complejo IGF-IGFBP-3 se une en la sangre con otra proteína, la ALS (subunidad ácido-lábil), formando un complejo trimolecular (IGF-1-IGFBP-3-ALS) de alto peso molecular [29]. Proteasas circulantes (PAPP-A Y PAPP-2A: proteínas plasmáticas asociadas a la gestación A y A2: papalinas) rompen lentamente estos complejos y permiten la liberación de los IGFs y su salida a los tejidos [30]. Tanto la IGF-1 como la IGFBP-3 y la ALS son proteínas producidas en el hígado por estímulo directo de la GH y mantienen niveles séricos más o menos estables a lo largo del día. Se cree que los efectos de la activación del receptor de IGF están mediados por activación de tirosín quinasa y fosforilación de sustratos, que activan vías celulares específicas y conducen a diversas acciones biológicas. Se han descrito multitud de

entidades patológicas en relación con defectos de este sistema que cursan con hipocrecimiento.



**Figura 6:** Esquema del funcionamiento del eje somatotro. Se muestran las acciones directas de GH y las acciones endocrinas, paracrinas y autocrinas de IGFs. Adaptado de Argente y cols. [31]

- El exceso de glucocorticoides inhibe el crecimiento al ejercer un efecto negativo sobre la proliferación de condrocitos [20].
- 3- **Citoquinas inflamatorias:** Determinados factores como factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), interleuquina 1 (IL-1) e interleuquina 6 (IL-6) ejercen una acción inhibitoria directa sobre los condrocitos e indirecta a través de la supresión de IGF-1 [32]. Los niños con enfermedades inflamatorias sistémicas como la artritis idiopática juvenil o la enfermedad inflamatoria intestinal presentan compromiso del crecimiento. La malnutrición y el exceso de glucocorticoides actúan como elementos coadyuvantes.

### Factores intrínsecos:

**1- Factores de crecimiento paracrinos:** Diversos factores autocrinos/paracrinos son secretados por los condrocitos de la placa de crecimiento y ejercen acción local sobre otros condrocitos, orquestando el proceso de proliferación y diferenciación. Defectos genéticos en ellos o sus receptores, así como en otros genes implicados en la señalización pueden comprometer el crecimiento. Dependiendo del sistema afectado y la severidad de la anomalía genética se presentarán diversas condiciones clínicas. Se detallan a continuación algunos de estos factores reguladores del crecimiento en la placa <sup>[15]</sup>.

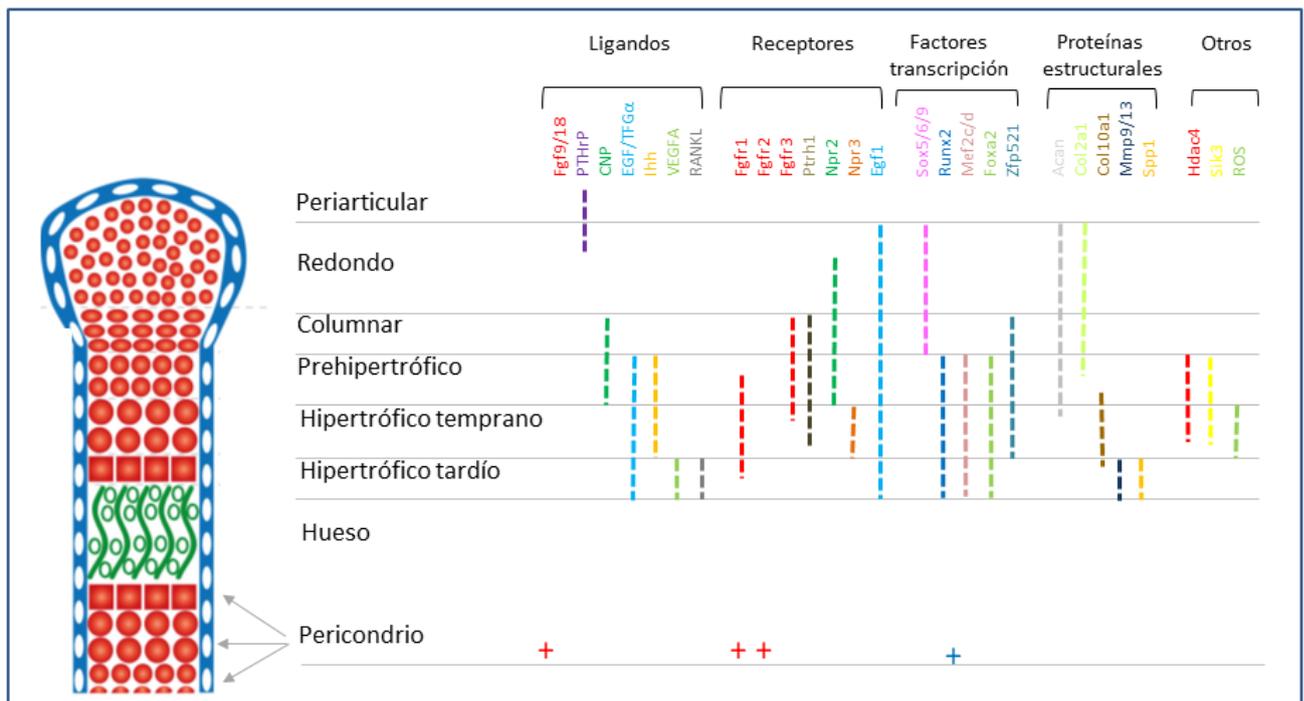
- **CNP (péptido natriurético C):** Denominado así por su semejanza estructural con los péptidos natriuréticos atrial (ANP) y cerebral (BNP). Actúa localmente estimulando la proliferación e hipertrofia de condrocitos <sup>[33]</sup>.
- **FGFR3 (receptor del factor de crecimiento fibroblástico-3):** Es uno de los ligandos de los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF9 y FGF18). Su activación ejerce una regulación negativa de la condrogénesis <sup>[13] [14]</sup>.
- **IGF-1 e IGF-2:** Su producción es principalmente hepática y su acción endocrina y estimuladora de hipertrofia y diferenciación. Existe no obstante una producción local de IGF-1 en la placa cuya importancia es aún poco clara. IGF-2 por su parte es un factor esencialmente paracrino con elevada expresión en tejidos fetales. El gen de IGF-2 está sometido a impronta y su expresión depende del alelo paterno <sup>[34]</sup>.
- **PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea):** PTHrP se expresa tanto en esqueleto fetal como postnatal. Actúa a través de receptor PTH1R (el mismo utilizado por la hormona paratiroidea -PTH-) y en parte a través de Gs- $\alpha$  previniendo la diferenciación de condrocitos hipertróficos hasta que alcanzan suficiente distancia de la fuente de PTHrP <sup>[35]</sup>.
- **IHH (Indian hedgehog):** Producido por condrocitos que acaban de comenzar la diferenciación hipertrófica. Es capaz de estimular la producción de PTHrP formando un asa de retroalimentación negativa <sup>[35]</sup>.
- **BMPs (proteínas morfogenéticas del hueso):** Constituyen una familia de ligandos implicados en el desarrollo y la homeostasis del esqueleto <sup>[36]</sup>.

**2- Matriz extracelular:** Es secretada por los condrocitos y tiene una función estructural, dando soporte al sistema esquelético frente a las fuerzas mecánicas a las que está sometido. Además, provee el medio interno necesario para el transporte y la acción de factores endocrinos y paracrinos. Se compone de colágenos (colágeno II y colágeno X), proteoglicanos (agrecano y

perlecano) y proteínas no colágenas (COMP: proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa [35] ) así como agua e iones.

**3- Procesos intracelulares esenciales** (señalización intracelular, regulación transcripcional, reparación de ADN (ácido desoxirribonucleico) y proliferación celular. Diversos factores de control intracelular intervienen en la condrogénesis. Entre ellos, cabe mencionar algunas moléculas como SHOX (*Short stature homeobox*), un factor de transcripción requerido en la función de la placa, o la vía RAS-MAPK, un sistema de señalización que regula la proliferación y diferenciación celular en distintos tejidos.

Cada etapa en la formación del esqueleto está garantizada por la acción y coordinación de elementos individuales, ya sean hormonas, factores paracrinos, componentes de la matriz, etc [33]. Cada uno de ellos tiene una función, un lugar de expresión y un tiempo de acción determinado y unas interacciones características [12] (la figura 7 representa la expresión génica regional en cartílago de crecimiento en un modelo de embrionario de ratón: E15.5-E16.5)



**Figura 7:** Resumen de la expresión génica en las distintas regiones del cartílago de crecimiento. Se muestra una representación esquemática de las distintas zonas de maduración del condrocito en ratones E15.5-16.5. Se expone la expresión de genes y/o proteínas. Adaptado de Kozhemyakina y cols. [33].



En el proceso de la condrogénesis, la interacción entre factores genéticos y ambientales <sup>[15]</sup> determina el crecimiento durante la infancia y la talla adulta. La llegada de las técnicas de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing* -NGS-) y con ella los estudios de asociación del genoma (*Genome-wide association Study* -GWAS-) han podido identificar numerosos *loci* con influencia en la talla adulta, encontrando asociaciones estadísticamente significativas entre talla adulta y polimorfismos <sup>[37]</sup>. Estos estudios han identificado variantes alélicas comunes (generalmente con una frecuencia alélica > 5%) capaces de explicar pequeñas fracciones de la variación fenotípica <sup>[38]</sup>. A su vez, variantes raras en regiones codificantes de genes descritos en entidades monogénicas, con frecuencia alélica ≤ 1%, han sido identificados como responsables de hasta 2 cm de altura por alelo <sup>[38]</sup>. Muchas de estas variantes, tanto las comunes como las raras, se encuentran en genes implicados en la condrogénesis o bien en genes asociados a trastornos sindrómicos. La talla, por consiguiente, constituye un rasgo poligénico que resulta de los efectos combinados de múltiples genes <sup>[39]</sup>.

A pesar de los avances en el conocimiento de los determinantes de la talla existen aún muchas dudas aún por despejar; entre ellos la cronobiología <sup>[40]</sup>. La declinación sufrida desde el nacimiento, los distintos “tempos” madurativos, el crecimiento de recuperación y el descenso de la tasa de crecimiento relacionada con la edad <sup>[41]</sup> (“senescencia de la placa”) parecen estar conducidas de forma primaria por mecanismos locales más que por factores sistémicos y reguladas por un programa genético dependiente de la edad y de muchos genes promotores del crecimiento <sup>[42]</sup>.

### 3. Talla baja

#### 3.1 Concepto y epidemiología

La talla baja es aquella por debajo de -2 desviaciones estándar (DE) para la edad, sexo y población de referencia. Al ser un rasgo genético e influenciado por el ritmo madurativo, debe analizarse en su contexto familiar y en función del patrón madurativo individual de cada sujeto <sup>[5]</sup>. La “normalidad” por tanto no puede establecerse sólo en relación con la normalidad estadística.

La talla diana (TD), también denominada talla genética, es la talla esperable para los hijos de una pareja determinada y se calcula a través de una fórmula estandarizada (talla padre + talla madre/2 ± 6.5 cm dependiendo de que el paciente sea hombre o mujer). El valor obtenido orienta hacia la talla esperable de un individuo dentro de un margen fijado en ± 5 cm. Es preciso correlacionar la talla de un niño comparando su “talla diana” (TD) con su expectativa de talla o predicción de talla adulta (PTA) <sup>[3]</sup>. El método más sencillo para predecir la talla adulta es utilizar la “talla proyectada”. Esta se calcula extrapolando la talla final que alcanzará el niño a partir del carril de crecimiento en el que se encuentra y siguiéndolo hasta los 18-20 años. Si la edad ósea (EO) está retrasada o adelantada, es preferible

extrapolar la talla final a partir del carril que se corresponde con su EO y no cronológica. Otros métodos de predicción de talla adulta (PTA) tiene en cuenta la TD y la EO. La fiabilidad es relativamente escasa y tanto menor cuanto menor es la edad del niño <sup>[5]</sup>, sobre todo si existe patología que hace que el ritmo de maduración no sea previsible.

Además, el crecimiento es un proceso dinámico y la talla es un parámetro estático; por tanto la observación en un momento dado de una talla “normal” no excluye la posibilidad de que se esté produciendo un fracaso de crecimiento <sup>[20]</sup>. Los criterios utilizados en la práctica clínica para establecer cuando un niño debe ser estudiado por un problema de hipocrecimiento son <sup>[3]</sup> :

- Talla < -2 DE para la edad, sexo y etnia del sujeto.
- Talla que, aun estando entre  $\pm 2$  DE para la población general, se sitúa > 2 DE por debajo del carril de crecimiento correspondiente a su talla diana (TD).
- Expectativa de talla adulta (predicción de talla adulta) >2 DE por debajo de la talla diana.
- VC < -1 DE ( $\approx$  percentil 25) para edad y sexo, mantenida más de 2-3 años.

Si consideramos aisladamente el concepto estadístico de talla baja, como una talla por debajo de -2 DE para su edad, sexo y etnia, el 2,3% de la población entraría en el concepto de hipocrecimiento. Por el contrario la incidencia y prevalencia son difíciles de establecer <sup>[43]</sup>. El número de sujetos que se miden en los estudios poblacionales es insuficiente para determinar con fiabilidad los extremos de la curva de Gauss que representa la distribución de la talla y, si consideramos además las otras posibles definiciones de hipocrecimiento citadas, es muy probable que el número de niños con hipocrecimiento sea superior al 3-5% <sup>[4]</sup>.

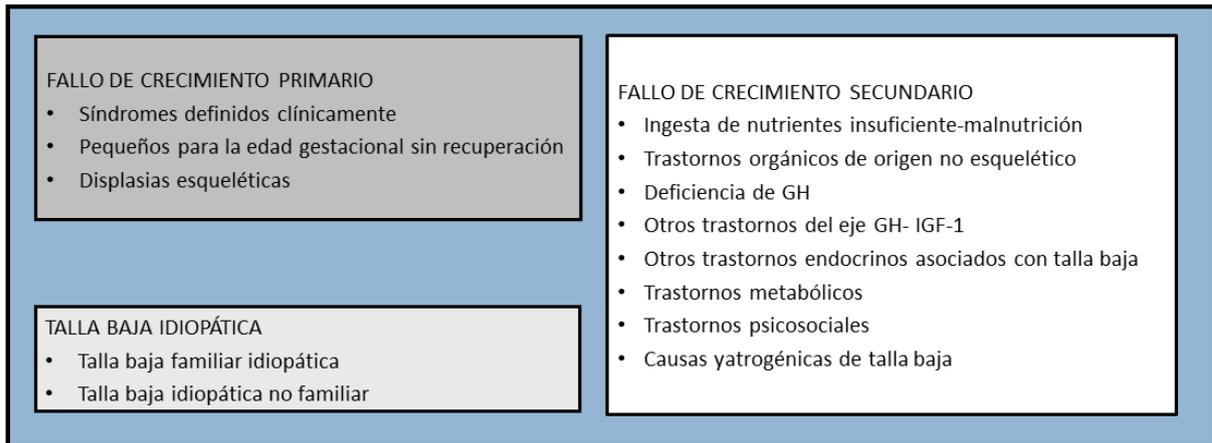
Las gráficas de crecimiento reproducen el crecimiento normal y son una herramienta útil y estandarizada en la evaluación, siendo recomendado utilizar gráficas locales, sobre todo aquellos estudios longitudinales donde la velocidad de crecimiento puede ser analizada <sup>[43]</sup> .

### 3.2 Clasificación de la talla baja

La clasificación de la talla baja no es uniforme y varía entre los distintos autores. Existen distintas formas de clasificar a los pacientes según el punto de partida escogido, encontrando algunas clasificaciones que ponen el foco en la etiopatogenia (conocida o desconocida), otras en el origen prenatal o postnatal, en la presencia o ausencia de desproporción corporal o en la concurrencia de rasgos sindrómicos <sup>[5]</sup> <sup>[43]</sup> <sup>[44]</sup>. La existencia de varias clasificaciones indica la validez de las distintas aproximaciones. En cualquier caso la clasificación está sometida a cambios continuos debido al avance de la genética <sup>[45]</sup> <sup>[46]</sup>.

Un consorcio formado por sociedades de endocrinología pediátrica propone la Clasificación Internacional de Diagnósticos en Endocrinología Pediátrica (ICPED: *International Classification of*

*Pediatric Endocrine Diagnoses*, (<http://www.icped.org/>), con el objetivo de crear una clasificación global, con terminología consistente y que facilite los esfuerzos colaborativos de investigación. Con respecto a la talla baja se distinguen tres grupos: talla baja de origen primario (causada por factores intrínsecos a la placa), talla baja de origen secundario (en relación con factores extrínsecos) y talla baja idiopática (TBI) (representado en figura 8). Cada uno de ellos cuenta con subgrupos <sup>[20]</sup> <sup>[44]</sup>. Esta clasificación no hace referencia al origen genético/no genético, así como tampoco al inicio pre o postnatal ni a las proporciones corporales.



**Figura 8:** Clasificación de talla baja propuesta por *International Classification of Pediatric Endocrine Diagnose* (ICPED)

### 3.2.1 Talla baja de origen primario

Este grupo reúne todas aquellas entidades derivadas de trastornos que alterarían la capacidad de crecimiento intrínseca del hueso y en ocasiones también la de otros tejidos, como sucede en los síndromes congénitos. Reflejan múltiples mecanismos de deterioro del crecimiento, muchos de los cuales no están completamente aclarados <sup>[20]</sup>. Se distinguen tres grandes subgrupos:

- **Síndromes definidos clínicamente:** Incluye cromosopatías (síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Prader Willi, trisomía 18), síndromes genéticos que cursan con talla baja y dismorfia facial (Silver-Russell, Cornelia de Lange, Noonan), así como síndromes congénitos que asocian talla baja pero no como síntoma cardinal (síndrome de Potter y cardiopatías congénitas, entre otros).
- **Pequeños para la edad gestacional sin recuperación.** Reúne aquellos niños cuyo peso y/o longitud para su edad gestacional de sitúa por debajo de -2 DE y mantienen una talla por debajo de -2DE entre los 2 y los 3 años.

- **Causas fetales:** Alteración congénita de los mecanismos reguladores (deficiencia de IGF-1 y la resistencia a IGF-1).
- **Causas uterino-placentarias:** Malformaciones uterinas o del cordón (arteria umbilical única, hemangiomas o infartos placentarios, etc), implantación placentaria anómala (placenta previa, *abruptio placentae*, etc).
- **Causas maternas:** Infecciones congénitas, hijos de madres malnutridas, consumidoras de tóxicos (drogas, alcohol, tabaco).
- **Causas desconocidas.**
- **Displasias esqueléticas.** Grupo amplio y variable de entidades genéticas cuyo denominador común es la desorganización del tejido esquelético (ver epígrafe 4 de la introducción).

### 3.2.2. Talla baja de origen secundario

Este subgrupo reúne a entidades patológicas que afectan a los mecanismos reguladores extrínsecos a la placa de crecimiento. En él se incluyen enfermedades que puedan condicionar el crecimiento normal como consecuencia de alteraciones en el estado nutricional o en la regulación hormonal así como los que ocasionen inflamación o afecten al fluido extracelular <sup>[5] [20] [44] [45] [48]</sup>. Entre ellos encontramos:

- Ingesta de nutrientes insuficiente: Malnutrición.
- Trastornos orgánicos de origen no esquelético (cardiopatías, neumopatías, trastornos hepáticos, trastornos gastrointestinales, enfermedades hematológicas, etc).
- Deficiencia de GH.
- Otros trastornos del eje GH- IGF-1.
- Otros trastornos endocrinos asociados con talla baja (hipotiroidismo, exceso de glucocorticoides, exceso de esteroides sexuales, retraso puberal).
- Trastornos metabólicos.
- Trastornos psicosociales (deprivación psicosocial, anorexia nerviosa, depresión).
- Causas yatrogénicas de talla baja: tratamiento corticoideo, tratamiento quimioterápico, tratamiento con radioterapia (la radioterapia espinal ocasiona talla baja desproporcionada adquirida).

La malnutrición y las enfermedades crónicas no esqueléticas comparten una fisiopatología común. La clínica dominante será la propia de la enfermedad de base y el retraso de crecimiento suele venir precedido de un retraso ponderal; ambos se relacionan con una malnutrición (cualitativa y/o cuantitativa por falta de aportes), el aumento de pérdidas o la demanda incrementada. El fracaso de crecimiento se suele acompañar de un retraso en la EO y la pubertad, siendo de especial importancia

las alteraciones en el eje GH- IGFs (resistencia a la GH, con niveles séricos normales o elevados de GH y disminuidos de IGF-1 y de IGFBP-3). Cuanto más precoz, grave y prolongada sea la entidad primaria, menos posibilidades hay de que pueda recuperarse completamente <sup>[5]</sup>.

En el caso de las enfermedades que cursan con inflamación crónica (artritis idiopática juvenil, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis quística) el mecanismo por el cual se produce el retraso del crecimiento es múltiple. Las citoquinas proinflamatorias inhiben la condrogénesis a lo que se suma el papel de la malnutrición y el tratamiento corticoideo prolongado <sup>[20]</sup>.

### 3.2.2.1 Deficiencia de GH y otros trastornos del eje GH-IGF-1.

Los retrasos de crecimiento de origen endocrinológico representan un porcentaje muy bajo de las causas de talla baja, alrededor del 5%, siendo las alteraciones del eje somatotropo las más frecuentes. La deficiencia de GH es la más común y afecta de forma global al 1-2% de los niños con talla baja. Su incidencia oscila entre 1:3.500-1:10.000 recién nacidos vivos. Puede presentarse de forma aislada o asociado a otras deficiencias hipofisarias (deficiencia combinada de hormonas hipofisarias), y puede ser congénita (por alteraciones genéticas, malformaciones de línea media o defectos cerebrales estructurales...) o adquirida (tumores, traumatismos, histiocitosis, infecciones, radioterapia, etc) <sup>[5]</sup>. En la mayoría de los casos, el déficit de GH aislado es idiopático y sólo en aproximadamente un 20% de los casos es posible identificar una causa orgánica responsable <sup>[20]</sup>.

En el déficit aislado de GH la manifestación clínica más característica es el fracaso de crecimiento de inicio postnatal, acompañado de una marcada disminución de la VC y de retraso en la EO. Desde el punto de vista bioquímico la secreción espontánea de GH y/o la respuesta de GH a las diferentes pruebas de estimulación están disminuidas, al igual que los niveles séricos de IGF-1 e IGFBP-3. En las deficiencias combinadas se sumará la clínica característica de la posible hiposecreción de TSH (hormona estimulante del tiroides), prolactina, LH (hormona luteinizante), FSH (hormona folículo estimulante) y/o ACTH (hormona adrenocorticotropa), siendo característico el inicio en la primera infancia.

En el resto de los trastornos del eje GH-IGF-1 el inicio de la clínica, la severidad y la sintomatología acompañante es variable según el nivel de la anomalía. Hoy se entienden estas alteraciones como un *continuum* en el que en los extremos se encuentran la deficiencia de GH y la insensibilidad a la GH, con un fenotipo clínico y bioquímico fácil de identificar y, entre ellos, multitud de casos más leves, con fenotipos clínicos, bioquímicos y genéticos peor definidos y que incluso pueden solaparse con los de la TBI <sup>[48]</sup>.

Las principales alteraciones genéticas descritas que afectan al eje somatotropo y sus rasgos <sup>[24]</sup> <sup>[49]</sup> se resumen de forma esquemática en la tabla 1.

Tabla 1: Alteraciones genéticas descritas en torno al eje somatotropo y sus rasgos

TIPO	HERENCIA	GEN	FENOTIPO
<b>DEFICIENCIA AISLADA</b>			
<b>IA</b>	AR	<i>GH1</i> <sup>[50]</sup>	Fenotipo severo. GH indetectable. Mala respuesta a GH exógena por anticuerpos anti GH.
<b>IB</b>	AR	<i>GH1</i> <sup>[51]</sup>	Fenotipo menos acusado que el IA. GH baja pero detectable. Buena respuesta a GH exógena.
<b>II</b>	AD	<i>GH1</i> <sup>[52]</sup>	Hipocrecimiento menos severo Buena respuesta a GH exógena.
<b>III</b>	XLR	<i>BTK</i> <sup>[53]</sup>	Hipocrecimiento con hipogammaglobulinemia.
<b>IV</b>	AR	<i>GHRHR</i> <sup>[53]</sup>	Niveles bajos GH.
<b>V</b>	AR	<i>RNPC3</i> <sup>[54]</sup>	Fenotipo severo. Asocia hipoplasia hipófisis anterior.
<b>GH biológicamente inactiva (síndrome de Kowarski)</b>	AR	<i>GH1</i> <sup>[55]</sup>	Niveles elevados de GH, concentraciones bajas IGF-1, IGFBP-3 y ALS. Buena respuesta a GH exógena.
<b>DEFICIENCIA COMBINADA HORMONAS HIPOFISARIAS</b>			
<b>Deficiencias hipofisarias múltiples</b>	AD/AR	<i>HESX1, LHX3, LHX4, POU1F1, PROP1, etc</i> <sup>[56] [57]</sup>	Deficiencia de GH y otras deficiencias hormonales (TSH, prolactina, LH, FSH y/o ACTH). Posible hipoplasia hipofisaria, defectos silla turca y otras malformaciones.
<b>ANOMALÍAS EJE PERIFÉRICO</b>			
<b>Insensibilidad GH (síndrome de Laron)</b>	AR	<i>GHR</i> <sup>[58]</sup>	Talla baja severa postnatal, adiposidad troncal, hipoglucemia e hipoplasia medio facial. Niveles elevados de GH en rango de acromegalia.
<b>Defectos señalización GHR</b>	AR	<i>STAT5B</i> <sup>[59]</sup>	Insensibilidad primaria por defectos post-receptor e inmunodeficiencia.
<b>Deficiencia primaria IGF-1</b>	AR	<i>IGF1</i> <sup>[60]</sup>	Talla baja origen primario Restricción crecimiento de origen prenatal, microcefalia y sordera.
<b>Deficiencia primaria de IGF-2</b>	AD	<i>IGF2</i> transmisión paterna <sup>[61]</sup>	Talla baja origen primario Restricción crecimiento de origen prenatal y fenotipo síndrome de Silver Russell-like.
<b>Deficiencia primaria de IGFBP-3</b>	AR	<i>IGFBP3</i> <sup>[29]</sup>	Talla baja moderada postnatal (-2/-3 DE), retraso puberal en varones e insensibilidad a la insulina. Concentraciones muy bajas de IGF-1 e IGFBP-3.
<b>Resistencia o insensibilidad a IGF-1</b>	AD, AR	<i>IGF1R</i> <sup>[60]</sup>	Talla baja de origen primario. Crecimiento intrauterino retardado e hipocrecimiento postnatal.
<b>Deficiencia primaria de PAPP-A2</b>	AR	<i>PAPP-A2</i> <sup>[62]</sup>	Talla baja leve-moderada, anomalías esqueléticas y niveles circulantes elevados de IGF-1, IGFBP-3, IGFBP-5 y ALS.

### 3.2.3. Talla baja idiopática

Se define por consenso como aquella talla <-2DE para su edad, sexo y población de referencia sin hallazgos de enfermedad tras una completa evaluación por endocrinólogo pediatra que incluya niveles de GH tras test de estímulo <sup>[63]</sup> <sup>[64]</sup>. Se estima que entre el 60-80% de los niños con talla baja se ajustan a esta definición.

Esta definición incluye a los pacientes con talla baja familiar (TBF) y retraso constitucional del crecimiento y desarrollo (RCCD); pero excluye a todos aquellos niños en principio sanos con rasgos dismórficos, pequeños para la edad gestacional (PEG) o con desproporción corporal. Es por tanto un diagnóstico de exclusión tras haber descartado causas primarias y secundarias conocidas.

El término TBF hace referencia a individuos con talla baja, por otro lado sanos, que maduran a un ritmo normal y cuyos progenitores tienen talla baja. Por su parte, los pacientes con RCCD serían sujetos sanos que, como consecuencia de un ritmo de maduración más lento que la media de la población (60% tienen antecedentes familiares de maduración tardía), presentan durante la infancia talla baja inadecuada para su contexto familiar, retraso de la EO e inicio puberal tardío (2-3 años después que la media) y alcanzan la talla adulta a una edad superior a la media de la población. En ambas situaciones, la talla final es acorde con el contexto familiar <sup>[5]</sup>. Se tiende a clasificar a los pacientes según existan o no antecedentes de talla baja familiar y/o antecedentes familiares de retraso constitucional del crecimiento y desarrollo. En general, a menos que presenten signos o síntomas de otra enfermedad subyacente durante el seguimiento, estos niños sólo requieren observación y controles de EO.

Se especula que las causas de esta condrogénesis reducida sean las mismas que las de otros niños con talla baja de causa primaria o secundaria conocida. Es decir, causas endocrinas, como defectos en GH o IGF-1 sutiles y difíciles de diagnosticar con las rutinas diagnósticas, así como formas leves de displasias esqueléticas o síndromes dismórficos de difícil reconocimiento <sup>[65]</sup> <sup>[20]</sup>. También se especula que puedan estar causadas por alteraciones genéticas cuyo efecto en la condrogénesis sea aún desconocido <sup>[64]</sup> <sup>[66]</sup> <sup>[67]</sup> <sup>[68]</sup>. Algunos casos de TBI parecen tener una herencia poligénica; estos pacientes presumiblemente tendrían múltiples variantes heredadas, cada una de las cuales tendría un efecto negativo sobre el crecimiento lineal. Algunas de ellas pueden ser polimorfismos comunes como ya se ha podido identificar en GWAS <sup>[24]</sup> <sup>[67]</sup>.

Así pues, la TBI recoge un grupo heterogéneo de pacientes sin diagnóstico que incluye tanto situaciones normales como patológicas, y cuyo único denominador común es nuestra incapacidad para alcanzar un diagnóstico etiopatogénico.

## 4. Displasias esqueléticas

Representan un grupo muy amplio y heterogéneo de enfermedades genéticas caracterizadas por la organización anormal del tejido óseo y cartilaginoso, perteneciendo a las tallas bajas de origen primario [20]. Clásicamente se han englobado en el grupo de las tallas bajas desproporcionadas o disarmónicas; si bien la desproporción corporal es uno de los signos clave para sospecharlas, no siempre está presente [69].

La clasificación actual de 2019 de las displasias esqueléticas recoge 461 entidades agrupadas en 42 grupos en base a criterios clínicos, radiológicos o moleculares. Se conoce la base genética de 425 de estas enfermedades (92%) gracias a la descripción de variantes patogénicas en 437 genes diferentes [70].

Son entidades infrecuentes, aunque colectivamente integran un grupo significativo (2-5:10.000 recién nacidos) que afecta de forma primaria a la formación, crecimiento y/o homeostasis de hueso y cartílago, siendo su espectro clínico-radiológico muy amplio [71]. Su gravedad, morbilidad y pronóstico es muy variable. Incluyen entidades con implicación esquelética significativa, enfermedades óseas metabólicas, disostosis, malformaciones de uno o más huesos y síndromes de reducción. Pueden manifestarse con talla baja (con o sin desproporción corporal), sobrecrecimiento, deformidad corporal, dismorfia facial, dolor, limitación articular, fragilidad o trastornos en la función metabólica del hueso [71], pudiendo variar su expresividad clínica a lo largo del tiempo.

Las displasias esqueléticas que cursan con talla baja son múltiples y se caracterizan por una gran heterogeneidad tanto clínica como radiológica y molecular. El momento de presentación, la severidad de la talla baja, la gravedad de la desproporción y las deformidades y las manifestaciones extraesqueléticas son muy variadas. Distinguimos dos grupos atendiendo al momento de aparición del hipocrecimiento [72] [73] [74] :

- **Displasias esqueléticas con expresión prenatal:** El hipocrecimiento aparece en la etapa fetal y es evidente al nacimiento. De ellas la más frecuente es la acondroplasia. Otras entidades son: displasia diastrófica, displasia metatrópica, condrodisplasia punctata, ciliopatías y displasia espondiloepifisaria. A este subgrupo pertenecen también las displasias letales (displasia tanatofórica, acondrogénesis, displasias platiespondílicas, etc). Todas ellas tienen rasgos reconocibles al nacimiento.
- **Displasias esqueléticas con expresión postnatal:** La alteración del crecimiento y los rasgos característicos aparecen durante la infancia y adolescencia. Es un grupo numeroso y heterogéneo. A él pertenecen, entre otras, diversos grupos de entidades como: displasias epifisarias, displasias metafisarias, displasias espondilometafisarias, platiespondilia, displasias acromélicas, displasias rizomélicas, displasias mesomélicas, etc.

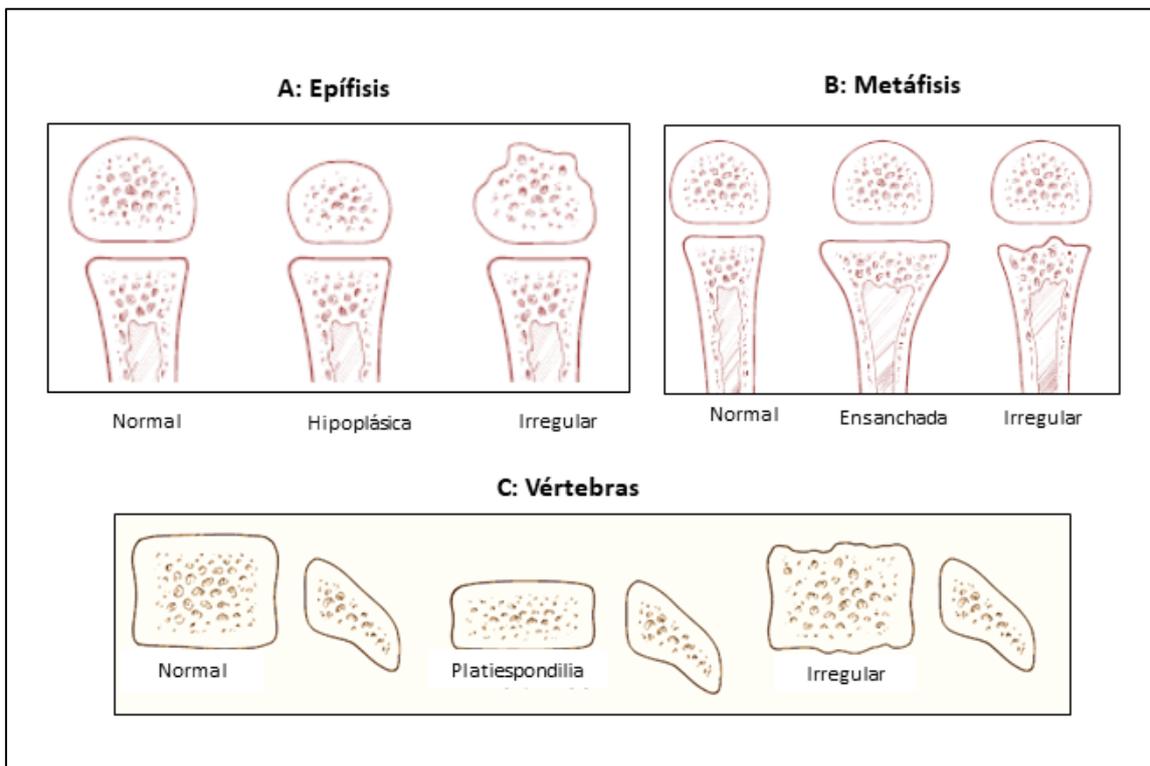


El diagnóstico de las displasias esqueléticas está basado en primer lugar en la historia clínica y la exploración <sup>[75]</sup> <sup>[76]</sup>. Los principales puntos de interés, destinados a recoger síntomas y signos clave son los siguientes:

1. Historia general pediátrica, con datos de embarazo y parto, y antropometría neonatal.
2. Anamnesis sistema esquelético: Preguntar por síntomas esqueléticos, su momento de aparición y progresión (dolor, rigidez, debilidad, talla baja, etc).
3. Árbol genealógico (al menos 3 generaciones). Se deben recoger los datos clínicos de interés según la entidad sospechada: consanguinidad, origen geográfico, antropometría (talla, desproporción), antecedentes ortopédicos (fracturas, artrosis precoz, dolor), detalles del fenotipo (tamaño de manos, número de pie).
4. Examen general pediátrico (incluyendo ojos, dientes, pelo...) para documentar posibles dismorfias y rasgos particulares.
5. Antropometría básica (peso, talla y perímetro cefálico) y elaboración de una curva de crecimiento.
6. Proporciones corporales: Talla sentado (Ts) y envergadura. Otros segmentos corporales (mano, antebrazo, brazo, etc).
7. Rasgos esqueléticos: Examen externo del esqueleto.
  - a. Aspecto general: longilíneo, musculoso, etc.
  - b. Desviaciones de la columna en cualquier plano (escoliosis, lordosis, cifosis).
  - c. Aspecto del tórax (estrecho, corto, acampanado...).
  - d. Dismetría de extremidades.
  - e. Deformidades: genu valgo/varo, pies zambos, tumoraciones palpables.
  - f. Acortamiento de segmentos: Acortamiento rizomélico (extremo proximal de los miembros), mesomélico (segmento medio) o acromélico (distal) o bien acortamiento del tronco
  - g. Examen externo de las manos: Número de dedos, tamaño y forma (braquidactilia)
  - h. Forma del cráneo
  - i. Contracturas, hiperlaxitud, rango de movimiento

Tras la historia clínica se solicitarán los estudios radiológicos, siendo la figura del radiólogo con experiencia es displasias clave en su interpretación. En el abordaje inicial y según consenso de expertos deben practicarse hemiesqueleto en el recién nacido y serie ósea en el niño. Esta debe incluir radiografías de cráneo anteroposterior y lateral, tórax, pelvis, rodillas, dorsolumbar lateral y manos <sup>[77]</sup> <sup>[78]</sup> <sup>[73]</sup>. Según los hallazgos y la sospecha diagnóstica se realizarán otros estudios de forma dirigida (radiografías de regiones concretas, radiografías dinámicas, tomografía axial computarizada, resonancia magnética, etc) <sup>[79]</sup>. Los datos principales que se deben extraer de la serie ósea son <sup>[73]</sup>:

- Tamaño y número de los huesos.
- Forma de los huesos. En la figura 9 se muestra una representación sencilla de la posible afectación por segmentos dependiendo de los hallazgos:
  - ✓ Epífisis: Pequeñas, retrasadas y/o irregulares en displasias con afectación epifisaria.
  - ✓ Metáfisis: Irregulares, ensanchadas, desfleadas en aquellas con afectación metafisaria.
  - ✓ Diáfisis: Ensanchadas, aumento cortical, expansión medular si existe afectación diafisaria.
  - ✓ Vertebral: Platiespondilia, vértebras irregulares en afectación espondilar.
- Densidad ósea.
- Existencia o no de fracturas.
- Grado de maduración (edad ósea, presencia de núcleos de osificación), teniendo en cuenta la distorsión de su valoración en los casos de displasias esqueléticas con afectación severa.
- Desviaciones, disimetrías, tumoraciones, huesos supernumerarios, dislocaciones, etc.



**Figura 9:** A: Representación esquemática de una epífisis normal seguida de distintos patrones de afectación epifisaria: epífisis pequeña o hipoplásica y epífisis de morfología irregular. B: Representación de una metáfisis normal seguida de patrones de afectación metafisaria, metáfisis ensanchada y metáfisis irregular. C: Representación de una vértebra normal seguida de patrones de afectación espondilar: vértebra aplanada (platiespondilia) y vértebra irregular. Adaptado de Alanay y Lachman [73].

Tras la evaluación clínica y radiológica se podrá adjudicar un diagnóstico preliminar al paciente, o bien asignarlo a uno o más subgrupos de la clasificación. De esta manera se orientarán el resto de pruebas requeridas, ya sean de imagen (radiografías simples de zonas concretas, resonancia magnética) o exploraciones por otros especialistas (oftalmología, otorrinolaringología, entre otros), así como los estudios moleculares <sup>[76]</sup>. Estos ocupan un lugar principal en el diagnóstico gracias al desarrollo de la NGS <sup>[70]</sup>.

El seguimiento de estos pacientes es complejo y llevado a cabo por equipos multidisciplinares donde, el endocrinólogo pediátrico, el genetista clínico y el ortopeda serán en la mayoría de los centros quienes coordinen la atención de estos pacientes, pudiendo requerir de cardiólogos, neumólogos, neonatólogos, oftalmólogos, rehabilitadores, etc <sup>[76]</sup>.

#### 4.1. Haploinsuficiencia o ausencia de *SHOX*

En 1997 se publica por primera vez el hallazgo de un locus implicado en el crecimiento lineal en la región pseudoautosómica 1 (PAR1) de los cromosomas sexuales, X e Y. El grupo de Rao describe deleciones en esta región en 36 individuos afectados de talla baja idiopática y diferentes reordenamientos en Xp22 e Yp11.3 <sup>[80]</sup>. Se identifica de esta manera al gen *SHOX* como causante del hipocrecimiento en individuos con TBI y síndrome de Turner. La monosomía del cromosoma X en pacientes con síndrome de Turner implica haploinsuficiencia de *SHOX* y explica parcialmente la talla baja y algunos de los rasgos esqueléticos que se observan en estas pacientes (cúbito valgo e incurvación y acortamiento de antebrazos y parte distal de las piernas). Los genes localizados en PAR1 escapan a la inactivación del X por lo que tanto en hombres como en mujeres se expresan dos copias de *SHOX*. Además tras realizar un rastreo de variantes puntuales en 91 pacientes con TBI se encontró un individuo con una variante sin sentido que cosegregaba con el fenotipo <sup>[80]</sup>. En 1998 dos grupos describen de forma simultánea <sup>[81]</sup> <sup>[82]</sup> deleciones y variantes en heterocigosis en *SHOX* en pacientes con una displasia esquelética conocida, la discondrosteosis de Léri-Weill (DLW, MIM: 127300) y demuestran cómo variantes en homocigosis en este gen son responsables de una displasia severa, la displasia mesomélica de Langer (DML, MIM: 249700).

El hallazgo de la deficiencia de *SHOX* marca un hito al ser responsable de la talla baja en cuatro entidades que se definen como un *continuum*: en el extremo más severo se sitúa la DML, en el intermedio DLW y las manifestaciones esqueléticas del síndrome de Turner <sup>[83]</sup> y, en el más leve algunas formas de TBI; entre ambos un conjunto de pacientes con grados variables de desproporción y/o signos esqueléticos inespecíficos.

La displasia mesomélica de Langer (DML) se presenta al nacimiento con grave acortamiento de los huesos largos de las extremidades (que involucran los segmentos medio y proximal),

malformación de la cabeza humeral, angulación de la diáfisis radial, deformidad del carpo, cuello femoral corto y ausencia o hipoplasia de la mitad proximal del peroné. Cursa por tanto con talla baja severa (-5.9/-8.9 DE) <sup>[84]</sup>. En algunos casos, se ha descrito una leve hipoplasia mandibular. A diferencia de la DLW, la deformidad de Madelung no suele estar presente en la DML <sup>[69]</sup>.

La DLW se caracteriza por una triada característica <sup>[85]</sup>:

- Talla baja por debajo de -2 DE para la población de referencia, aunque la severidad es variable y existen casos con talla en rango normal, hasta + 0.6 DE <sup>[86]</sup> <sup>[87]</sup>. La media de talla en adultos es de -2.2 DE.
- Mesomelia: Acortamiento de la porción media de las extremidades. Esta desproporción puede objetivarse a través de dos ratios: ratio extremidades/tronco <sup>[88]</sup> y ratio talla sentado/talla <sup>[89]</sup>. La mesomelia puede estar ya presente en la edad escolar, aunque su frecuencia y severidad aumenta con la edad.
- Deformidad de Madelung a nivel de la muñeca. Está causada por un alineamiento anormal de radio, cúbito y huesos del carpo que provoca una subluxación dorsal espontánea del cúbito distal, y resulta en una apariencia externa de la muñeca “en dorso de tenedor” <sup>[90]</sup>. La deformidad de Madelung incluye los siguientes criterios radiológicos <sup>[91]</sup>: a) A nivel radial: Triangulación de la epífisis distal, fusión precoz de la mitad cubital de la epífisis distal, radiolucencia en extremo distal cubital y acortamiento e incurvación dorsal y cubital; b) A nivel de los huesos del carpo: Piramidalización tomando aspecto de “V” y c) A nivel cubital: Acortamiento, subluxación dorsal y triangulación de la epífisis. Se desarrolla típicamente durante la infancia media-tardía y es más común y severa en mujeres, habiéndose hipotetizado que los estrógenos pudieran jugar un papel <sup>[85]</sup>. En la figura 10 se pueden observar los rasgos clínicos y radiológicos característicos de la deformidad Madelung.



**Figura 10:** A: Paciente adulto con deformidad de Madelung (aspecto del antebrazo en dorso de tenedor) y mesomelia. B: Radiografía de la muñeca de mujer de 15 años afecta de deficiencia de *SHOX* con hallazgos típicos de la deformidad de Madelung, la triangulación de la epífisis distal del radio, incurvación y piramidalización de los huesos del carpo.

Además de la triada existen una serie de signos menores también característicos: hipertrofia de gemelos, 4º metacarpiano corto, desviación cubital, paladar ojival, escoliosis e incremento del índice de masa corporal (IMC) no originado por exceso de grasa <sup>[92]</sup> <sup>[93]</sup> <sup>[94]</sup>. No obstante, existe gran heterogeneidad clínica y el fenotipo es altamente variable, incluso entre individuos de una misma familia. Por otro lado, no todos los pacientes con deficiencia de *SHOX* presentan mesomelia y deformidad de Madelung. A estos pacientes sin los rasgos característicos, pero con alteración identificada en *SHOX*, se los denomina TB por deficiencia de *SHOX*. Los pacientes en edad pediátrica pueden desarrollar las rasgos propios de la DLW, o alguno de los signos menores, más adelante <sup>[92]</sup> <sup>[93]</sup> <sup>[94]</sup>. Otros, sin embargo, no presentarán características fenotípicas distintivas.

Se han desarrollado varios sistemas de puntuación para orientar la decisión de solicitar el estudio molecular de *SHOX* con el fin de optimizar la selección de pacientes que no presentan las manifestaciones clínicas características de la DLW. El más utilizado, descrito por Rappold y cols. en 2007 <sup>[93]</sup>, consiste en un sistema de puntuación que asigna una puntuación determinada a cada uno de los siguientes rasgos: desproporción corporal [ratio envergadura/talla <96.5%, ratio talla sentado/talla (Ts/T) > 55.5%], IMC >P50, presencia de cúbito valgo, acortamiento e incurvación del antebrazo, aspecto de hipertrofia muscular y dislocación cubital. Una puntuación de 7 (de un total de 24) predice una tasa de resultado positivo del 19%. Existe otro sistema de puntuación descrito por Binder y cols. en 2011 <sup>[88]</sup> que establece un algoritmo basado en criterios clínicos, auxológicos y radiológicos. Este sistema incluye anomalías menores como acortamiento 4º y 5º metacarpianos, paladar ojival, incremento angulación del codo, escoliosis y micrognatia.

*SHOX* pertenece a la familia de genes homeobox que codifican factores de transcripción que contienen un dominio de unión al ADN denominado homeodominio y es requerido para el desarrollo normal de las extremidades y la función de la placa de crecimiento. La función exacta de *SHOX* es aún desconocida. No obstante, los estudios de expresión in vitro indican que induce la detención del ciclo celular y la apoptosis y, sugieren además, que la proteína puede controlar también la proliferación de condrocitos en la placa de crecimiento y promover su maduración <sup>[95]</sup>. En embriones humanos se ha visto expresión de *SHOX* en la porción media de los miembros (codos y rodillas) y también en el extremo distal de cúbito y radio y muñeca. Este patrón de expresión aclara la aparición de la mesomelia en la DLW <sup>[77]</sup>. Además, *SHOX* actúa como modulador de la expresión de otros genes como *NPPB*, *FGFR3*, *CTGF*, *BMP4*, *RUNX2* o *ACAN*. Al interactuar con otras vías de señalización se ve implicado en el desarrollo y la homeostasis del esqueleto, también de forma indirecta <sup>[96] [97] [98] [99] [100] [101]</sup>. En la figura 11 se muestra la implicación de *SHOX* en alguna de las vías de control de la osificación endocondral.



expresión casi mutuamente excluyentes en extremidades de embriones de pollo <sup>[103]</sup>. Así, la expresión de *SHOX* en los segmentos óseos mesoméricos bloquea la expresión del mutante *FGFR3* pero puede permitir el desarrollo normal de estos huesos, mientras que la falta de *SHOX* en la porción rizomélica, al permitir la expresión del mutante *FGFR3*, puede explicar el fenotipo rizomélico <sup>[107]</sup>.

La expresión de *SHOX* es compleja <sup>[84]</sup> y en ella intervienen dos promotores alternativos <sup>[108]</sup>, dos exones alternativos (exón 6a y 6b) <sup>[80]</sup> y secuencias cis-reguladoras (potenciadores o “*enhancers*”) situadas aguas arriba y abajo del gen <sup>[98] [109] [110]</sup>.

Se estima que las deleciones y variantes en *SHOX* y sus regiones reguladoras son responsables de aproximadamente el 70% de los casos de DLW <sup>[85]</sup> y aprox. 2.5% de los pacientes con TBI <sup>[84]</sup>. La prevalencia global estimada de deficiencia de *SHOX* es entre 1:1000-2000, siendo la causa más frecuente conocida de talla baja monogénica.

El diagnóstico de deficiencia de *SHOX* se lleva a cabo en general por la técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*-amplificación de sondas tras ligación múltiple) y secuenciación posterior y están descritos los siguientes tipos de alteraciones <sup>[84] [85]</sup>:

- Deleciones de distinto tamaño que incluyen uno o múltiples exones, el gen *SHOX* completo o sus regiones reguladoras (70% individuos afectados) <sup>[102] [109] [111] [112] [113]</sup>.
- Variantes sin sentido, con cambio de sentido o inserciones/deleciones (30% de los casos). Aparecen con mayor frecuencia en los exones 3 y 4 ya que codifican el homeodominio, elemento clave en la unión al ADN, la dimerización, la interacción con sus cofactores *SOX5* y *SOX6*, y/o traslocación nuclear <sup>[81] [102] [114] [115] [116]</sup>.
- Duplicaciones completas o parciales del gen. Se postula que podrían reducir expresión del mismo y ser responsables del fenotipo, aunque su patogenicidad no ha sido claramente establecida <sup>[117]</sup>.

Además, no se han establecido correlaciones entre la severidad del fenotipo y la variante patogénica <sup>[71] [86]</sup>; una misma variante patogénica puede ocasionar DLW, talla baja sin alteraciones esqueléticas y talla dentro de la normalidad en individuos de una misma familia <sup>[118]</sup>.

Las variantes patogénicas de *SHOX* pueden estar presentes tanto en el cromosoma X como en el Y. Así los hijos de los individuos afectados de DLW y talla baja por deficiencia de *SHOX* tienen un 50% de posibilidades de heredar la variante patogénica. Si ambos padres presentan la deficiencia, sus hijos tendrán 50% de probabilidades de heredar la deficiencia, 25% de presentar DML y 25% de no presentar ninguna de las dos. Si se ha identificado la variante en ambos padres se puede hacer diagnóstico prenatal en caso de que se sospeche DML.

El seguimiento de los pacientes con deficiencia de *SHOX* está bien establecido; requiere la monitorización de los parámetros de crecimiento (incluyendo la desproporción y el IMC), estadio puberal, deformidad de Madelung (por su potencial aparición de dolor o limitación de la



pronosupinación) y la posible aparición de escoliosis. El tratamiento de niños prepuberales con talla baja con hormona de crecimiento recombinante ofrece una ganancia de talla entre 7 y 10 cm<sup>[119]</sup> y se ha demostrado seguro<sup>[120]</sup>. Existen también distintas técnicas quirúrgicas para el tratamiento de la deformidad de Madelung dolorosa<sup>[121] [122]</sup>, así como dispositivos ergonómicos<sup>[123]</sup>.

## 4.2 Otras displasias esqueléticas que cursan con talla baja

Existen algunas displasias esqueléticas que cursan con talla baja (desproporcionada o no) cuya expresividad esquelética es más leve comparado con otras displasias. Los signos y síntomas característicos pueden tardar en aparecer, ser sutiles o no fácilmente identificables.

- **Hipocondroplasia (MIM: 146000):** Entidad clínica heterogénea causada por variantes en heterocigosis en *FGFR3*<sup>[124]</sup>. Su incidencia en la población general es desconocida. El fenotipo clásico consta de: talla baja variable (125-160 cm), acortamiento rizomélico de las extremidades, incurvación en varo de miembros inferiores, macrocefalia relativa y frente abombada, e hiperlordosis lumbar. Radiológicamente puede presentar signos sutiles como la ausencia de ensanchamiento de la distancia interpeduncular lumbar de L1 a L5, aspecto tosco de los huesos largos, braquimetacarpiya y ensanchamiento metafisario<sup>[124]</sup>. Su espectro clínico es muy amplio, dado que se han descrito pacientes con talla normal, con acortamiento mesomélico e incluso pacientes sin ningún rasgo destacable<sup>[125]</sup>. La eficacia del tratamiento con GH en estos pacientes es controvertida<sup>[126]</sup>. El rendimiento del estudio molecular es del 70% aproximadamente siendo la variante más frecuente p.(Asn540Lys)<sup>[127]</sup>.
- **Displasia epifisaria múltiple (DEM):** Comprende un grupo heterogéneo de 7 entidades donde la afectación principal es epifisaria, si bien pueden cursar con alteraciones vertebrales. Su incidencia junto con la pseudocondroplasia se estima en 1/20.000<sup>[128]</sup>. Cursan con talla baja desproporcionada, dolor articular y osteoartritis precoz. Existe no obstante variabilidad fenotípica. Aunque cada entidad tiene rasgos propios existe solapamiento entre las mismas. Se clasifican en función del gen causante y la mayoría presentan herencia AD [*COMP* (MIM: 132400), *COL9A2* (MIM: 600204), *COL9A3* (MIM: 600969), *MATN3* (MIM: 607078) y *COL9A1* (MIM: 614135), denominados tipos 1, 2, 3, 5 y 6, respectivamente]. Dos de ellas tienen herencia AR [tipos 4 y 7 respectivamente: *SCL26A2* (MIM: 226900) y *CANT1* (MIM: 617719)]. Existen entidades sin causa conocida y se postula que deben existir otros *loci* aún no detectados e incluso formas de herencia oligogénica. En su fisiopatología intervienen genes que codifican proteínas de la matriz, así como enzimas y proteínas transportadoras.
- **Displasia metafisaria Schmid (MIM: 156500):** Se trata de una entidad de herencia AD originada por variantes en *COL10A1*. Cursa con acortamiento de huesos largos junto con

irregularidad y ensanchamiento metafisario, que conducen a varo de miembros inferiores y coxa vara. Suele manifestarse a partir de los 2-3 años con talla baja moderada, marcha de pato y dolor articular <sup>[129]</sup>.

- **Displasia espondiloepifisaria tarda (MIM: 313400):** Esta enfermedad originada por variantes en heterocigosis en *TRAPPC2* y de herencia ligada al X se caracteriza por afectación vertebral y epifisaria. Cursa con talla baja progresiva desde los 3-4 años, acortamiento del tronco y dolor de espalda y/o caderas y rodillas así como limitación de la movilidad articular <sup>[130]</sup>.
- **Displasias acromélicas:** Este grupo se caracteriza por talla baja generalmente por debajo de -3 DE, acortamiento del segmento distal de las extremidades (acromicria) y rigidez articular. Entre ellas destacan por su frecuencia la displasia geleofísica (MIM: 231050, 614185, 617809), la displasia acrométrica (MIM: 102370), la enfermedad de Weill-Marchesani (MIM: 277600, 608328, 614819, 613195) y el síndrome de Myhre (MIM: 139210). Todas ellas poseen herencia conocida y rasgos fenotípicos característicos, si bien destaca una vez más la heterogeneidad en su presentación.

## 5. Evaluación de la talla baja

La evaluación del paciente con hipocrecimiento cambia en paralelo a nuestra capacidad diagnóstica. El abordaje inicial no ha sufrido cambios y debe incluir <sup>[47]</sup>:

1. Historia clínica exhaustiva.
2. Examen clínico completo con una valoración auxológica básica.
3. Determinación de la maduración esquelética.
4. Análisis del patrón de crecimiento a partir de los datos aportados por los padres o acumulados en la historia del niño.

A partir de esa primera evaluación inicial podremos orientar al paciente en alguno de los subgrupos de la clasificación y llevar a cabo, si procede, los estudios iniciales de laboratorio. Las pruebas de despistaje general incluyen: hemograma, función hepática y renal, iones, calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, despistaje de enfermedad celiaca, IGF-1, T4I, TSH, cariotipo (niñas), gasometría venosa e IGFBP-3 (los dos últimos en menores de 3 años) <sup>[44]</sup>. Las pruebas siguientes, en caso de requerirse, irán orientadas de forma específica. Ante una fuerte sospecha clínica, la secuencia de exámenes complementarios está bien establecida y sujeta a protocolos diagnósticos <sup>[44]</sup> <sup>[47]</sup>.

Dado que el crecimiento es un proceso dinámico que dura muchos años, la observación del paciente a lo largo de meses-años aportará información muy valiosa. Por un lado, podremos asistir a la aparición de rasgos fenotípicos y por otro recoger/objetivar su VC. No precipitarse en la realización

de pruebas complementarias costosas y no exentas de riesgos debe formar parte de la secuencia diagnóstica <sup>[131]</sup>.

## 5.1. Estudios genéticos en pacientes con talla baja

En líneas generales, los estudios genéticos se indican en base a una sospecha diagnóstica derivada del fenotipo. Así, pueden ir dirigidos a una entidad concreta (p. ej. síndrome de Williams, síndrome de Turner), a un subgrupo de entidades (p. ej. deficiencia combinada de hormonas hipofisarias, displasia esquelética) o bien dirigirse a grupos más amplios que incluyen entidades de difícil reconocimiento o desconocidas (síndromes no identificados, PEG sin recuperación del crecimiento, etc). Existen recomendaciones elaboradas por grupos de expertos que orientan la elección de los pacientes candidatos y designan la técnica más apropiada <sup>[43] [44] [132]</sup>. En la práctica clínica cada centro sigue su propia estrategia en base a su experiencia y disponibilidad <sup>[50] [133] [134]</sup>. La colaboración estrecha entre el clínico y el especialista en genética mejorará el rendimiento.

Los estudios disponibles en el momento actual se resumen a continuación <sup>[47] [135]</sup>:

- **Array-CGH** (*array* de hibridación genómica comparada) y **array-SNP** (*array* de polimorfismo único de nucleótido) que permiten detectar variaciones en la dosis o número de copias del genoma (deleciones y duplicaciones). Dado que el cariotipo convencional, indicado en niñas con talla baja para descartar el síndrome de Turner, tiene un bajo rendimiento, en muchos centros ha sido sustituido o complementado por el array-CGH o array-SNP. La técnica se basa en la hibridación simultánea del ADN paciente y de un ADN control normal (patrón) marcados con diferentes fluoróforos, respectivamente. Las diferencias en las intensidades de la fluorescencia a lo largo de los diversos cromosomas se miden observándose pérdidas y ganancias de material genético <sup>[136]</sup>. El array-SNP aporta información sobre dosis genómica y adicionalmente de heterocigosidad/homocigosidad de regiones, por lo que pone de manifiesto la existencia de disomías uniparentales o regiones de homocigosidad <sup>[137]</sup>. Están indicados en pacientes que presentan malformaciones congénitas múltiples, en casos de síndromes no reconocibles, ante la sospecha de síndrome de Silver Russell, así como en TBI y PEG sin recuperación del crecimiento <sup>[132]</sup>.
- **Estudios de MLPA**: Consiste en el cribado de determinadas regiones del ADN mediante el estudio de varias sondas que hibridarán en diferentes puntos de la región de interés. Permiten analizar variantes del número de copias (CNV) en regiones concretas. Existen pruebas comercializadas que incluyen numerosos genes pudiéndose estudiar 40-50 *loci* simultáneamente (MRC Holland; <https://www.mrcholland.com>) <sup>[138]</sup>.

- **Secuenciación Sanger:** Es el análisis detallado del ADN, capaz de determinar la secuencia nucleótidos de un fragmento de ADN o de un gen en concreto. Permite detectar variantes sin sentido, con cambio de sentido, inserciones/deleciones (indels) así como variantes que afectan al corte y empalme <sup>[44]</sup>.
- **Estudios de metilación:** La metilación puede encontrarse a lo largo de todo el genoma y suprimir la transcripción génica. Los defectos en metilación pueden ocasionar trastornos del crecimiento y están implicados en la regulación de genes sometidos a impronta <sup>[139]</sup>. Existen distintos métodos para el estudio del estado de metilación y pueden estar centrados en regiones concretas, en varios *loci* en paralelo o en el estudio de todo el genoma. Dado que la información de la metilación del ADN se borra tras la amplificación o hibridación, la gran mayoría de técnicas de estudio de la metilación se basan en un tratamiento metil-dependiente previo, principalmente por modificaciones químicas mediante conversión por bisulfito. La técnica consiste en el tratamiento del ADN genómico con bisulfito de sodio seguido por un tratamiento alcalino, convirtiendo las citosinas no metiladas en uracilo y dejando las citosinas metiladas intactas. Posteriormente, se puede analizar la metilación mediante amplificación con reacción en cadena de polimerasa (PCR) con cebadores diseñados para hibridar con el ADN modificado por bisulfito <sup>[140]</sup> y comparar contra la misma muestra no expuesta a la reacción bisulfito. Posteriormente se realiza análisis por MLPA de metilación (MS-MLPA) <sup>[141]</sup>, *microarray* o por secuenciación masiva. Existen ensayos MS-MLPA que incluyen regiones de interés en crecimiento (como 11p, 7q, 14q y 20q destinadas al cribado de entidades como el síndrome de Silver Russell y el síndrome de Temple (MRC Holland). Una de las displasias esqueléticas más estudiada es el pseudohipoparatiroidismo, asociado con alteraciones en *GNAS*. El pseudohipoparatiroidismo 1b se asocia a patrones anómalos de metilación en el locus *GNAS* de distinta naturaleza (deleciones en *STX16*, *NESP/AS*, disomía uniparental paterna o forma esporádica) <sup>[142]</sup> <sup>[143]</sup>.
- Estudios de secuenciación masiva: Este tipo de estudios permite obtener millones de secuencias en un único ensayo con un coste muy reducido (ver siguiente sección).

## 5.2. Secuenciación masiva: Next Generation Sequencing

A mediados del año 2000 aparecieron las nuevas tecnologías de secuenciación. La primera plataforma de secuenciación de “alto rendimiento” sería bautizada con el nombre de “Next-generation sequencing (NGS)”. En líneas generales, consiste en el empleo en paralelo de múltiples pequeños fragmentos de ADN para determinar su secuencia al mismo tiempo <sup>[135]</sup>.

Desde su aparición, las tecnologías NGS han evolucionado rápidamente. Gracias a ellas se han ampliado nuestros conocimientos en evolución, adaptación y enfermedad, y hemos asistido al incremento de su capacidad de análisis, la reducción de los costes y el tiempo de respuesta y la incorporación de innovaciones revolucionarias para afrontar la complejidad del genoma <sup>[144]</sup>.

En 2008 las técnicas de secuenciación masiva irrumpen en el mercado y la secuenciación se convierte en una herramienta clínica <sup>[145]</sup>. Su utilización es cada vez más amplia y permiten tomar decisiones cruciales (diagnóstico prenatal, cuidados intensivos neonatales y pediátricos), asignar tratamientos específicos en oncología y diagnosticar de forma precoz enfermedades complejas entre otros. La secuenciación masiva permite cada vez más llevar a cabo una medicina de precisión en determinados grupos de pacientes.

Existen diferentes plataformas (denominación que recibe el conjunto de instrumentos para secuenciar junto con los reactantes asociados) para NGS. En la actualidad, la plataforma *Illumina* (de lectura corta 75-150 pares de bases (pb) y secuenciación por síntesis) es el patrón de oro en secuenciación clínica y en investigación. Aporta una precisión muy elevada en la detección de variantes patogénicas, incluyendo variantes en un único nucleótido (SNV), CNV e indels <sup>[144]</sup>.

El flujo de trabajo de la NGS (representado de forma esquemática en la figura 12) sigue en líneas generales las siguientes etapas <sup>[135] [144]</sup>:

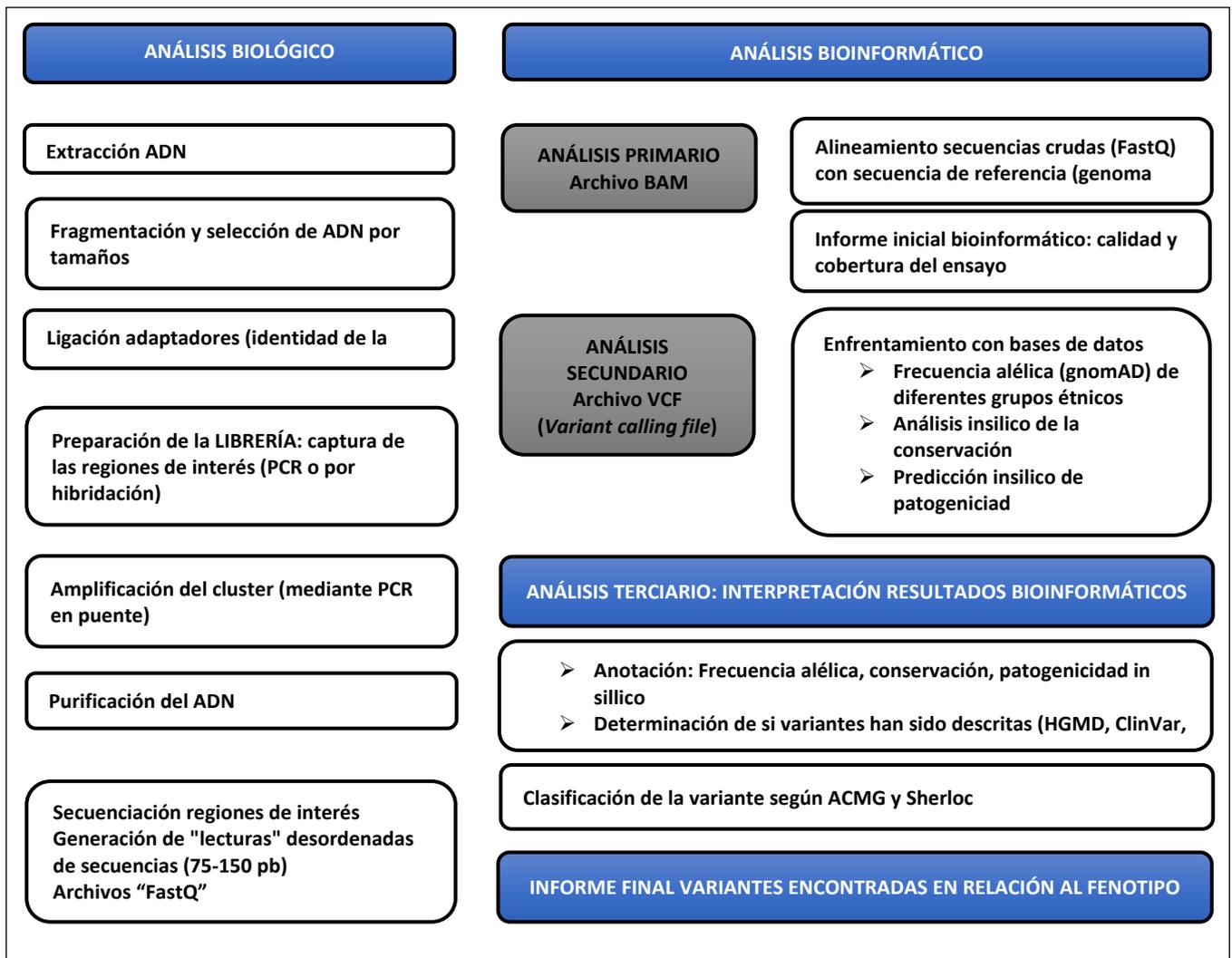
- 1- Extracción del ADN.
- 2- Fragmentación y selección de ADN por tamaños.
- 3- Ligación adaptadores que contienen unas secuencias para poder subsecuentemente identificar la identidad de la muestra.
- 4- Preparación de la librería. Consiste en la captura de las regiones de interés. Se realiza bien por PCR o por hibridación.
- 5- Amplificación del *cluster* (mediante PCR en puente).
- 6- Purificación del ADN.
- 7- Secuenciación de las regiones de interés. Para ellos se utilizan distintos secuenciadores: MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovoSeq (Illumina) que generan datos sin procesar en forma de "lecturas" desordenadas de secuencias de entre 75 y 150 pb de longitud. Se genera archivos en formato "FastQ".
- 8- Análisis bioinformático. Éste es dividido en los siguientes pasos:
  - a. Análisis primario: Alineamiento de las secuencias crudas (formato *FastQ*) con la secuencia de referencia del proyecto del genoma humano. Se obtiene una alineación ordenada de las lecturas en la totalidad de la secuencia de referencia conocida. Este archivo se denomina archivo BAM. Un informe inicial del estudio bioinformático documenta la calidad y cobertura del ensayo incluyendo: un resumen de los marcadores de captura

(genes, exones, bases, bases >20X de profundidad, profundidad media), marcadores de alineamiento (número de lecturas crudas, lecturas alineadas, lecturas duplicadas) y finalmente marcadores de género (cromosoma X e Y en cada muestra).

- b. Análisis secundario. Una vez quedan anotadas las variantes del archivo BAM se enfrentan a varias bases de datos: frecuencia alélica (gnomAD) de diferentes grupos étnicos, análisis *in silico* de la conservación y predicción de patogenicidad de la variante, así como presencia de la misma en otros pacientes en la misma carrera (pudiendo indicar que son polimorfismos o artefactos de la técnica). El archivo generado se llama VCF (*Variant calling file*).
- 9- Análisis terciario: Interpretación de los resultados bioinformáticos. Este proceso se inicia con los datos “en crudo” obtenidos del secuenciador hasta la emisión de un informe sobre las variantes encontradas. Los cientos o miles de variantes deben ser filtradas y priorizadas para su interpretación clínica, con el objetivo de responder a si es la causa del fenotipo observado. El proceso varía entre laboratorios. La primera fase se denomina anotación y debe constar de:
- a. Frecuencia alélica poblacional (MAF: *Minor Allele Frequency*): Para distinguir variantes raras de variantes comunes en la población se utilizan bases de datos de secuenciación del genoma a gran escala, como gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).
  - b. Análisis *in silico* de la posible patogenicidad de la variante encontrada en la función proteica. Hay dos tipos de evaluación: i) Evaluación del grado de conservación del aminoácido en la evolución. Para ello se usan bases de datos como “Phylogenetic p-values for vertebrate-mamalian” o “PhastCons score for vertebrate-mamalian species”. Un aminoácido altamente conservado tiene más probabilidad de estar implicado en la función proteica. ii) Predicción de posible patogenicidad *in silico*. Para ello se utilizan herramientas como CADD (<https://cadd.gs.washington.edu/>), SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Polyphen(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) y programas de predicción de patogenicidad de splicing como SpliceSite Finder-Like (<http://www.umd.be/searchSpliceSite.html>), MaxEntScan ([http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.html](http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)), NNSPLICE ([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), GeneSplicer (<https://ccb.jhu.edu/software/genesplicer/>), con el objetivo de obtener probabilidad de que una variante es deletérea.
  - c. Determinación de si las variantes han sido ya descritas en genes asociados con enfermedades humanas, usando varios bases de datos como HGMD Profesional (Qiagen), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), LOVD (<https://www.lovd.nl/>), y si han sido caracterizadas funcionalmente.

- d. Evaluación de los hallazgos genéticos con relación al fenotipo del paciente. La realización de estudios familiares contribuye a la interpretación de los resultados encontrados; cuando una variante es heredada de un progenitor y este presenta el mismo fenotipo que el paciente podemos decir que existe cosegregación del fenotipo con el genotipo.

En una segunda fase se debe integrar toda la información obtenida en la primera fase y clasificar la variante en base a las recomendaciones del American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) <sup>[146]</sup> y Sherloc <sup>[147]</sup>. Las variantes se clasifican en cinco categorías: patogénicas, probablemente patogénicas, variantes de significado incierto (VUS), probablemente benignas y benignas.



**Figura 12:** Flujo de trabajo de la NGS desde la extracción de la muestra de ADN al paciente hasta la emisión del informe final.

En la actualidad, existe la posibilidad de secuenciar todo el genoma o determinadas regiones <sup>[148]</sup> y para ello contamos con tres aproximaciones con distinta aplicación:

- Paneles dirigidos: Se realiza exclusivamente la captura selectiva de los exones (y regiones intrónicas adyacentes) de genes concretos implicados en determinadas patologías o grupos de enfermedades. Existen paneles comerciales y paneles de diseño propio.
- Exoma completo (WES, *whole exome sequencing*): Analiza los exones de unos 22000 genes, lo que representa el 1.5% del genoma. Se estima que pueden incluir el 85% de las variantes causantes de enfermedad <sup>[144]</sup>. En un primer momento se utilizaron en pacientes sin diagnóstico tras la realización de un panel o en aquellos con fenotipos complejos <sup>[149]</sup>. Su alto rendimiento diagnóstico y la reducción de los costes han hecho que hoy en día puedan ser, en muchas ocasiones, la primera elección. El análisis por tríos (probando y progenitores) supone una mejoría importante de la tasa diagnóstica por la ayuda de la interpretación de las variantes identificadas <sup>[150]</sup>.
- Genoma completo (WGS, *whole genome sequencing*): En este caso la secuenciación no es dirigida y cubre todo el genoma, incluyendo regiones reguladoras, intrónicas e intergénicas. Aunque el coste se ha reducido mucho, el manejo de la gran cantidad de datos obtenidos (se analizan unos 3 billones de pares de bases aproximadamente en cada paciente) hace que el análisis sea aún complejo <sup>[144]</sup>. Una de las ventajas de WGS es que no precisa amplificación del ADN del paciente, lo que evita regiones problemáticas de amplificación y ayuda a la detección de CNV.

La importancia de la comunicación entre el clínico y el laboratorio es muy relevante en la interpretación de las variantes detectadas por NGS, ya que la información precisa sobre el fenotipo ayuda a determinar la patogenicidad de una variante.

## 6. Otras casusas de talla baja de origen primario

Hasta hace tres décadas el estudio del crecimiento y la talla baja se centraba en los factores extrínsecos a la placa, sobre todo los que participaran en el eje GH-IGF-1 <sup>[9]</sup>. Con la llegada de la NGS, los estudios GWAS pudieron identificar numerosos *loci* con influencia en la talla adulta <sup>[37]</sup> y se pudieron delimitar con mayor precisión los genes necesarios para la función normal de la placa de crecimiento <sup>[17]</sup>. Disponer de esta información permitió poder buscar variantes en estos genes en pacientes afectos de talla baja sin diagnóstico etiológico <sup>[12] [151] [152]</sup>.



## 6.1. Síndrome de Noonan

El síndrome de Noonan (MIM: 163950) y otras entidades clínicamente solapadas ocupan un lugar destacado por su frecuencia. Se estima que el síndrome de Noonan afecta a uno de cada 1000-2500 recién nacidos vivos. Se produce por variantes en genes que codifican para proteínas de la vía de señalización RAS-MAPK; de ahí que se engloben bajo el término “rasopatías”<sup>[153]</sup>. Los genes descritos en relación con dichas rasopatías son: *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *BRAF* y *NRAS*, si bien un 20% no tienen causa genética identificada<sup>[153]</sup><sup>[154]</sup>. El diagnóstico es clínico y se apoya en los criterios de Van Der Burgt<sup>[155]</sup>.

Se caracteriza por una alta heterogeneidad clínica y genética y las manifestaciones fundamentales incluyen la talla baja, cardiopatía congénita y un fenotipo facial característico. Aunque hay una mayor prevalencia de PEG el crecimiento prenatal no suele verse afectado. El patrón característico es un crecimiento prepuberal en percentil 3, con retraso en el inicio puberal, escaso estirón y una talla adulta en torno a -2 DE<sup>[154]</sup>. Algunos autores han encontrado perfiles hormonales sugestivos de insensibilidad a la hormona de crecimiento<sup>[156]</sup>. Otros estudios sugieren que la hiperactivación de la vía RAS-MAPK podría afectar a la diferenciación de los condrocitos durante el crecimiento óseo, mediante un mecanismo independiente de IGF-1. El tratamiento con GH en estos pacientes ofrece resultados de ganancia de talla moderados.

## 6.2. Síndrome de Silver Russell

El síndrome de Silver-Russell (MIM: 180860) se caracteriza por retraso de crecimiento prenatal y postnatal, rasgos faciales característicos y asimetría corporal. Aunque su incidencia se desconoce, se estima en un rango entre 1:30.000 y 1:100.000 nacidos. Para su diagnóstico clínico se emplea el sistema de puntuación desarrollado por Netchine-Harbison, que incluye seis criterios: peso al nacimiento y/o longitud al nacimiento  $\leq -2$  DE, fallo de crecimiento postnatal (talla a los 24 meses  $\leq -2$  DE o talla  $\leq -2$  DE por debajo de la talla media parental), macrocefalia relativa al nacimiento (perímetro cefálico  $\geq 1,5$  DE por encima de la DE del peso y la longitud al nacimiento), frente abombada, asimetría corporal y dificultades en la alimentación y/o bajo índice de masa corporal (IMC  $\leq -2$  DE a los 24 meses). El diagnóstico clínico puede confirmarse si el paciente presenta al menos 4 de estos 6 criterios<sup>[157]</sup>.

Dicha entidad se debe, fundamentalmente (30-60% de los casos), a hipometilación en el alelo paterno de la región 11p15.5, región sometida a impronta que incluye los genes *IGF2* y *H19*, los cuales verían alterada su expresión. Otras causas genéticas incluyen: disomía uniparental del cromosoma 7 (matUPD7) (5-10% de los casos) y duplicaciones variables de la

región crítica del alelo materno del cromosoma 11p15.5. No obstante, en un porcentaje no desdeñable se desconoce la causa.

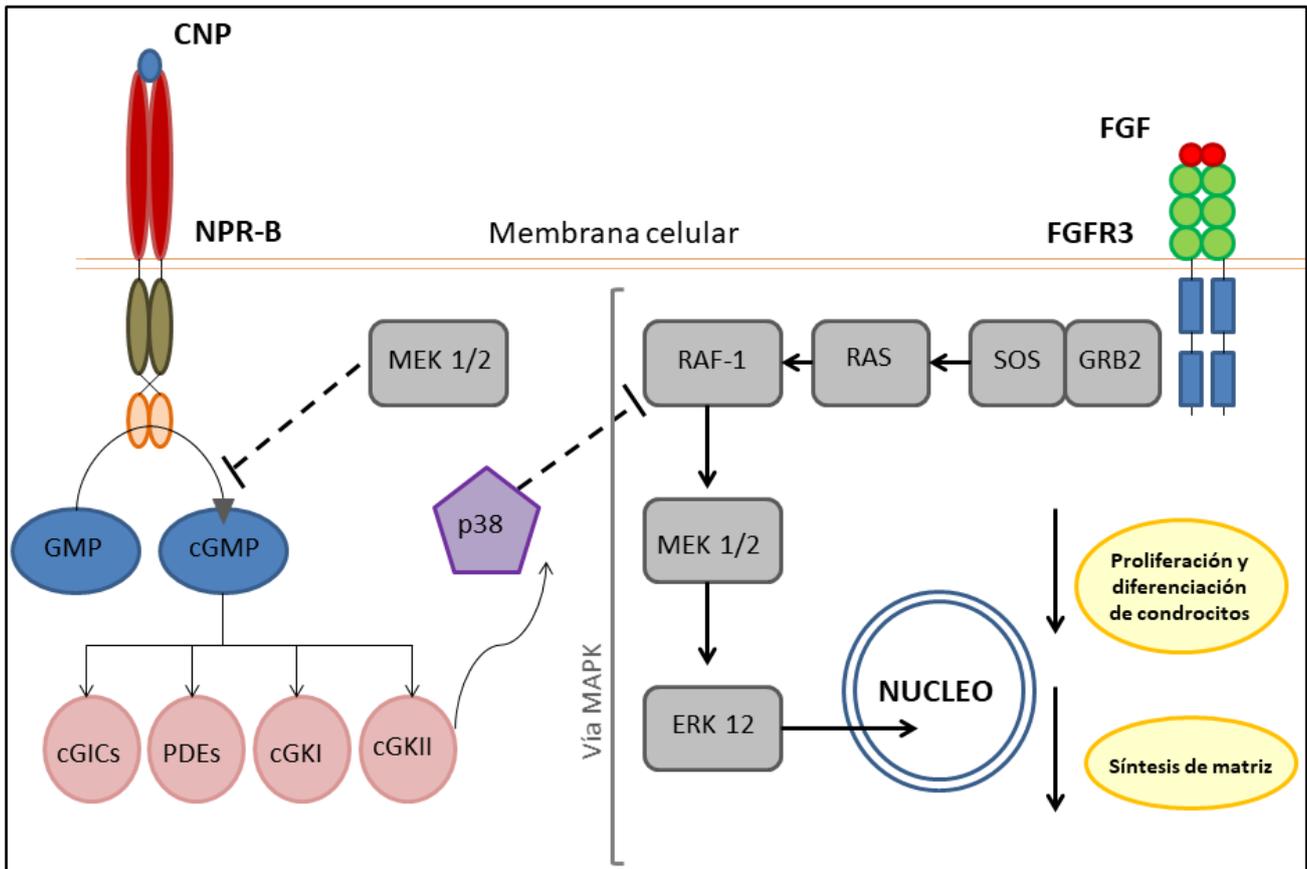
### 6.3. Talla baja relacionada con variantes en heterocigosis en *NPR2*

En 2004 se descubre la implicación de variantes en homocigosis o heterocigosis compuesta en *NPR2* en pacientes con displasia acromesomélica de Maroteaux (MIM: 602875) [158]. Tras este hallazgo empezaron a describirse algunas series de portadores heterocigotos con talla significativamente más baja que sus controles sanos, sin encontrar diferencias en la desproporción corporal [159]. Más tarde, comenzaron a aparecer trabajos identificando pacientes tanto con talla baja idiopática, como con fenotipo de DLW sin deformidad de Madelung, así como pacientes con talla baja disarmónica y anomalías esqueléticas inespecíficas sin evidencia de complicaciones ortopédicas [160] [161]. Algunos de estos estudios iniciales señalaron que variantes con pérdida de función en heterocigosis en *NPR2* podrían ser responsables del 2-3% de las tallas bajas idiopáticas, con o sin desproporción corporal [160] [162]; sin embargo, la prevalencia real es desconocida.

*NPR2* se localiza en el cromosoma 9p13 y codifica el receptor del péptido natriurético B (NPR-B), que posee alta afinidad por el péptido natriurético tipo C (CNP), importante factor paracrino que actúa como regulador positivo de la condrogénesis. Cuando CNP se une a NPR-B, se produce la dimerización de NPR-B y activación posterior del guanilato ciclasa en el dominio citosólico; después GMPc activa GMPc-dependiente de proteína quinasa tipo II (PRKG2). Esta activación inhibe la vía MAPK, que antagoniza con la señalización FGF/FGFR3. De esta manera el complejo CNP-NPR-B incrementa la proliferación y diferenciación de los condrocitos [163] [164]. En la figura 13 se muestra la interacción de forma esquemática.

Se han descrito pacientes tratados con GH con buena respuesta [161] [165], aunque se trata de pacientes aislados o cohortes pequeñas por lo que no existe de momento una recomendación para el tratamiento.

Variantes en homocigosis con pérdida de función en *NPR2* causan displasia acromesomélica de Maroteaux (caracterizada por talla baja severa por debajo de -5 DE, acortamiento extremidades y acortamiento severo manos); mientras que variantes en heterocigosis con pérdida de función se asocian con TBI y talla baja con anomalías esqueléticas leves [162]. Por el contrario variantes activadoras de *NPR2* en humanos son responsables de la condrodysplasia epifisaria tipo Miura (MIM: 615923), caracterizada por talla alta, aracnodactilia y hallux largo [166] [167].



**Figura 13:** Las vías de señalización CNP/NPR-B y FGF/FGFR3 convergen en la vía MAPK. El efecto neto supone el incremento de la proliferación y diferenciación de condrocitos y el aumento de la síntesis de la matriz. Adaptado de Vasques y cols. <sup>[163]</sup>.

#### 6.4. Talla baja relacionada con variantes en heterocigosis en *NPPC*

En relación con este mismo eje CNP/NPR-B/GMPc, Hisado-Oliva y cols. identificaron en 2018 dos variantes en heterocigosis en *NPPC* localizadas en un anillo altamente conservado de CNP en dos familias con talla baja proporcionada y manos pequeñas <sup>[168]</sup>.

*NPPC* se localiza en 2q37 y codifica CNP, ligando de NPR-B. En los estudios funcionales llevados a cabo se comprobó que los mutantes de *NPPC* en estado homocigoto no eran capaces de activar NPR-B y en estado heterocigoto presentaban una reducción significativa en la síntesis de GMPc. Una de las variantes ya se había relacionado con anomalías esqueléticas en el ratón mutante espontáneo *long-bone abnormality (Ibab)*. Estudios previos de GWAS ya habían establecido una relación entre *NPPC* y estatura <sup>[169]</sup>. Y además se había propuesto que la haploinsuficiencia de *NPPC* podía ser la causa de la talla baja en un individuo con una delección de 1.9Mb en 2q37 que incluía 20 genes entre los cuales estaban *NPPC* <sup>[170]</sup>. Por el contrario, la sobreexpresión de *NPPC* está descrita en pacientes con talla alta, manos y pies grandes y

posibilidad de otras anomalías esqueléticas (MIM: 498488) y traslocación balanceada de 2q.37. Esta entidad está incluida entre las displasias esqueléticas <sup>[171]</sup>.

## 6.5. Talla baja relacionada con variantes en heterocigosis en *ACAN*

Agrecano es un proteoglicano que constituye el principal componente de la matriz extracelular en la placa de crecimiento. Está codificado por el gen *ACAN* e implicado en tres displasias esqueléticas: variantes en homocigosis o heterocigosis compuesta responsables de la displasia espondiloepifisaria tipo Kimberly (SEDK, MIM: 608361) y variantes en heterocigosis en otras dos entidades que son la displasia espondiloepimetafisaria tipo agrecano (SEMD, MIM: 612813) y la osteocondritis disecante (MIM: 165800) <sup>[172] [173] [174]</sup>.

A mediados de la década pasada comenzaron a describirse familias portadoras de variantes en heterocigosis en *ACAN* con un nuevo fenotipo. Los individuos afectados presentaban talla baja, aceleración de la maduración esquelética, dismorfia facial leve y cese del crecimiento precoz <sup>[151] [175]</sup>. La generalización de los estudios moleculares permitió la detección de un mayor número de familias, lo que contribuyó a ampliar el espectro fenotípico <sup>[176] [177] [178] [179]</sup>. Los individuos afectados pueden presentar talla baja leve y proporcionada o bien una forma de displasia esquelética leve con desproporción y braquidactilia. También es característica la disfunción del cartílago articular y algunos pacientes presentan precozmente osteoartritis y/o discopatía, pudiendo requerir tratamiento quirúrgico temprano. Una publicación reciente encuentra una prevalencia de variantes en heterocigosis en *ACAN* de 1.4% tras analizar mediante WES una cohorte de 428 individuos con TBI <sup>[177]</sup>.

Algunos de estos trabajos comunican descripciones aisladas de pacientes tratados con GH y/o análogos de GnRH con respuesta modesta <sup>[176]</sup>.

## 7. Tratamiento de pacientes con talla baja

Las terapias disponibles para mejorar la talla de un paciente son limitadas <sup>[5]</sup>. Tras la evaluación diagnóstica, y en función de los resultados obtenidos se pueden considerar algunas de ellas, si bien en la mayoría de los pacientes no estará indicado ningún tratamiento, salvo que el diagnóstico apunte a una alteración en el eje GH-IGF1. En otros casos el tratamiento indicado será el de la enfermedad responsable del hipocrecimiento (enfermedad celiaca, hipotiroidismo, malnutrición, etc). En un porcentaje menor de pacientes puede ser necesaria la utilización de tratamientos específicos para estimular o mejorar el crecimiento <sup>[180]</sup>.

## 7.1. Hormona de crecimiento recombinante (GHr)

La GH estimula el crecimiento longitudinal de los huesos largos de manera prácticamente dosis dependiente. Su utilización como tratamiento específico en pacientes con deficiencia de GH se remonta a hace más de 50 años, y ha sido durante muchos años el único tratamiento disponible en pacientes con talla baja hasta la aparición de la IGF-1 recombinante (IGF-1r) <sup>[181]</sup>. Gracias a la ingeniería genética se dispone de cantidades ilimitadas de GHr desde la década de los 80, por lo que su uso se amplía progresivamente a otras entidades no deficitarias de GH. En la actualidad la Agencia Europea del Medicamento (EMA) contempla el tratamiento en los siguientes supuestos diagnósticos: deficiencia de GH, síndrome de Prader-Willi, hipocrecimiento asociado a insuficiencia renal crónica, síndrome de Turner, PEG, deficiencia de SHOX y recientemente síndrome de Noonan <sup>[181]</sup>. La Administración de Medicamentos y Alimentos Americana (FDA) considera además la indicación en pacientes con TBI <sup>[181]</sup> con el objetivo de corregir las consecuencias psicosociales negativas de la talla baja. En España y en el resto de Europa la situación es distinta, y aunque se están realizando multitud de tratamientos en esta indicación *off-label*, la indicación de GH en la TBI no ha sido aceptada por la Agencia Europea del medicamento (EMA) <sup>[5]</sup>.

La GHr se administra por vía subcutánea diaria a dosis variables según la indicación, aunque el tratamiento debe ser individualizado. La sensibilidad y respuesta al tratamiento es mayor en pacientes deficitarios, si bien los modelos de predicción de respuesta al tratamiento señalan dos factores clave en todos los grupos: talla (DE) al inicio de tratamiento y talla familiar (DE) <sup>[182]</sup>.

Numerosos estudios avalan la eficacia y seguridad a largo plazo del tratamiento con GH en niños, en las principales indicaciones aceptadas. Los efectos adversos descritos más frecuentes son cefalea, artralgias, edema y reacción local en el lugar de la inyección. Otros eventos como la epifisiolisis de la cabeza femoral y la hipertensión intracraneal benigna, afectan a 1:1000 niños tratados. A dosis mayores y mantenidas puede haber disminución de la sensibilidad a la insulina, desarrollo de rasgos acromegaloides y elevación de los niveles de IGF-1 de repercusión incierta. Los pacientes con factores de riesgo previos para diabetes o malignidad deben ser tratados con cautela y monitorizados de forma más estrecha <sup>[182]</sup>.

En un intento de mejorar la adherencia al tratamiento a la par que disminuir su invasividad, existen diversas formulaciones de somatropina de acción prolongada en fase de desarrollo <sup>[182]</sup>. Algunas de ellas ya están comercializadas en China, Corea del Sur y Estados Unidos, tanto para su uso en adultos como en niños, tras haber podido garantizar su eficacia y

seguridad respecto a GHr en ensayos clínicos<sup>[183]</sup>. Su uso aún no está autorizado por la EMA por lo que, en el momento actual, no disponemos de ellas en nuestro país<sup>[184]</sup>.

La utilización de GH en otras entidades fuera de las mencionadas (displasias esqueléticas, síndromes dismórficos, fibrosis quística) se limita a cohortes pequeñas y los resultados en general son discretos<sup>[185]</sup> <sup>[186]</sup>.

## 7.2. IGF-1 recombinante (IGF-1r)

Tras la realización de ensayos clínicos controlados y randomizados, la utilización de IGF-1 recombinante humana (mecasermina) fue aprobada en Europa en 2007 para aquellos pacientes con defectos en la acción de la GH y deficiencia severa de IGF-1<sup>[181]</sup> <sup>[187]</sup> <sup>[188]</sup>. La experiencia acumulada avala su eficacia con una seguridad similar a la ofrecida en los ensayos clínicos<sup>[189]</sup>, aunque los beneficios en talla son menores a los obtenidos con GHr en pacientes deficitarios. Inicialmente se describió un efecto dosis dependiente, pero, en la actualidad, la eficacia de la terapia se establece por subgrupos de pacientes. En este sentido, los pacientes con síndrome de Laron presentan mejor respuesta en la talla tras el primer año de tratamiento si se inicia en edades tempranas, son prepuberales y presentan mayor afectación de talla. En los pacientes con defectos en la acción de la GH independientes de la insensibilidad a GH (“no-Laron”), la edad de inicio temprana es el único predictor de buena respuesta. Esto pone en relieve la importancia del diagnóstico y tratamiento precoces<sup>[189]</sup> <sup>[190]</sup>. El tratamiento a largo plazo mejora la talla adulta de estos pacientes, aunque la mayoría no presentan suficiente recuperación como para alcanzar una talla normal. Las acciones de la IGF-1 comprenden mecanismos endocrinos, pero también autocrinos y paracrinos por lo que con la IGF-1r, supuestamente se restaura el componente endocrino. No obstante, el efecto local sobre la placa de crecimiento de la IGF-1r exógena puede ser limitado. El efecto adverso más frecuente es la hipoglucemia, con una tasa de 0.1 eventos por año de tratamiento. El resto de efectos que pueden aparecer son similares a los descritos en el tratamiento con GH, con una tasa de eventos graves de 0.01 eventos por año de tratamiento<sup>[189]</sup>. El desarrollo de neoplasias (benignas o malignas) obliga a suspender el tratamiento.

Se ha publicado un estudio sobre la eficacia y seguridad de la utilización simultánea de GHr e IGF-1r en niños con talla baja, deficiencia de IGF-1 y suficiencia de GH, obteniendo una eficacia superior frente a GH en monoterapia y un perfil de seguridad similar<sup>[191]</sup>. A pesar del efecto complementario y sinérgico de estos dos principios activos la utilización combinada no justifica su prescripción generalizada.

### 7.3. Moduladores de la pubertad

Con el objetivo de prolongar el tiempo de crecimiento a través del enlentecimiento de la maduración esquelética y/o la detención o retraso de la pubertad se han utilizado dos grupos de fármacos en niños con talla baja.

- **Análogos de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH):** Su uso no está justificado de forma aislada en pacientes con talla baja y pubertad normal, como demuestran distintos estudios<sup>[192]</sup> <sup>[193]</sup> El uso combinado de análogos de GnRH junto con GHr muestra una eficacia variable según los estudios realizados y, en cualquier caso, escasa<sup>[180]</sup>. No obstante, su utilización en pacientes con deficiencia de GH con diagnóstico tardío puede incrementar la talla adulta, requiriéndose un mínimo de dos años de tratamiento para obtener un resultado significativo<sup>[193]</sup>.
- **Inhibidores de la aromatasas:** La utilización de inhibidores de la aromatasas (letrozol, anastrozol) con el fin de retrasar el cierre epifisario en varones con talla baja ha sido otra estrategia propuesta para mejorar la talla adulta<sup>[194]</sup>. La ausencia de datos consistentes a largo plazo, así como el desconocimiento del efecto neto en talla final y potenciales efectos adversos no justifican su utilización actual<sup>[180]</sup>.

### 7.4. Alargamiento óseo

El alargamiento quirúrgico de las extremidades se emplea desde la década de los años 30 del siglo pasado para corregir asimetrías en longitud en miembros inferiores o superiores (bien congénito o adquirido) y, más recientemente, para el alargamiento bilateral de piernas y/o brazos en pacientes con talla baja<sup>[195]</sup>. La experiencia se concentra en pacientes con acondroplasia quienes se benefician no sólo de la ganancia de talla, sino también de la corrección de algunas de las deformidades durante el proceso de alargamiento. La ganancia de talla varía según el protocolo utilizado y la edad de inicio de tratamiento, pero puede alcanzar 20-30 cm<sup>[195]</sup> <sup>[196]</sup> <sup>[197]</sup>. Las pautas actuales suelen incluir alargamiento de tibias y fémures seguido de húmeros. También se ha descrito alargamiento por motivos estéticos en pacientes con talla baja leve o moderada, e incluso en pacientes con talla normal. Las indicaciones en estos casos son controvertidas dado el alto índice de complicaciones que llegan a alcanzar el 100% de los casos intervenidos. Infecciones, contracturas musculares, aumento del riesgo de fracturas, dolor y posibles resultados psicológicos adversos son algunas de ellas. No obstante, la mayoría de las series describen escasas secuelas a largo plazo y un alto porcentaje de satisfacción por parte de los pacientes<sup>[197]</sup>. El método inicial de osteogénesis por distracción ha evolucionado a lo largo del tiempo desde la fijación externa unilateral a la fijación con anillo, seguida de la fijación computarizada y, finalmente, al uso de clavos intramedulares que es el implante de elección en

el alargamiento femoral <sup>[195]</sup>. Tanto los resultados obtenidos como el índice de complicaciones tienen una relación estrecha con la experiencia del cirujano ortopédico. Los retos futuros en este tipo de terapia van dirigidos a la investigación en regeneración de tejidos así como la reducción de los tiempos de tratamiento <sup>[195]</sup>.

## 8. Nuevas perspectivas terapéuticas en talla baja

A la escasez de tratamientos dirigidos a mejorar la talla de los pacientes se une la insuficiencia y/o ineficacia, tanto de GHr como de IFG-1r, en tratar entidades de etiología diferente a las anomalías del eje somatotropo. El número de pacientes afectados de alteraciones asociadas con el eje GH- IGF-1 es minoritaria. Por este motivo la investigación de otras dianas terapéuticas en torno a la condrogénesis parecía muy necesaria <sup>[198]</sup>.

Las enfermedades esqueléticas suponen un campo único para la investigación de nuevas herramientas terapéuticas ya que comparten fisiopatología, genes y vías moleculares <sup>[199]</sup>. La mejor comprensión de los procesos de formación ósea y homeostasis ha permitido desarrollar terapias dirigidas contra diferentes dianas, proporcionando nuevas perspectivas en el pronóstico de entidades severas y quizás cambios en el consejo genético prenatal en los próximos años <sup>[200]</sup>. En la actualidad existe un importante desarrollo de estrategias de intervención terapéutica en el conjunto de las displasias esqueléticas.

### 8.1. Terapéutica en acondroplasia

La acondroplasia supone la causa más frecuente de talla baja severa desproporcionada al tener una prevalencia de 1/25.000-30.000 recién nacidos vivos <sup>[201]</sup> y se debe mayoritariamente a mutación activadora en *FGFR3*.

El tratamiento con GHr (aprobado solo en Japón) no parece establecer ningún beneficio claro a largo plazo en los pacientes con acondroplasia. No obstante, en las dos últimas décadas se han desarrollado diferentes moléculas que interfieren con los distintos “pasos” de la vía de señalización de *FGFR3* <sup>[202]</sup>. *FGFR3* es un regulador negativo de la osificación endocondral por lo que las variantes con ganancia de función (propias de la acondroplasia) inhiben la proliferación y diferenciación de condrocitos. La activación permanente de *FGFR3* activa de forma paralela dos cascadas de señalización intracelular <sup>[202]</sup>: la vía STAT-1, que conduce a la disminución de la transformación de condrocito en hueso y MAPK, que conduce a la disminución en la producción de matriz extracelular.

Existen distintas estrategias en desarrollo para el tratamiento de la acondroplasia dirigidas a diferentes dianas. La comprensión de los mecanismos de acción y las bases



fisiopatológicas del hipocrecimiento relacionado con FGFR3 se deriva de modelos en ratones, y ha permitido el desarrollo de diferentes fármacos en humanos.

- a- CNP recombinante (Vosoritide, de Biogen  $\text{\textcircled{C}}$ , anteriormente conocido como BMN-111). Es la molécula más desarrollada hasta la fecha y es un regulador negativo de *FGFR3*, cuya vida media es corta. Vosoritide resiste la degradación enzimática uniéndose a *NPR2*, lo cual inhibe la activación de la vía de MAPK a través de la síntesis de guanosina-5'-trifosfato (GTP) inducida por guanosina 3'-5'-monofosfato cíclica (GMPc). Así Vosoritide permite la osificación endocondral ya que la vía STAT1 no se encuentra afectada. Este fármaco ha sido aprobado recientemente por la EMA y FDA, habiendo demostrado hasta la fecha un buen perfil de seguridad así como una ganancia de talla entre 1.5-2 cm/año a lo largo de 42 meses, con pocos efectos adversos descritos <sup>[203]</sup>. Existen estudios preclínicos en paralelo prometedores con TransCon CNP (Ascendis Pharma  $\text{\textcircled{C}}$ ). El uso de la tecnología TransCon permite crear una pro-droga que libera de forma lenta CNP activo a lo largo de varios días, con el objetivo de imitar su eficacia y evitar los efectos secundarios potenciales de la administración de CNP en bolo diario <sup>[198]</sup>.
- b- Recifercept (anteriormente conocido como TA-46, Pfizer  $\text{\textcircled{C}}$ ): Se trata de una molécula de FGFR3 soluble humano capaz de unirse a los ligandos naturales de FGFR3 y actuar como ligando "trampa" evitando la sobreactivación de las vías STAT1/MAPK. Estudios en modelos experimentales de ratón con acondroplasia (*Fgfr3<sup>Ach/+</sup>*) muestran resolución de los síntomas en ratones tratados. Estos ratones muestran proporciones corporales semejantes a los ratones sanos <sup>[200]</sup> <sup>[202]</sup>. También se han podido completar los estudios en fase I con esta molécula; los ensayos en fase II en niños con acondroplasia están en marcha.
- c- Inhibidor de tirosin kinasa (BGJ398/ Infigratinib, QED therapeutics  $\text{\textcircled{C}}$ ): Esta molécula bloquea la actividad intracelular de la tirosina quinasa del receptor de MAPK (aunque también de STAT y SOX9) y por tanto la señalización aguas abajo, contrarrestando así la hiperactividad FGFR3. El desarrollo de esta molécula se encuentran en fase II de ensayos clínicos <sup>[200]</sup> <sup>[202]</sup>.
- d- Aptámero FGF2 (APT-F2P/RBM 007, Ribomic  $\text{\textcircled{C}}$ ): Se trata de una molécula que bloquea la unión de FGF2 a sus receptores inhibiendo la señalización aguas abajo de la vía FGFR. Ha demostrado su eficacia en el tratamiento del cáncer de pulmón dependiente de FGF2, así como en modelos de ratas con artritis y osteoporosis bloqueando la disrupción de la placa de crecimiento y restaurando la calidad del hueso. Existen estudios preclínicos en modelos de ratón con acondroplasia como potencial terapia <sup>[202]</sup>.
- e- Meclozina (Hospital Universitario de Nagoya, en Japón): La meclozina es un antiemético cuyo uso en acondroplasia es un ejemplo de reformulación de fármacos. Ha demostrado mejoría

de la talla y las proporciones corporales en ratones transgénicos (*Fgfr3<sup>Ach/+</sup>*) tratados durante 3 semanas. El mecanismo subyacente sugerido es la inactivación de la vía de *FGFR3* a través de la inhibición de ERK <sup>[200]</sup> <sup>[202]</sup>.

- f- Anticuerpos anti-FGFR3 (B-701/Vofatamab, Rainier Therapeutics ©): Este tipo de terapia monoclonal ha demostrado su eficacia en cáncer de vejiga dependiente de FGFR3. Podría tratarse de una potencial opción en acondroplasia en un futuro.
- g- Estatinas: Han sido testadas en modelos de ratón con resultados dispares. De momento no hay estudios en humanos <sup>[202]</sup>.

## 8.2. Terapia en otras displasias esqueléticas

El desarrollo de terapias farmacológicas prometedoras va más allá de la acondroplasia. Otras displasias esqueléticas que cursan con talla baja y anomalías ortopédicas se podrán beneficiar en un futuro. Ejemplos de ello son:

- Pseudoacondroplasia: El mecanismo fisiopatológico de esta anomalía reside en el acúmulo de proteínas anómalas no plegadas que conducen a la muerte celular por el estrés derivado en el retículo endoplasmático. Agentes antioxidantes o anti-inflamatorios (como ácido acetil salicílico o resveratrol) interrumpen el proceso letal de los condrocitos inducido por la retención de COMP mutante, restaurando parcialmente la proliferación de condrocitos y aumentando de forma significativa la longitud del fémur. Estos fármacos se encuentran en fase II/III de ensayo clínico <sup>[199]</sup>.
- Displasia metafisaria de Schmid: En esta enfermedad la retención de COL10 anómalo provoca estrés en retículo endoplasmático <sup>[199]</sup>. Estudios preclínicos muestran que la carbamazepina (en fase II de ensayo clínico: <https://mcids-therapy.eu/>) estimula la proteólisis de ese colágeno “no plegado” por autofagia o degradación proteosomal, lo que conduce a disminución de la acumulación reduciendo el estrés del retículo endoplasmático in vitro e in vivo. Estudios en ratones demuestran incremento de crecimiento en hueso y disminución de la displasia <sup>[199]</sup> <sup>[200]</sup>.

El objetivo terapéutico en las entidades citadas, hasta ahora, se dirige a mejorar la talla y las anomalías ortopédicas. Sin embargo, dentro del grupo de las displasias esqueléticas existen fármacos, bien comercializados o bien en fase de ensayo clínico, con objetivos diferentes según la entidad de que se trate <sup>[199]</sup> <sup>[200]</sup> <sup>[204]</sup>.

## Hipótesis

Dado que el diagnóstico etiopatogénico de la talla baja supone un reto para clínicos e investigadores y entre el 60 y el 80% de pacientes se clasifican dentro del grupo de TBI, hipotetizamos que es probable que existan variantes en genes que se expresan en la placa de crecimiento en pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves, al igual que sucede en pacientes con fenotipos leves ya descritos dentro de las displasias esqueléticas.

## Objetivos

- 1- Identificar la frecuencia de defectos en genes implicados en displasias esqueléticas en una cohorte de pacientes pediátricos con talla baja y anomalías esqueléticas leves así como familiares afectados.
- 2- Búsqueda de relaciones fenotipo-genotipo y profundización en el papel de los genes encontrados en la regulación del crecimiento.
- 3- Contribuir a ampliar el espectro fenotípico y genotípico de entidades ya conocidas.
- 4- Validar la idoneidad de un panel de genes implicados en displasias esqueléticas en el diagnóstico de pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves.
- 5- Establecer si existen parámetros antropométricos, clínicos, radiológicos y/o familiares que predigan la presencia de variantes en genes relacionados con displasias esqueléticas en la cohorte de pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves.

## Artículos publicados durante el desarrollo de la investigación

### 1. High prevalence of variants in skeletal dysplasia associated genes in individuals with short stature and minor skeletal anomalies

Lucía Sentchordi-Montané, Sara Benito-Sanz, Miriam Aza-Carmona, Francisca Díaz-González, Silvia Modamio-Høybjør, Carolina de la Torre, Julián Nevado, Pablo Ruiz-Ocaña, Carolina Bezanilla-López, Pablo Prieto-Matos, Pilar Bahillo-Curieses, Atilano Carcavilla-Urquí, Inés Mulero-Collantes, Ana C. Barreda-Bonis, Jaime Cruz-Rojo, Joaquín Ramírez-Fernández, José A Bermúdez de la Vega, André M. Travessa, Jesús González de Buitrago Amigo, Angela del Pozo, Elena Vallespín, Mario Solís, Carlos Goetz-Alvarez, Ángel Campos-Barros, Fernando Santos-Simarro, Isabel González-Casado, Purificación Ros-Pérez, Manuel Parrón-Pajares, Karen E. Heath.

**Eur J Endocrinol. 2021;185(5):691-705.**

Cuartile: Q1

Factor de impacto 2020: 6,664

### 2. Clinical and molecular description of 16 families with heterozygous *IHH* variants.

Lucía Sentchordi-Montané, Sara Benito-Sanz, Miriam Aza-Carmona, Arrate Pereda, Manuel Parrón-Pajares, Carolina de la Torre, Gabriela A. Vasques, Mariana F.A. Funari, André M. Travessa, Patrícia Dias, Larisa Suarez Ortega, Jesús González-Buitrago, Nancy Elizabeth Portillo-Najera, Isabel Llano Rivas, María Martín-Frías, Joaquín Ramírez-Fernández, Jaime Sánchez del Pozo, Lucía Garzón-Lorenzo, Gabriel A. Martos-Moreno, Cristina Alfaro Iznaola, Inés Mulero-Collantes, Pablo Ruiz-Ocaña, Paula Casano-Sancho, Ana Portela, Lorea Ruiz-Pérez, Angela del Pozo, Elena Vallespín, Mario Solís, Antônio M. Lerario, Isabel González-Casado, Purificación Ros-Pérez, Guiomar Pérez de Nanclares, Alexander A. L. Jorge, Karen E. Heath.

**J Clin Endocrinol Metab. 2020;105(8):1-13.**

Cuartile: Q1

Factor de impacto 2020: 5,958

### 3. Heterozygous aggrecan variants are associated with short stature and brachydactyly: Description of 16 probands and a review of the literature.

Lucía Sentchordi-Montané, Miriam Aza-Carmona, Sara Benito-Sanz, Ana C. Barreda-Bonis AC, Consuelo Sánchez-Garre, Pablo Prieto-Matos, Pablo Ruiz-Ocaña, Alfonso Lechuga-Sancho,

Atilano Carcavilla-Urquí, Inés Mulero-Collantes, Gabriel A. Martos-Moreno, Angela del Pozo, Elena Vallespín, Amaka Offiah, Manuel Parrón-Pajares, Isabel Dinis I, Sergio B. Sousa, Purificación Ros-Pérez, Isabel González-Casado, Karen E. Heath.

**Clin Endocrinol (Oxf). 2018;88(6):820-829.**

Cuartile: Q2

Factor de impacto 2018: 2,897

4. ***IHH* gene mutations causing short stature with nonspecific skeletal abnormalities and response to growth hormone therapy.**

Gabriela A. Vasques, Mariana F.A. Funari, Frederico M Ferreira, Miriam Aza-Carmona, Lucía **Sentchordi-Montané**, Jimena Barraza-García, Antônio M. Lerario, Guilherme M Yamamoto, Michel S. Naslavsky, Yeda A.O. Duarte, Debora R. Bertola, Karen E. Heath, Alexander A.L. Jorge.

**J Clin Endocrinol Metab. 2018;103(2):604-614.**

Cuartile: Q1

Factor de impacto 2018: 5,605

**Otros artículos publicados a lo largo de la tesis doctoral:**

5. **Identification of the third FGF9 variant in a girl with multiple synostosis-comparison of the genotype:phenotype of FGF9 variants in humans and mice.**

**Sentchordi-Montané L**, Diaz-Gonzalez F, Cátedra-Vallés EV, Heath KE.

Identification of the third FGF9 variant in a girl with multiple synostosis-comparison of the genotype:phenotype of FGF9 variants in humans and mice.

**Clin Genet. 2021;99(2):309-312.**

Cuartile: Q2

Factor de impacto 2020: 4,438

6. **Biallelic cGMP-dependent type II protein kinase gene (*PRKG2*) variants cause a novel acromesomelic dysplasia.**

Francisca Díaz-González F, Saruchi Wadhwa, María Rodríguez-Zabala, Somesh Kumar, Miriam Aza-Carmona, **Lucía Sentchordi-Montané**, Milagros Alonso, Istaq Ahmad, Sana Zahra, Deepak Kumar, Neetu Kushwah, Uzma Shamim, Haseena Sait, Seema Kapoor, Belén Roldán, Gen Nishimura, Amaka C. Offiah, Mohamed Faruq, Karen E. Heath

**J Med Genet. 2020 Oct 26:jmedgenet-2020-107177. doi: 10.1136/jmedgenet-2020-107177.**

**Epub ahead of print. PMID: 33106379.**

Cuartile: Q1

Factor de impacto 2020: 6,318

7. **Mutations in C-natriuretic peptide (NPPC): a novel cause of autosomal dominant short stature.**

Alfonso Hisado-Oliva, Alba Ruzafa-Martin, **Lucía Sentchordi**, Mariana A. Funari, Carolina Bezanilla-López, Marta Alonso-Bernáldez, Jimena Barraza-García, María Rodríguez-Zabala, Antioio M Lerario, Sara Benito-Sanz, Miriam Aza-Carmona, Angel Campos-Barros, Alexander AL Jorge, Karen E. Heath.

**Genet Med. 2018;20(1):91-97.**

Cuartile: Q1

Factor de impacto 2020: 8,586

# Resumen de los trabajos originales publicados

## Artículo 1

**“High prevalence of variants in skeletal dysplasia associated genes in individuals with short stature and minor skeletal anomalies”**

**Prevalencia elevada de variantes en genes asociados a displasias esqueléticas en individuos con talla baja y anomalías esqueléticas menores**

**Eur J Endocrinol. 2021;185(5):691-705.**

Con el objetivo de determinar la prevalencia de variantes en genes implicados en displasias esqueléticas en probandos con talla baja y anomalías esqueléticas leves se reclutó una cohorte de 108 probandos que presentaban talla baja, entre -4.6 y -2 DE, y al menos una de las siguientes: desproporción corporal, anomalías esqueléticas leves y/o un progenitor con talla baja y alguno de los rasgos anteriores. Se recogieron los datos clínicos y radiológicos de todos los pacientes y se llevó a cabo un panel de NGS que incluía genes implicados en displasias esqueléticas.

Las variantes encontradas se clasificaron siguiendo las recomendaciones de la ACMG y Sherlock. Se llevó a cabo una comparación de los datos clínicos y radiológicos entre los individuos en quienes se había encontrado un defecto genético y los que no.

Se identificaron variantes en heterocigosis en 21/108 probandos, lo que supone una proporción de 19.4%. Los genes más frecuentemente identificados fueron *ACAN* (10 probandos) e *IHH* (7 probandos). Se encontró además una variante en los siguientes: *COL2A1*, *CREBBP*, *EXT1* y *PTPN11*.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre aquellos pacientes con variantes identificadas frente a aquellos sin hallazgo molecular para la ratio Ts/T (tanto en términos absolutos como en DE), así como para una ratio Ts/T  $> 1$  DE.

El defecto molecular fue esclarecido en casi el 20% de los pacientes; por tanto, la prevalencia de displasias esqueléticas leves es relativamente alta en individuos con talla baja y anomalías esqueléticas leves. *ACAN* e *IHH* ocupan un lugar principal al ser responsables en 81% de los casos. La ratio Ts/T y la presencia de un progenitor con talla baja y anomalías esqueléticas se asocia con mayor probabilidad de encontrar una variante genética no existiendo otros parámetros clínicos o radiológicos estadísticamente significativos determinantes para ello. El trabajo destaca la importancia del fenotipado esquelético en individuos con talla baja de etiología desconocida, así como en sus padres.



# High prevalence of variants in skeletal dysplasia associated genes in individuals with short stature and minor skeletal anomalies

Lucía Sentchordi-Montané<sup>1,2,3,4</sup>, Sara Benito-Sanz<sup>1,5,6</sup>, Miriam Aza-Carmona<sup>1,4,5</sup>, Francisca Díaz-González<sup>1,4</sup>, Silvia Modamio-Høybjør<sup>1,4</sup>, Carolina de la Torre<sup>1,4</sup>, Julián Nevado<sup>1,5,6</sup>, Pablo Ruiz-Ocaña<sup>7</sup>, Carolina Bezanilla-López<sup>8</sup>, Pablo Prieto<sup>9</sup>, Pilar Bahillo-Curieses<sup>10</sup>, Atilano Carcavilla<sup>4,11</sup>, Inés Mulero-Collantes<sup>12</sup>, Ana C Barreda-Bonis<sup>4,11</sup>, Jaime Cruz-Rojo<sup>13</sup>, Joaquín Ramírez-Fernández<sup>14</sup>, José Antonio Bermúdez de la Vega<sup>15</sup>, André M Travessa<sup>16</sup>, Jesús González de Buitrago Amigo<sup>17</sup>, Angela del Pozo<sup>1,5,6</sup>, Elena Vallespín<sup>1,5</sup>, Mario Solís<sup>1</sup>, Carlos Goetz<sup>18</sup>, Ángel Campos-Barros<sup>1,5</sup>, Fernando Santos-Simarro<sup>1,4,5,6</sup>, Isabel González-Casado<sup>4,11</sup>, Purificación Ros-Pérez<sup>19</sup>, Manuel Parrón-Pajares<sup>4,20</sup> and Karen E Heath<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, UAM, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, <sup>4</sup>Skeletal Dysplasia Multidisciplinary Unit (UMDE) and ERN-BOND, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, <sup>5</sup>CIBERER, ISCIII, Madrid, Spain, <sup>6</sup>ERN-ITHACA, Hospital Universitario, Hospital La Paz, Madrid, Spain, <sup>7</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain, <sup>8</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid, Spain, <sup>9</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Clínico Salamanca and Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain, <sup>10</sup>Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain, <sup>11</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, <sup>12</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain, <sup>13</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, <sup>14</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, Spain, <sup>15</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Sevilla, Spain, <sup>16</sup>Medical Genetics Service, Department of Pediatrics, Hospital de Santa Maria and Faculty of Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal, <sup>17</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario San Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain, <sup>18</sup>PeRTICA SAS Consultant, Madrid, Spain, <sup>19</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain, and <sup>20</sup>Department of Radiology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to K E Heath  
**Email**  
[karen.heath@salud.madrid.org](mailto:karen.heath@salud.madrid.org)

## Abstract

**Objective:** Next generation sequencing (NGS) has expanded the diagnostic paradigm turning the focus to the growth plate. The aim of the study was to determine the prevalence of variants in genes implicated in skeletal dysplasias in probands with short stature and mild skeletal anomalies.

**Design:** Clinical and radiological data were collected from 108 probands with short stature and mild skeletal anomalies.

**Methods:** A customized skeletal dysplasia NGS panel was performed. Variants were classified using ACMG recommendations and Sherloc. Anthropometric measurements and skeletal anomalies were subsequently compared in those with or without an identified genetic defect.

**Results:** Heterozygous variants were identified in 21/108 probands (19.4%). Variants were most frequently identified in *ACAN* ( $n = 10$ ) and *IHH* ( $n = 7$ ) whilst one variant was detected in *COL2A1*, *CREBBP*, *EXT1*, and *PTPN11*. Statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed for sitting height/height (SH/H) ratio, SH/H ratio standard deviation score (SDS), and the SH/H ratio SDS  $>1$  in those with an identified variant compared to those without.

**Conclusions:** A molecular defect was elucidated in a fifth of patients. Thus, the prevalence of mild forms of skeletal dysplasias is relatively high in individuals with short stature and mild skeletal anomalies, with variants in *ACAN* and *IHH* accounting for 81% of the cases. An elevated SH/H ratio appears to be associated with a greater probability in detecting a variant, but no other clinical or radiological feature has been found determinant to finding a genetic cause. Currently, we cannot perform extensive molecular studies in all short stature individuals so detailed clinical and radiological phenotyping may orientate which are the candidate patients to obtain worthwhile results. In addition, detailed phenotyping of probands and family members will often aid variant classification.

*European Journal of Endocrinology*  
 (2021) **185**, 691–705

## Introduction

Short stature, defined as height below  $-2$  standard deviation score (SDS) for sex, age, and ethnicity, is a paramount problem for clinicians but also to the parents and the patient themselves. It is one of the most common reasons for referral to a pediatric endocrinologist. The high prevalence of short stature of unknown etiology has also driven scientists and clinicians to investigate its origin and pathogenic mechanisms. Initially, the research concentrated on the somatotrophic axis with growth hormone (GH) playing a critical role in human growth, primarily through its regulation of insulin growth factor I (IGF-I) production. Genetic disorders have been identified throughout the GH/IGF-I axis, ranging from growth hormone deficiency, either in isolation or as part of combined pituitary hormone deficiency, to primary IGF-I deficiency, IGF-I resistance, or dysregulation of IGF-I availability. However, genetic defects are only found in a small proportion ( $<10\%$ ) of cases (1, 2).

Since the first description, in 1997, of the implication of *SHOX* in idiopathic short stature (ISS) (3), extensive research has been performed. *SHOX* is located in the pseudoautosomal region 1 (PAR1) of the sexual chromosomes, thus, all normal stature males and females have two active copies. *SHOX* encodes a transcription factor which regulates growth in the growth plate (4). Heterozygous defects in *SHOX* and/or its enhancers have been identified in a small proportion, approximately 2.5%, of individuals with ISS (5), and in a significantly higher proportion, approximately 70%, in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) (6). LWD is a skeletal dysplasia characterized by short stature, mesomelic shortening of the limbs, and the classic Madelung deformity of the wrist. Clinical heterogeneity is high and the skeletal defects often become more evident during puberty and, thus, can be missed in young children (7). *SHOX* genetic testing in our laboratory has resulted in the identification of a *SHOX* or enhancer defect in approximately 16% of all *SHOX* testing referrals ( $n=7300$  since 2008, unpublished data). Thus, *SHOX* alterations are the most common genetic defect in short stature.

During the last decade, the implementation of next generation sequencing (NGS) has expanded the diagnostic paradigm, simultaneously permitting the analysis of a large number of genes or the entire exome or genome. The detection of genetic variants in genes expressed in the growth plate in ISS patients has encouraged us to search for skeletal traits (8, 9, 10). Mild or minor skeletal traits are often overlooked during the initial evaluation

of short stature patients and skeletal surveys do not form part of routine clinical workups. Yet, the increasing rate of heterozygous variants identification in various skeletal dysplasia genes, such as *FGFR3*, *NPR2* and more recently, *ACAN* and *IHH* (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16), in children with disproportionate or proportionate short stature with or without mild skeletal abnormalities, has significantly contributed to widen the phenotypic spectrum of many skeletal dysplasias.

Although many monogenic causes of growth disorders have been identified, the diagnostic yield remains low and we continue to investigate the genetic contribution in short stature. In this study, we set out firstly, to determine the prevalence of variants in skeletal dysplasia genes in a cohort of pediatric probands with short stature and mild skeletal abnormalities, and to subsequently evaluate which clinical and radiological variables increase the probability of identifying the underlying genetic defect.

## Subjects and methods

### Study subjects

All participants or parents provided informed consent for the performed studies and ethical approval was obtained from the Hospital Universitario La Paz ethical committee.

The study included children less than 18 years old, who all met two principal criteria: short stature of unknown etiology (defined as height  $\leq -2$  SDS for sex, age, and ethnic group) and the presence of a skeletal anomaly defined as the occurrence of at least one of the following: body disproportion, mild skeletal anomaly, or a short stature parent with body disproportion or mild skeletal anomaly. Patients with several dysmorphic features or major malformations, indicative of a syndrome were excluded from this study. 'Minor malformations' refers to unusual morphologic features found in the general population causing no serious medical or cosmetic significance to the affected individual (17). Following this concept, we define mild skeletal defects as unusual skeletal features both unpainful and non-disabling for the affected individual (see list in Supplementary Table 1, see section on [supplementary materials](#) given at the end of this article).

The children were recruited using an extensive questionnaire (Supplementary data) which pediatric endocrinologists and clinical geneticists from various Spanish and Portuguese hospitals were asked to complete. All cases were subsequently reviewed by the same pediatric endocrinologist, L.S.-M., and pediatric radiologist, M.P.-P.,

both experienced in skeletal dysplasia evaluations. A total of 108 unrelated probands were selected for the study. Clinical (medical records, physical examination, and anthropometric values), radiological (bone age and skeletal survey), and family data (height and skeletal traits of both parents) were then collected from all selected probands. Anthropometric measurements were made by the referring clinician. Height SDS and parental height SDS were calculated according to Spanish reference data 2010, as well as small for gestational age (SGA), defined as birth weight and/or height below  $-2$  SDS (18). Sitting height/height (SH/H) ratio SDS were estimated according to Fredriks charts (19). Arm span/height (A/H) ratio SDS were calculated according to Maastricht standards (20). Bone age was determined by Greulich and Pyle method (21). Body disproportion was considered as having at least an A/H ratio  $\leq 0.96$  and/or SH/H  $\geq 0.55$ .

Systemic and endocrine disorders including somatotrophic axis related conditions were excluded by laboratory tests including hemogram, biochemistry including bone markers, IGF-I, IGFBP-3, FT4, TSH, and celiac disease screening. Karyotyping was also performed in girls. All participants had also been previously excluded for *SHOX* alterations using multiplex ligation probe amplification (MLPA P018G2, MRC Holland) and high-resolution melting (HRM) and/or Sanger sequencing.

### Genetic analysis

Blood samples were obtained from the probands and analyzed using a custom designed skeletal dysplasia NGS panel, SKELETALSEQ.V4-8 ( $n = 327\text{--}416$  genes, gene lists are available upon request). All coding exons, intron:exon junctions including  $\pm 10$  bp) were extrapolated to the variant calling file (VCF) whilst the binary alignment map (BAM) files were manually assessed for variants within approximately 100 bp of intronic sequence from the intron:exon boundaries for the following genes: *ACAN*, *IHH*, *NPR2*, *FGFR3*, *COL2A1*, and *PTPN11*. The identified variants were assessed for amino acid conservation, *in silico* pathogenicity prediction analysis: CADD V1.4 (<http://cadd.gs.washington.edu/>), SIFT, Polyphen, MutationTaster, various splicing programmes available in Alamut V2.14 (Interactive Biosoftware, France); and allelic frequencies in gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Copy number variant (CNV) analysis was performed using in house software, LACONv tool release 0.0., developed for calculating dosage for each exon present in targeted gene panels, after GC sequence content had been corrected. The dosage for each captured region of the test sample is

compared against all other samples in the same panel run and *P*-values were calculated using Mann–Whitney U tests. CNVs were considered significant with  $P > 0.05$ .

All detected variants were subsequently validated by Sanger sequencing. The identified *IHH* deletion was confirmed by a single nucleotide polymorphism (SNP) array (Infinium CytoSNP-850K v1.2 BeadChip, Illumina) but due to low probe density in this region, we further characterized the deletion using a custom-designed *IHH* MLPA (10). Family testing was performed, where possible. Kinship was confirmed using microsatellite marker analysis (Devyser Complete QF-PCR, Stockholm, Sweden). Variants were classified according to American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines (22) and Sherlock variant classification (23).

### Statistical analysis

Clinical, radiological, and familial features were analyzed for the total cohort and subdivided into two groups depending on the presence or absence of a genetic defect.

Statistical analyzes were performed using SAS software V9.4 (SAS Institute Inc., Cary NC). Quantitative values are expressed as means, medians (non-Gaussian distribution), standard deviations (SD), and ranges (min–max). Categorical variables were used to describe absolute frequencies and percentages. Comparisons between groups were performed by Student's *t*-tests and Fisher's exact tests for quantitative variables whilst chi-square tests were used for qualitative variables. Results were considered statistically significant with a two-sided significance level of  $P < 0.05$ .

For identifying which clinical or anthropometric indicators could predict the presence and the identification of a genetic variant, logistic multi-regression analyzes were performed with varied sets of explanatory variables, applying full models and stepwise selection models.

### Results

A total of 108 probands (61 female, 47 male) were included in the study. Mean proband age was 8.59 years (range: 1.5–18), mean height SDS was  $-2.97$  (range:  $-4.6$  to  $-2.0$ ), and the mean parental height was  $-1.69$  SDS (range:  $-3.6$  to  $+1.41$ ). An overview of clinical, radiological and familial features, and frequencies of the total cohort and the sub-groups (variant vs no identified variant) are shown in Table 1.

A total of 20 heterozygous variants, classified as pathogenic, likely pathogenic or variants of unknown

**Table 1** Summary of the main clinical and radiological features of the 108 probands. Parents height and skeletal anomalies are presented below.

Clinical characteristics	Total cohort (n = 108)		Variant (n = 21)		No variant (n = 87)		P-value
	n (%) or mean $\pm$ s.d.	Median (range)	n (%) or mean $\pm$ s.d.	Median (range)	n (%) or mean $\pm$ s.d.	Median (range)	
Sex							
Female	61 (56.5)		14 (66.7)		47 (54)		0.294
Male	47 (43.5)		7 (33.3)		40 (46)		
Age (y)	8.59 $\pm$ 3.76	8.00 (1.5 to 18)	8.08 $\pm$ 4.15	7.00 (1.5 to 16)	8.71 $\pm$ 3.67	8.00 (2 to 18)	0.414
Height SDS	-2.97 $\pm$ 0.59	-2.99 (-4.6 to -2)	-3.02 $\pm$ 0.61	-3.10 (-4 to -2.1)	-2.96 $\pm$ 0.59	-2.98 (-4.6 to -2)	0.557
Parental height SDS	-1.69 $\pm$ 1	-1.82 (-3.6 to 1.41)	-1.80 $\pm$ 1.15	-1.92 (-3.6 to 1.41)	-1.67 $\pm$ 0.97	-1.79 (-3.54 to 0.53)	0.484
SH/H	0.54 $\pm$ 0.03	0.54 (0.45 - 0.60)	0.56 $\pm$ 0.02	0.55 (0.52 - 0.60)	0.54 $\pm$ 0.03	0.540 (0.580 - 0.450)	<b>0.021</b>
SH/H SDS	0.32 $\pm$ 0.99	0.35 (-3 to 2.3)	0.81 $\pm$ 0.56	0.87 (-0.23 to 1.74)	0.21 $\pm$ 1.03	0.27 (-3 to 2.3)	<b>0.016</b>
SH/H SDS $\geq$ 1	19 (26.2)		6 (60)		13 (20)		<b>0.015</b>
A/H	0.97 $\pm$ 0.04	0.97 (0.90 to 1.06)	0.97 $\pm$ 0.03	0.98 (0.90 to 0.99)	0.98 $\pm$ 0.04	0.970 (0.90 to 1.06)	0.348
A/H SDS	-0.74 $\pm$ 1.77	-0.7 (-4.37 to 4.60)	-0.95 $\pm$ 1.97	-0.21 (-4.37 to 1.41)	-0.7 $\pm$ 1.75	-0.88 (-4.28 to -4.60)	0.644
A/H SDS $\leq$ -1	36 (54.3)		5 (33.3)		31 (47.6)		0.318
Body disproportion <sup>†</sup>	46 (52.2)		10 (62.5)		36 (50)		0.365
Bone age (y)*	-0.79 $\pm$ 1.57	0 (-4 to 3)	-0.36 $\pm$ 1.38	0 (-3 to 2)	-0.89 $\pm$ 1.61	-1.5 (-4 to 3)	0.139
SGA	29 (28.4)		8 (38)		21 (25.9)		0.271
Skeletal defects							
Abnormal skeletal survey	83 (78.3)		18 (85.7)		65 (65.85)		0.357
Brachydactyly	70 (67.3)		17 (80.9)		53 (63.8)		0.194
Spine	10 (9.6)		3 (13.6)		7 (8.5)		0.418
Hip	23 (22.3)		4 (19)		19 (23.1)		0.775
Knee	12 (11.6)		4 (19)		8 (9.7)		0.259
Other	21 (19.8)		4 (19)		17 (20)		1.000
Dysmorphic features	31 (29)		6 (28.5)		25 (29)		0.960
Microcephaly	12 (12.6)		4 (19)		8 (9.3)		0.246
Minor malformations	9 (9.1)		1 (4.7)		8 (9.3)		0.685
Father's height SDS	-1.70 $\pm$ 0.31	-1.68 (-4.88 to 1.34)	-2.17 $\pm$ 1.44	-2.26 (-4.50 to 1.06)	-1.58 $\pm$ 1.26	-1.36 (-4.88 to 1.34)	0.063
Mother's height SDS	-1.75 $\pm$ 1.28	-1.96 (-4.8 to 1.44)	-1.45 $\pm$ 1.43	-1.18 (-4.2 to 1.44)	-1.82 $\pm$ 1.24	-1.86 (-4.80 to 1.16)	0.241
Father's skeletal anomalies	20 (21.5)		10 (50)		10 (13.6)		<b>0.0005</b>
Mother's skeletal anomalies	33 (33)		5 (25)		28 (35)		0.440

P-values < 0.05 are in bold. \*Bone age (years) related to chronological age; <sup>†</sup>SH/H  $\geq$  0.55 and/or AVH  $\leq$  0.96.

significance (VUS), were identified in 21/108 probands (19.4%) (Fig. 1A and Tables 2, 3). Variants were most frequently identified not only in *ACAN* ( $n=10$ ), followed by *IHH* ( $n=7$ ) (Fig. 1B) but also in four other genes, *CREBBP*, *COL2A1*, *EXT1*, and *PTPN11*. A total of 11/20 (55%) variants were classified as pathogenic or likely pathogenic (35% and 20%, respectively) whilst 9/20 (45%) were classified as VUS. Heterozygous variants were inherited in 17/20 probands (80.9%) whilst *de novo* events were likely to have occurred in 3/20 probands (14.2%), although germline mosaicism cannot be entirely excluded. Inheritance pattern could not be determined in proband 21 as the paternal sample was unavailable.

Clinical and molecular features of all probands with a pathogenic/likely pathogenic/VUS are shown respectively in Tables 2 and 3. The most characteristic radiographic traits of probands with *ACAN* and *IHH* variants are shown in Fig. 2. Pedigrees and radiographs from all probands with identified variants are shown in Supplementary Figs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8, respectively.

Statistically significant values were observed between those with a genetic variant and SH/H ratios, SH/H ratio SDS, SH/H ratio SDS >1, and father's skeletal traits (Table 1). Logistic regression analysis revealed a high concordance index (c) for SH/H ratio ( $c=0.697$ ) and SH/H ratio SDS ( $c=0.706$ ) and a moderate concordance index for father's skeletal traits ( $c=0.682$ ) and father's height ( $c=0.631$ ).

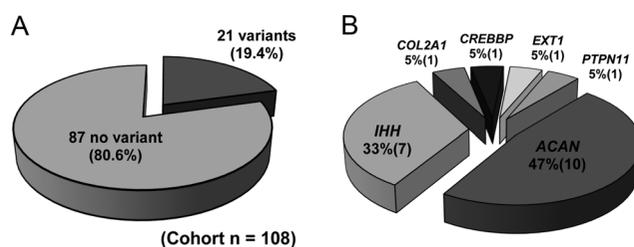
## Discussion

A pathogenic, likely pathogenic, or VUS was identified in a skeletal dysplasia associated gene in 19.4% of the cohort of 108 probands with short stature and mild skeletal anomalies. The majority of the variants were identified in two genes, *ACAN* and *IHH*. Although initial observations

suggested that *ACAN* variants were associated with short stature and advanced bone age, more recent work showed that they also occur in children with appropriate or delayed bone age with respect to chronological age (8, 9). In the 10 probands with *ACAN* variants in this cohort, 2 had advanced bone age, 6 had a bone age equal to their chronological age and two had delayed bone age. Both mild skeletal anomalies and/or dysmorphic facial features may occur, with brachydactyly being the most frequent finding in previous studies (9) and this was indeed true for all 10 probands with *ACAN* variants in this cohort. In individuals with *IHH* variants, brachydactyly was the only skeletal anomaly observed in addition to the short stature, as observed previously (10).

A total of 11/20 variants (55%) were classified as pathogenic or likely pathogenic, however, 9/20 (45%) were classified as VUS, 7 of these in *ACAN* and 2 in *IHH*. As with many genetic disorders, upgrading the classification of these variants is difficult for various reasons: 1) Performing functional studies is not often possible and indeed, to date, very few functional studies have been performed for variants in these genes (24); 2) Genotype: phenotype cosegregation studies are often hampered as assortative mating occurs in short stature; 3) gnomAD data are not stratified for height and these mild skeletal phenotypes remain undisclosed. As a consequence, many of these gene variants including clearly pathogenic variants are included in both the general and control data.

Single variants were also found in *COL2A1*, *CREBBP*, *EXT1*, and *PTPN11*. Proband 11 had a pathogenic *de novo* *COL2A1* variant, NM\_001844.4:c.2059G>A; p.(Gly687Ser), located in a glycine rich repeat of the triple helix of the alpha-1(II) chains of *COL2A1*. The girl presented with a slightly shortened trunk and mild kyphosis correlating with a type 2A collagenopathy. *COL2A1* variants have been observed previously in children with short stature without the expected skeletal features (25, 26, 27). Proband 12 was found to have a pathogenic *de novo* variant in *CREBBP*, NM\_004380.2:c.6324C>G; p.(Tyr2108\*). The read depth of the variant was 107, 60 wild type: 47 variant, thus, somatic mosaicism was not considered but no other tissue was tested. Mild skeletal and dysmorphic features, many of which do occur in Rubinstein-Taybi syndrome (MIM 180849) were present in the young girl, but her intellectual development was normal. Atypical Rubinstein-Taybi syndrome and variable expression have also been previously reported (28, 29, 30) and somatic mosaicism has been reported, although rare (31). Thus, both cases have indeed subtle and non-specific radiological signs which maybe attributable to their early age or mild forms of the dysplasia.



**Figure 1**

Summary of genetic findings in the cohort of 108 probands ( $n=108$ ).

**Table 2** Clinical, radiological, and genetic features of the 21 probands with an identified variant.

Proband	Gene	Variant	ACMG classification and Sherloc	Inheritance (PAT/MAT)	Sex (M/F)	Age (years)	Height SDS	BA: CA	SGA	Mid-parental height SDS (father/mother's height SDS)	SH/H (SH/H SDS)	Skeletal survey observations	Dysmorphic features
1	ACAN	c.371G>A p.(Arg124His)	VUS	AD (PAT)	F	8	-3.7	-2.0	No	-2.5 (-2.7/-2.2)	A/H (A/H SDS) 0.547 (0.57) 0.99 (0.23)	Brachydactyly, hiperlordosis, and coxa valga	Broad nose and filtrum, thin lips, and high arched palate
2	ACAN	c.903G>C p.(Trp301Cys)	VUS	AD (PAT)	F	7	-3.5	0	Yes	-3.6 (-4.4/-2.8)	NA	Brachydactyly, slender femora, coxa valga, and mild osteochondral knee defects	Frontal bossing, midface hypoplasia, and depressed nasal bridge
3	ACAN	c.1608C>A p.(Tyr536*)	P	AD (PAT)	F	4.5	-3.5	0	No	-3 (-4.5/-1.1)	0.603 (1) 0.98 (0.71)	Brachydactyly and mild osteochondral knee defects	No
4	ACAN	c.1608C>A p.(Tyr536*)	P	AD (PAT)	F	2.5	-3.0	1.5	No	-2.2 (-3.7/-0.7)	0.553 (0.88) 0.98 (1.4)	Brachydactyly	No
5	ACAN	c.1930G>A p.(Gly644Ser)	VUS	AD (PAT)	F	16	-2.1	0	No	-2 (-3.7/0.1)	0.57 (1.74) 0.93 (-3.5)	Brachydactyly, Madelung deformity, short femoral necks, and mild epiphyseal knee defects	No
6	ACAN	c.1948G >A p.(Val650Met)	VUS	AD (PAT)	M	12	-2.6	-3.0	No	-1.4 (-2.3/-0.7)	0.544 (1.24) 0.96 (-2.1)	Brachydactyly	Depressed nasal bridge, thin lips, and epicanthus
7	ACAN	c.2218A>T p.(Thr740Ser)	VUS	AD (MAT)	M	4	-3.2	0	Yes	-2.2 (-0.5/-3.7)	0.543 (-0.23†) 0.98 (-0.6†)	Brachydactyly	Frontal bossing, mid-face hypoplasia, high-arched palate, and triangular face
8	ACAN	c.2369C>G p.(Ser790*)	P	DE NOVO	M	14.5	-2.2	2.0	No	-0.6 (-1.7/0.4)	0.520 (0.42†) NA	Brachydactyly	Broad nose and filtrum, and hypertelorism
9	ACAN	c.6142C>G p.(Pro2048Ala)	VUS	AD (PAT)	F	12.5	-2.2	0	Yes	-2.1 (-2.1/-2.1)	NA	Syndactyly, polydactyly, and brachydactyly	No

Clinical Study		L Sentchordi-Montané and others	Genetics of mild skeletal anomalies		185:5	697							
10	ACAN	c.7276G>A p.(Glu2426Lys)	VUS	AD (PAT)	F	8.5	-2.5	0	Yes	-1.8 (-1.1/-2)	NA 0.966 (-1.5)	Brachydactyly, hyperlordosis, short femoral neck, and cone-shaped epiphysis	Frontal bossing and depressed nasal bridge
11	COL2A1	c.2059G>A p.(Gly687Ser)	P	DE NOVO	F	7	-3.8	0	No	-0.3 (0/-0.9)	0.549 (0.44) NA	Mild kyphosis and short trunk	Arched palate
12	CREBBP	c.6324C>G p.(Tyr2108*)	P	DE NOVO	F	7	-2.5	-2.0	Yes	-0.8 (-0.8/-0.8)	NA	Brachydactyly, broad thumbs, coxa valga, and genu valgo	Frontal bossing, synophrys, hyperlaxity, mild dysmorphia, hypertrichosis, and dental anomalies
13	EXT1	c.608A>G p.(Tyr203Cys)	LP	AD (PAT)	F	10.5	-2.5	ND	No	NA (-2.2/NA)	NA	None **	No
14	IHH	c.482_510del p.(Asn161Serfs*6)	LP	AD (PAT)	M	1.5	-3.8	0	Yes	-1.2 (-2.1/0)	NA	5th finger clinodactyly	No
15	IHH	c.797dupC p.(Arg267Thrfs*15)	P	AD (PAT)	F	8	-3.1	0	No	-2.6 (-3.3/-1.7)	0.555 (0.85) NA	Brachydactyly	No
16	IHH	c.823C>A p.(His275Asn)	VUS	AD (MAT)	F	7	-2.7	1.5	No	-1.6 (-2/-1.2)	0.56 (1) 0.979 (-0.06)	Brachydactyly	No
17	IHH	c.887_890del p.(Ser296Thrfs*68)	LP	AD (MAT)	M	5.5	-3.3	0	Yes	-2.4 (-1.6/-3.4)	NA	Brachydactyly	No
18	IHH	c.892G>A p.(Val298Met)	LP	AD (MAT)	M	16	-2.3	0	No	-1.4 (-0.8/-2.1)	0.557 (1.66) 0.93 (-3.99)	Brachydactyly	No
19	IHH	c.1202T>C p.(Phe401Ser)	VUS	AD (PAT***)	M	8	-4.0	-3.0	No	-3.5 (-3/-4.2)	0.545 (0.5) 0.99 (-0.21)	Brachydactyly	No
20	IHH	Complete deletion	P	AD (PAT)	F	5.7	-3.2	0	No	-1.8 (-3.1/-0.5)	0.58 (1.21) 0.99 (0.8)	Short 5th metacarpal, short 4th and 5th metatarsals	No
21	PTPN11	c.794G>A p.(Arg265Gln)	P	ND	F	4	-3.5	0	Yes	1.4 (1.06/1.44)	0.556 (0.08) 0.98 (0.87)	Brachytelephalangia	No

\*Transcripts: ACAN NM\_013227.3; COL2A1 NM\_001844.4; CREBBP NM\_004380.2; IHH NM\_002181.3; PTPN11 NM\_002834.3. \*\*Patient 13's father showed osteochondromas in both upper and lower limbs which had resulted in pain-free deformities. Variant classification was according to ACMG recommendations and Sherloc variant classification (22, 23). Inheritance: AD, autosomal dominant; PAT, paternally inherited; MAT, maternally inherited; AD PAT\*\*\* (predicted inheritance, two siblings with the genetic variant and the mother tested normal); †values in parentheses is S.D.; DE NOVO, de novo inheritance; ND, not determined due to lack of parental DNA samples. Sex: M, male; F, female; BA:CA: bone age related to chronological age according to Greulich and Pyle method (21). SGA, small for gestational age. SH/H, sitting Height/Height ratio. SH/H SDS, sitting height/Height ratio SDS according to Fredriks (19). Arm span/Height SDS (Arm span divided by height of the Maastricht reference population (20)); Not available data is represented with NA.

**Table 3** Genetic evaluation of the 20 heterozygous variants identified in the 21 probands in the cohort.

Proband	Gene	Heterozygous variant	Variant type	Inheritance (number of tested affected members)	gnomAD ALL MAF	Insilico analysis CADD V1.4/SIFT/Polyphe/ MutationTaster	ACMG variant classification and Sherloc variant criteria
1	ACAN	NM_013227.3:c.371G>A p.(Arg124His)	Missense	AD PAT (1)	0.0000201	24.1/Del/PbD/Dis	VUS (PP3)
2	ACAN	NM_013227.3:c.903G>C p.(Trp301Cys)	Missense	AD PAT (2)	Absent	33/Del/PbD/Dis	VUS (PM2 and PP3)
3, 4 <sup>†</sup>	ACAN	NM_013227.3:c.1608C>A p.(Tyr536*)	Nonsense	AD PAT (1) AD PAT (1)	Absent	42/-/-	Pathogenic (PVS1, PM2, and PP3)
5	ACAN	NM_013227.3:c.1930G>A p.(Gly644Ser)	Missense	AD PAT (1)	0.0000686	26.1/Del/PbD/Dis	VUS (PP3)
6	ACAN	NM_013227.3:c.1948G>A p.(Val650Met)	Missense	AD PAT (1)	0.0001617	28.2/Del/PbD/Dis	VUS (PP3)
7	ACAN	NM_013227.3:c.2218A>T p.(Thr740Ser)	Missense	AD MAT (1)	0.0000397	23.9/Del/PbD/Dis	VUS (PP3)
8	ACAN	NM_013227.3:c.2369C>G p.(Ser790*)	Nonsense	DE NOVO	Absent	35/-/-	Pathogenic (PVS1, PS2, PM2, and PP3)
9	ACAN	NM_013227.3:c.6142C>G p.(Pro2048Ala)	Missense	AD PAT (1)	0.0001284	17.4/Del/PbD/Poly	VUS (PP3)
10	ACAN	NM_013227.3:c.7276G>A p.(Glu2426Gly)	Missense	AD PAT (1)	0.0001426	33/Del/PbD/Dis	VUS (PP3)
11	COL2A1	NM_001844.4:c.2059G>A p.(Gly687Ser)	Missense	DE NOVO	Absent	32/Del/PbD/Dis	Pathogenic (PS2, PM1, PM2, PM5, PP3, and PP4)
12	CREBBP	NM_004380.2:c.6324C>G p.(Tyr2108*)	Nonsense	DE NOVO	Absent	38/-/-	Pathogenic (PVS1, PS2, PM2, and PP3)
13	EXT1	NM_002181.3:c.608A>G p.(Tyr203Cys)	Missense	AD PAT (1)	Absent	32/Del/PbD/Dis	Likely pathogenic (PM1, PM2, PP3, and PP5)
14	IHH	NM_002181.3:c.482_510del p.(Asn161Serfs*6)	Frameshift	AD PAT (2)	Absent	-/-/-	Likely pathogenic (PVS1 and PM2)
15	IHH	NM_002181.3:c.797dup p.(Arg267Thrfs*15)	Frameshift	AD PAT (1)	Absent	-/-/-	Pathogenic (PVS1 and PM2)
16	IHH	NM_002181.3:c.823C>A p.(His275Asn)	Missense	AD MAT (1)	Absent	25.8/Del/PbD/Dis	VUS (PM2, PP1, PP2, and PP3)
17	IHH	NM_002181.3:c.887_890del p.(Ser296Thrfs*68)	Frameshift	AD MAT (1)	Absent	-/-/-	Likely pathogenic (PVS1 and PM2)
18	IHH	NM_002181.3:c.892G>A p.(Val298Met)	Missense	AD MAT (4)	0.0000243	33/Del/PbD/Dis	Likely pathogenic (PM2, PP1, PP2, PP3, and PP4)
19	IHH	NM_002181.3:c.1202T>C p.(Phe401Ser)	Missense	AD PAT* (1)	Absent	29.2/Tol/PbD/Dis	VUS (PM2 and PP3)
20	IHH	Complete deletion	Deletion	AD PAT (1)	Absent	-/-/-	Pathogenic (PVS1, PS2, and PM2)
21	PTPN11	NM_002834.3:c.794G>A p.(Arg265Gln)	Missense	NA	0.0000324	32/Del/PbD/Dis	Pathogenic (PS3, PS4, PM1, PP2, PP3, and PP5)

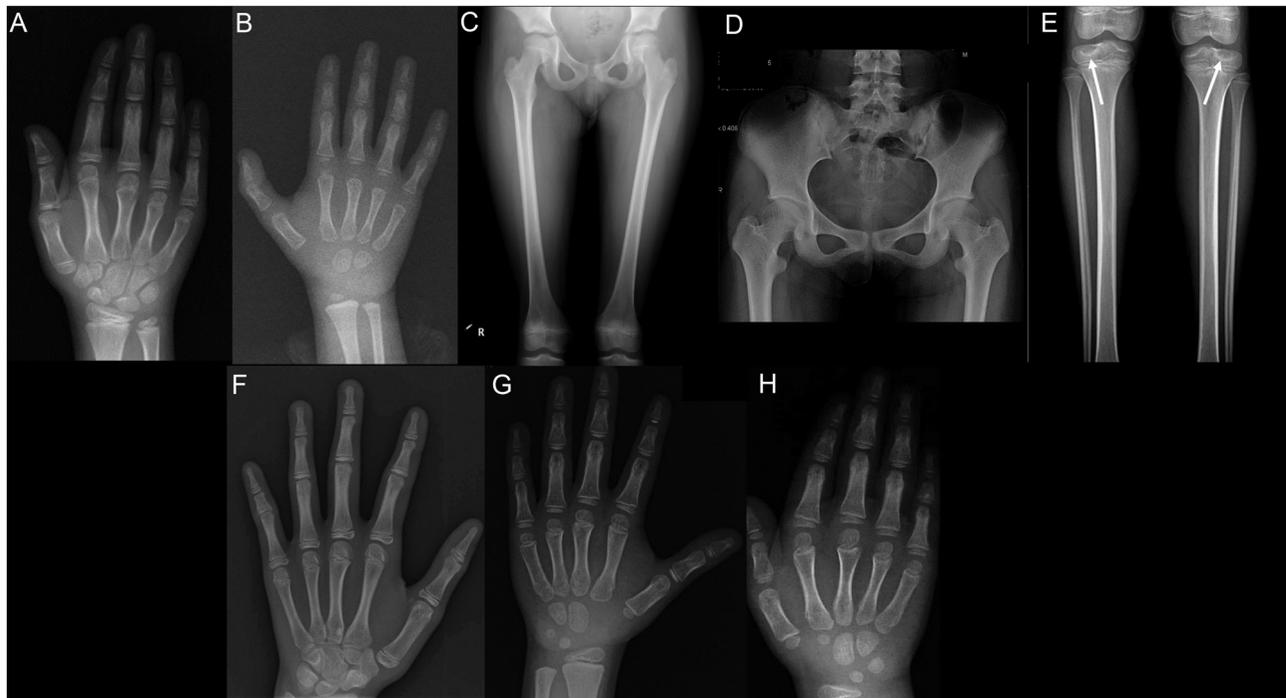
<sup>†</sup>Although probands 3 and 4 share the same variant, they belong to different families – the variant was inherited from the father in both cases (AD PAT). Variants were classified according to ACMG classification criteria and Sherloc variant classification (22, 23).  
AD, autosomal dominant; MAT, maternal; PAT, paternal; NA, not available; AD PAT\* (predicted inheritance, two siblings with the genetic variant and the mother tested normal); SIFT, Del, deleterious; Polyphen: PbD, probably damaging; MutationTaster: Dis, disease-causing; Poly, polymorphism.



Proband 13 carries a likely pathogenic variant in *EXT1*. No osteochondromas or abnormal skeletal findings were detected in the female proband; nonetheless, her father was reported to have supposedly Madelung deformity. We subsequently requested to review his radiographs, where we indeed observed osteochondromas in both upper and lower limbs, which had resulted in pain-free deformities. Proband 21 had mildly disproportionate short stature and microcephaly. A pathogenic *PTPN11* variant, p.(Arg265Gln) was identified, which has been shown to increase the protein tyrosine phosphatase catalytic activity (31). This variant has been found in children with a relatively mild form of Noonan syndrome, characterized by a low prevalence of cardiac defects, and cognitive and behavioral issues, as well as less evident typical facial features (32). The unaffected mother tested negative for the variant. Unfortunately, the father was not available for testing to determine if it was *de novo* or inherited but, he had normal height (+1 SDS) and no Noonan-related

clinical features. After the diagnosis, a cardiac ultrasound and an audiological examination were performed, both of which were normal. These cases illustrate how phenotypes of well-known conditions can be atypical or mild and how NGS resolved the molecular cause.

Surprisingly no pathogenic or likely pathogenic or VUS were identified in *NPR2* or *FGFR3* in this cohort. A *NPR2* variant, NM\_003995.3:c.2644G>A p.(Val882Ile), initially classified as a VUS was identified in one proband, but after performing a three generation cosegregation analysis, the variant was reclassified as likely benign. Thus, it is important to perform either extensive cosegregation studies or functional studies. Children with hypochondroplasia may either have a more defined phenotype, not compliance with the inclusion criteria defined for this study, and/or have been previously screened for the *FGFR3* hotspot regions by direct sequencing, available in many laboratories. The true prevalence of heterozygous *NPR2* and *FGFR3* variants is unknown. Other studies similar to this one but



**Figure 2**

Summary of the main skeletal findings in probands with *ACAN* and *IHH* variants. Radiographs from patients with *ACAN* variants: (A) Hand radiograph proband 2 (female 7 years): mild brachydactyly; (B) Hand radiograph proband 7 (male 4 years): mild brachydactyly; (C) Hip radiograph proband 2 (female 7 years): Coxa valga, slender femora; (D) Hip radiograph proband 5 (female 14 years): short femoral necks; (E) Knee radiograph proband 2 (female 7 years): osteochondral defects in both proximal tibiae (white arrows). Hand radiographs from patients with *IHH* variants: (F) Proband 16 (female 7 years): middle phalanx shortening of 5th finger; (G) Proband 19 (male 8 years): Mild middle phalanx shortening of 5th finger; (H) Proband 20 (female 5.7 years): middle phalanx shortening of 2nd and 5th fingers.

Clinical Study		L Sentchordi-Montané and others	Genetics of mild skeletal anomalies	185:5	700		
<b>Table 4</b> Summary of previous published NGS studies (2021–2013) performed in short stature children.							
Reference	Cohort number and inclusion criteria	Clinical assessment	Screening methodology	Additional genetic studies	Variants identified in following genes	ACMG variant classification and Sherloc	% Diagnostic yield (n° positive/total)
Current study	108 children with short stature and mild skeletal defects present in proband or parent ( <i>SHOX</i> defects previously excluded)	SD specialized pediatric endocrinology and radiology assessments	Targeted skeletal dysplasia panel (327–416 genes)	Family testing by Sanger, SNP arrays, or MLPA	<i>ACAN</i> (10), <i>COL2A1</i> , <i>CREBBP</i> , <i>EXT1</i> , <i>IHH</i> (7), and <i>PTPN11</i>	Pathogenic 7 Likely pathogenic 4 VUS 9	19.4% (21/108)
Fan <i>et al.</i> (33)	561 short stature children (257 isolated short stature and 304 syndromic short stature)	NR	WES	-	Isolated short stature (ISS): <i>ACAN</i> (3), <i>AQP2</i> , <i>BLM</i> , <i>COL2A1</i> , <i>FGFR3</i> , <i>FBN1</i> , <i>GH1</i> , <i>GLI2</i> , <i>IGFR1</i> , <i>NF1</i> , <i>NPR2</i> , <i>PHEX</i> , <i>POU1F1</i> , <i>PTPN11</i> (3), <i>ROR2</i> , and <i>STAT5B</i>	Pathogenic (NR) Likely pathogenic (NR)	ISS: 11.3% (29/257) Syndromic short stature: 34.9% (106/304)
Perchard <i>et al.</i> (34)	263 prepubertal ISS children (IGF-1 deficiency, dysmorphic signs, and disproportionate short stature)	Pediatric endocrinology assessment	Targeted growth panel (232 genes)	-	<i>ACAN</i> (2), <i>FANCB</i> , <i>GDF5</i> , <i>GH1</i> , <i>GNAS</i> (2), <i>HRAS</i> , <i>IGF1R</i> (5), <i>IKBKKG</i> , <i>LHX4</i> , <i>MMP13</i> (2), <i>NOG</i> , <i>NPR2</i> (3), <i>OBSL1</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RUNX2</i> , and <i>TP63</i> (18 variants belonging to growth plate genes)	Pathogenic 2 Likely pathogenic 25	10% (27/263)
Homma <i>et al.</i> (27)	44 children born SGA with short stature and additional features, such as dysmorphic face, major malformation, developmental delay, and/or intellectual disability.	Clinical dysmorphology assessment	WES	Candidate gene testing, array-CGH and/or target panel sequencing	<i>ACTG1</i> , <i>AFF4</i> , <i>ANKRD11</i> , <i>BCL11B</i> , <i>BRCA1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>COL2A1</i> (2), <i>GIN51</i> , <i>INPP5K</i> , <i>KIF11</i> , <i>KMT2A</i> , <i>POC1A</i> , and <i>SRCAP</i> (2)	Pathogenic 11 Likely pathogenic 4	34% (15/34)
Freire <i>et al.</i> (26)	55 isolated short stature children (SGA cohort: minor malformations and disproportion not excluded)	Pediatric endocrinology assessment	WES or targeted panel (388 genes)	-	<i>ACAN</i> , <i>IHH</i> (2), <i>NF1</i> , <i>NPR2</i> (2), <i>SHOX</i> , and <i>PTPN11</i>	Pathogenic 3 Likely pathogenic 5	14.5% (8/55)

Clinical Study		L Sentchordi-Montané and others	Genetics of mild skeletal anomalies	185:5	701		
Huang <i>et al.</i> (35)	114 severe short stature children (heterogenous cohort; 15.8% isolated short stature)	Pediatric endocrinology assessment	WES or targeted panel	Array-CGH	ALPL, BLM, BRAF, COL1A1, COL1A2, COMP, CREBBP, DCHS1, ERCC8, FBN1, FGFR3 (6), GALNS, GH1, GLB1, HDAC8, HRAS, KIF22, KMT2A, KRAS, MATN3, NAA10, OBSL1, PYCR1, RAF1 (2), RUNX2, SLC12A3 (2), SPINK5, SRCAP, and VPS13B	Pathogenic 19 Likely pathogenic 13 VUS 4	33.3% (38/114)
Yang <i>et al.</i> (36)	91 short stature children (SGA excluded)	Clinical assessment (not specified)	Targeted growth panel (166 genes)	NR	ACAN, COL2A1, COMP, HOXD13, PTPN11 (3), and SOS	Pathogenic 6 Likely pathogenic 2	8.7% (8/91)
Hauer <i>et al.</i> (25)	200 short stature children (isolated or syndromic*; (after extensive genetic evaluation)	Clinical geneticist	WES	Target genetic testing (when suspected)	ACAN (5), ANKRD11, CASK, CLCN5, COL2A1 (2), CUL7, FGD1, FGFR3, FLNB, GHSR, HDAC6, IFT140, IGFA1R, IHH, KAT6B, KDM6A (2), MAP2K1, MATN3, NF1, NPR2 (3), PDE3A, PDE4D, PTPN11, SLC26A2, and TRIM37	Pathogenic 19 Likely pathogenic 14	16.5% (33/200)
Kim <i>et al.</i> (37)	11 syndromic short stature children*	Clinical assessment (not specified)	TruSight One Panel (4813 genes)	Karyotyping, array-CGH, Sanger (based on suspicion)	CDT1, DYRK1A, NBAS, RPS6KA3, and TRPS,	Pathogenic 5	45% (5/11)
Hattori <i>et al.</i> (38)	86 ISS probands Exclusion criteria: SGA, skeletal malformations and dysmorphic features (SHOX defects previously excluded)	Clinical assessment (not specified)	Targeted panel (10 genes: ACAN, FGFR3, NPR2, GHRHR, GH1, GHR, STAT5B, IGF1, IGFBP3, and IGF1R)	Targeted panel (10 genes: ACAN, FGFR3, NPR2, GHRHR, GH1, GHR, STAT5B, IGF1, IGFBP3, and IGF1R)	ACAN (4), FGFR3 (2), GHRHR (2), GHR, and IGFBP3	Likely pathogenic 4 VUS 6	11.6% (10/86)
Guo <i>et al.</i> (39)	14 syndromic severe short stature children	Pediatric endocrinology ± genetic assessment	WES	Array-CGH or SNP array	B4GALT7, CUL7, FAM111A, SRCAP, and OBSL1	NR	35.7% (5/14)
Wang <i>et al.</i> (40)	192 syndromic short stature children	NR	Targeted: panel (1077 genes-short stature/growth plate biology)	NR	IGF1R, PTPN11 (3), and TRPV4	Pathogenic 5	2.6% (5/192)

\*Syndromic short stature refers to a child with additional features such as dysmorphic features, medical comorbidities, body disproportion, developmental delay or other accompanying anomalies. Variant classification according to ACMG recommendations and Sherloc variant classification (22, 23). Genes marked in bold represent those in which variants were also detected in our study. NR, not reported; SD, skeletal dysplasia; VUS, variant of unknown significance.

including larger cohort sizes (see Table 4) have identified a few *NPR2* and *FGFR3* variants in ISS and SGA probands. However, data from our diagnostic referrals and those of others (25, 34) suggest that the incidence of *NPR2* variants is lower than originally reported (15, 41). The increasing use of whole genome sequencing may reveal the presence of deep-intronic variants which affect splicing or variants in non-coding regulatory regions such as those identified recently in *POU1F1* (42).

Statistical analysis was performed on the obtained data for the entire cohort and for two subgroups, those with and without an identified genetic defect. Lower limb shortening (determined by the SH/H ratio) and a father with a skeletal anomaly were found to be statistically significant. A total of 12/16 (75%) variants were inherited from the father but we consider this incidental rather than a true factor. Other features that were important for inclusion into the cohort did not reach statistical significance, for example, A/H ratio, brachydactyly, which was the most frequent observed trait, or an abnormal skeletal survey. We hypothesize that the small number of patients with a genetic defect ( $n=21$ ), the wide age range and ranges of some of the variables, for example, A/H SDS ranged from -4.37 to +4.60 and the lack of data in some categories make the results difficult to interpret.

With the aim of forming a homogeneous study cohort, the clinical and radiological characterization of the 108 probands has been extensive. Unlike other studies with more heterogeneous cohorts or less restrictive selection criteria (summarized in Table 4) (25, 26, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40), we pursued an accurate estimation of the prevalence of genetic variants in skeletal dysplasia genes in such individuals. However, study limitations do still exist: (1) The probands have been assessed by different clinicians, although the completed questionnaires and x-rays were subsequently examined by the same pediatric endocrinologist and radiologist, both with experience in skeletal dysplasia evaluation; (2) Mild skeletal defects are difficult to evaluate post growth plate closure so parental x-ray evaluation is hampered; (3) Statistical analysis is always impaired due to missing data; and (4) Lack of a validated criteria to define brachydactyly which is considered either as a clinical/anthropometric feature or as a radiological trait (43). To minimize these biases, the skeletal surveys were reviewed by the same pediatric radiologist.

A criticism of the molecular analysis performed in this study is that a large customized skeletal dysplasia NGS panel was utilized rather than whole exome sequencing

(WES). However, we wanted to determine the incidence of variants in skeletal dysplasia genes not the incidence of all genetic defects in this cohort so clearly WES would be the ideal technique but this was not undertaken at the onset of the project.

Previously published studies using NGS to investigate the genetic cause of short stature are summarized in Table 4, although the design, technology, and even the aim of the studies are different between them (25, 26, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40). Some include syndromic patients and others are more similar to ours, examining ISS, isolated short stature or short stature with mild dysmorphias/skeletal defects children with different clinical assessments. As expected, the diagnostic yield is higher when syndromic short stature probands are tested, with detection rates ranging from 33–45% (25, 27, 33, 35, 37, 39, 40) compared to non-syndromic cohorts, 8.7–19.5% (26, 33, 34, 36, 38, this study). This is particularly shown by a recent WES study which included both groups, whereby the detection rate was 11.3% for ISS cases ( $n=257$ ) but 34.9% for syndromic short stature cases ( $n=304$ ; (33)). In the studies of non-syndromic cases, three used targeted panels (including ours) resulting in diagnostic yields of 8.7–19.5%; one of the studies used a combination of targeted panels and WES and obtained a yield of 14.5%, and the remaining study performed WES and obtained a diagnostic yield of 11.3%, thus, no differences were observed between different NGS methodologies in non-syndromic cases. On the other hand, in syndromic cohorts, the majority of the studies included WES or WES/targeted panels with yields of 33–45% whilst in one study from 2013, which included the screening of 192 severe syndromic short stature children using a large panel of 1077 genes implicated in short stature and growth plate biology, the yield was only 2.6% (40). This data suggests that panels or WES virtual panels may be adequate for non-syndromic cases whilst WES improves the detection rate in syndromic cases.

The search for the underlying pathogenic cause in the remaining 80.6% of probands remains a challenge. WES or whole genome sequencing (WGS) may reveal variants in other genes but probably in a small proportion. As short stature is present in 3% of the population, WES or WGS is still not realistically feasible to perform in all these children especially as the likelihood of identifying a single causative genetic defect remains low plus short stature is often a polygenic trait (44, 45). Further studies should be focused on discovering new genes as well as other etiopathogenic mechanisms. WGS in combination with transcriptome sequencing and sequencing-based DNA methylation

analysis of the whole genome, will hopefully provide additional information.

Classical guidelines have been created focusing on the medical evaluation of children with ISS, SGA, or GHD (46, 47, 48) but they rely upon standard physical examination and laboratory parameters that assess organic causes of growth failure, such as renal dysfunction, hypothyroidism, celiac disease, inflammatory disorders, and assessment of the GH axis, either via measurement of GH-dependent factors, such as IGF-I or IGF binding protein-3, or through direct measurement of GH levels after stimulation. Recent guidelines propose an approach based on medical history, detailed physical examination, and analysis of individual growth curves with the aim of collecting diagnostic clues before conducting laboratory exams and left hand-wrist x-ray (49). After this first evaluation the clinician should have enough data to suspect primary or secondary growth disorders or by contrast an idiopathic short stature before planning the next diagnostic steps.

The high detection of variants in skeletal dysplasia genes in our study outlines the importance of a detailed clinical and radiological examination, looking for clues for primary growth disorders. Dominant inheritance of short stature and family history of early osteoarthritis or discopathy should also be investigated in family members. Complete anthropometric measurements and screening of external habitus (scoliosis, hyperlordosis, genu varum/valgum, size, and shape of hands, etc) should be performed in not only the child but also their parents and siblings. A careful radiological hand examination in the patient (not only bone maturation) is frequently very informative. Indications for performing a skeletal survey have not been established in short stature patients with mild skeletal defects. According to this study, one should be performed when a child has disproportionate short stature and/or the presence of a mild skeletal anomaly or if a parent has these features. In order to minimise radiation exposure, expert recommendations suggest a series of x-rays in patients with suspected bone disease: skull (anterior-posterior (AP) and lateral), thoracolumbar spine (AP and lateral), thorax, pelvis, one upper limb, one lower limb, and both hands (50). Other projections should be performed when other skeletal features are present.

The authors, therefore, encourage pediatric endocrinologists and other specialists to closely examine for skeletal anomalies, both in the child and in their parents, which may orientate them as to whether they should perform NGS genetic testing of skeletal dysplasia genes and if performed, to aid variant classification.

#### Supplementary materials

This is linked to the online version of the paper at <https://doi.org/10.1530/EJE-21-0557>.

#### Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

#### Funding

This work was supported from a grant (SAF2017-84646-R and PID2020-116263RB-I00) from the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (to K E H), and cofunded by the 'Fondo Europeo de Desarrollo Regional' (FEDER). L S-M and K E H have received awards from Fundación SEEP. F D-G was supported by an FPU studentship from the Spanish Ministry of Education (MEC).

#### Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the families for their participation in this study.

#### References

- Grosse G, Hilger A, Ludwig M, Reutter H, Lorenzen F, Even G, Holterhus PM, Woelfle J & German GHI Study Group. Targeted resequencing of putative growth-related genes using whole exome sequencing in patients with severe primary IGF-I deficiency. *Hormone Research in Paediatrics* 2017 **88** 408–417. (<https://doi.org/10.1159/000480505>)
- Blum WF, Klammt J, Anselem S, Pfäffle HM, Legendre M, Sobrier ML, Luton MP, Child CJ, Jones C, Zimmermann AG *et al*. Screening a large pediatric cohort with GH deficiency for mutations in genes regulating pituitary development and GH secretion: frequencies, phenotypes and growth outcomes. *EBiomedicine* 2018 **36** 390–400. (<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.026>)
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M *et al*. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genetics* 1997 **16** 54–63. (<https://doi.org/10.1038/ng0597-54>)
- Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, Häcker B, Rao E, Karperien M, Wit JM *et al*. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2004 **279** 37103–37114. (<https://doi.org/10.1074/jbc.M307006200>)
- Marchini A, Ogata T & Rappold GA. A track record on SHOX: From basic research to complex models and therapy. *Endocrine Reviews* 2016 **37** 417–448. (<https://doi.org/10.1210/er.2016-1036>)
- Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Rodríguez-Estevéz A, Rica-Etxebarria I, Gracia R, Campos-Barros A & Heath KE. Identification of the first PARI deletion encompassing upstream SHOX enhancers in a family with idiopathic short stature. *European Journal of Human Genetics* 2012 **20** 125–127. (<https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.210>)

- 7 Binder G. Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Hormone Research in Paediatrics* 2011 **75** 81–89. (<https://doi.org/10.1159/000324105>)
- 8 Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, Crocker M, Douglas J, Dunbar N, Fairchild J, Funari MF, Heath KE, Jorge AA *et al.* Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2017 **102** 460–469. (<https://doi.org/10.1210/jc.2016-3313>)
- 9 Sentchordi-Montané L, Aza-Carmona M, Benito-Sanz S, Barreda-Bonís AC, Sánchez-Garre C, Prieto-Matos P, Ruiz-Ocaña P, Lechuga-Sancho A, Carcavilla-Urqui A, Mulero-Collantes I *et al.* Heterozygous aggrecan variants are associated with short stature and brachydactyly: description of 16 probands and a review of the literature. *Clinical Endocrinology* 2018 **88** 820–829. (<https://doi.org/10.1111/cen.13581>)
- 10 Sentchordi-Montané L, Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Pereda A, Parrón-Pajares M, de la Torre C, Vasques GA, Funari MFA, Travessa AM, Dias P *et al.* Clinical and molecular description of 16 families with heterozygous IHH variants. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2020 **105**. (<https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa218>)
- 11 Bober MB, Bellus GA, Nikkel SM & Tiller GE. Hypochondroplasia. In *GeneReviews*®. Eds MP Adam, HH Ardinger, RA Pagon, SE Wallace, LJ Bean, G Mirzaz & A Amemiya. Seattle (WA): University of Washington, 1993.
- 12 Kant SG, Cervenková I, Balek L, Trantirek L, Santen GW, de Vries MC, van Duyvenvoorde HA, van der Wielen MJ, Verkerk AJ, Uitterlinden AG *et al.* A novel variant of FGFR3 causes proportionate short stature. *European Journal of Endocrinology* 2015 **172** 763–770. (<https://doi.org/10.1530/EJE-14-0945>)
- 13 Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL & Niesler B. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *Journal of Medical Genetics* 2007 **44** 306–313. (<https://doi.org/10.1136/jmg.2006.046581>)
- 14 Benito-Sanz S, Royo JL, Barroso E, Paumard-Hernández B, Barreda-Bonís AC, Liu P, Gracia R, Lupski JR, Campos-Barros Á, Gómez-Skarmeta JL *et al.* Identification of the first recurrent PARI1 deletion in Léri-Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel SHOX enhancer. *Journal of Medical Genetics* 2012 **49** 442–450. (<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100678>)
- 15 Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, Belinchón A, Barreda-Bonís AC, Vasques GA, Ramirez J, Luzuriaga C, Carlone G, González-Casado I *et al.* Heterozygous NPR2 mutations cause disproportionate short stature, similar to Léri-Weill dyschondrosteosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2015 **100** E1133–E1142. (<https://doi.org/10.1210/jc.2015-1612>)
- 16 Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, Aza-Carmona M, Sentchordi-Montané L, Barraza-García J, Lerario AM, Yamamoto GL, Naslavsky MS, Duarte YAO *et al.* IHH gene mutations causing short stature with nonspecific skeletal abnormalities and response to growth hormone therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2018 **103** 604–614. (<https://doi.org/10.1210/jc.2017-02026>)
- 17 Hoyme HE. Minor malformations. Significant or insignificant? *American Journal of Diseases of Children* 1987 **141** 947. (<https://doi.org/10.1001/archpedi.1987.04460090024014>)
- 18 Sánchez González E, Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Ferrández Longás A, López de Lara D & López-Siguero JP. Estudios españoles de crecimiento: situación actual, utilidad y recomendaciones de uso. *Anales de Pediatría* 2011 **74** 193.e1–193.e16. (<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2010.10.005>)
- 19 Fredriks AM, van Buuren S, van Heel WJ, Dijkman-Neerincx RH, Verloove-Vanhorick SP & Wit JM. Nationwide age references for sitting height, leg length, and sitting height/height ratio, and their diagnostic value for disproportionate growth disorders. *Archives of Disease in Childhood* 2005 **90** 807–812. (<https://doi.org/10.1136/adc.2004.050799>)
- 20 Gerver WJ & de Bruin R. *Paediatric Morphometrics: A Reference Manual*, 2nd ed. Maastricht: University Press Maastricht, 2001.
- 21 Pyle SI & Greulich WW. *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*, 2nd ed. Stanford: Stanford University Press, 1950.
- 22 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015 **17** 405–424. (<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>)
- 23 Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, Kobayashi Y, Patil N, Thusberg J, Westbrook M *et al.* Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genetics in Medicine* 2017 **19** 1105–1117. (<https://doi.org/10.1038/gim.2017.37>)
- 24 Ma G, Yu J, Xiao Y, Chan D, Gao B, Hu J, He Y, Guo S, Zhou J, Zhang L *et al.* Indian hedgehog mutations causing brachydactyly type A1 impair Hedgehog signal transduction at multiple levels. *Cell Research* 2011 **21** 1343–1357. (<https://doi.org/10.1038/cr.2011.76>)
- 25 Hauer NN, Popp B, Schoeller E, Schuhmann S, Heath KE, Hisado-Oliva A, Klinger P, Kraus C, Trautmann U, Zenker M *et al.* Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genetics in Medicine* 2018 **20** 630–638. (<https://doi.org/10.1038/gim.2017.159>)
- 26 Freire BL, Homma TK, Funari MFA, Lerario AM, Vasques GA, Malaquias AC, Arnhold IJP & Jorge AAL. Multigene sequencing analysis of children born small for gestational age with isolated short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2019 **104** 2023–2030. (<https://doi.org/10.1210/jc.2018-01971>)
- 27 Homma TK, Krepischki ACV, Furuya TK, Honjo RS, Malaquias AC, Bertola DR, Costa SS, Canton AP, Roela RA, Freire BL *et al.* Recurrent copy number variants associated with syndromic short stature of unknown cause. *Hormone Research in Paediatrics* 2018 **89** 13–21. (<https://doi.org/10.1159/000481777>)
- 28 Bartsch O, Locher K, Meinecke P, Kress W, Seemanová E, Wagner A, Ostermann K & Rödel G. Molecular studies in 10 cases of Rubinstein-Taybi syndrome, including a mild variant showing a missense mutation in codon 1175 of crebbp. *Journal of Medical Genetics* 2002 **39** 496–501. (<https://doi.org/10.1136/jmg.39.7.496>)
- 29 Bartsch O, Kress W, Kempf O, Lechno S, Haaf T & Zechner U. Inheritance and variable expression in Rubinstein-Taybi syndrome. *American Journal of Medical Genetics: Part A* 2010 **152A** 2254–2261. (<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33598>)
- 30 Menke LA, van Belzen MJ, Alders M, Cristofoli F, DDD Study, Ehmke N, Fergelot P, Foster A, Gerkes EH, Hoffer MJ *et al.* Crebbp mutations in individuals without Rubinstein-Taybi syndrome phenotype. *American Journal of Medical Genetics: Part A* 2016 **170** 2681–2693. (<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37800>)
- 31 de Vries TI, Monroe GR, van Belzen MJ, van der Lans CA, Savelberg SM, Newman WG, van Haaften G, Nievelstein RA & van Haelst MM. Mosaic crebbp mutation causes overlapping clinical features of Rubinstein-Taybi and Filippi syndromes. *European Journal of Human Genetics* 2016 **24** 1363–1366. (<https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.14>)
- 32 Pannone L, Bocchinfuso G, Flex E, Rossi C, Baldassarre G, Lissewski C, Pantaleoni F, Consoli F, Lepri F, Magliozzi M *et al.* Structural, functional, and clinical characterization of a novel PTPN11 mutation cluster underlying Noonan syndrome. *Human Mutation* 2017 **38** 451–459. (<https://doi.org/10.1002/humu.23175>)
- 33 Fan X, Zhao S, Yu C, Wu D, Yan Z, Fan L, Song Y, Wang Y, Li C, Ming Y *et al.* Exome sequencing reveals genetic architecture in patients with isolated or syndromic short stature. *Journal of Genetics and Genomics* 2021 **48** 396–402. (<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.02.008>)
- 34 Perchard R, Murray PG, Payton A, Highton GL, Whatmore A & Clayton PE. Novel mutations and genes that impact on growth in short stature of undefined aetiology: the EPIGROW study. *Journal of*

- the Endocrine Society* 2020 **4** bvaa105. (<https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa105>)
- 35 Huang Z, Sun Y, Fan Y, Wang L, Liu H, Gong Z, Wang J, Yan H, Wang Y, Hu G *et al.* Genetic evaluation of 114 Chinese short stature children in the next generation era: a single center study. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018 **49** 295–305. (<https://doi.org/10.1159/000492879>)
- 36 Yang L, Zhang C, Wang W, Wang J, Xiao Y, Lu W, Ma X, Chen L, Ni J, Wang D *et al.* Pathogenic gene screening in 91 Chinese patients with short stature of unknown etiology with a targeted next-generation sequencing panel. *BMC Medical Genetics* 2018 **19** 212. (<https://doi.org/10.1186/s12881-018-0730-6>)
- 37 Kim YM, Lee YJ, Park JH, Lee HD, Cheon CK, Kim SY, Hwang JY, Jang JH & Yoo HW. High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing. *Clinical Genetics* 2017 **92** 594–605. (<https://doi.org/10.1111/cge.13038>)
- 38 Hattori A, Katoh-Fukui Y, Nakamura A, Matsubara K, Kamimaki T, Tanaka H, Dateki S, Adachi M, Muroya K, Yoshida S *et al.* Next generation sequencing-based mutation screening of 86 patients with idiopathic short stature. *Endocrine Journal* 2017 **64** 947–954. (<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0150>)
- 39 Guo MH, Shen Y, Walvoord EC, Miller TC, Moon JE, Hirschhorn JN & Dauber A. Whole exome sequencing to identify genetic causes of short stature. *Hormone Research in Paediatrics* 2014 **82** 44–52. (<https://doi.org/10.1159/000360857>)
- 40 Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, Miller TC, Moon JE, Derr MA, Hwa V, Hirschhorn JN & Dauber A. Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 **98** E1428–E1437. (<https://doi.org/10.1210/jc.2013-1534>)
- 41 Vasques GA, Arnhold IJP & Jorge AAL. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Hormone Research in Paediatrics* 2014 **82** 222–229. (<https://doi.org/10.1159/000365049>)
- 42 Gergics P, Smith C, Bando H, Jorge AAL, Rockstroh-Lippold D, Vishnopolska SA, Castinetti F, Maksutova M, Carvalho LRS, Hoppmann J *et al.* High-throughput splicing assays identify missense and silent splice-disruptive POU1F1 variants underlying pituitary hormone deficiency. *American Journal of Human Genetics* 2021 **108** 1526–1539. (<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.06.013>)
- 43 Temtamy SA & Aglan MS. Brachydactyly. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2008 **3** 1–16.
- 44 Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, Lo KS, Wood AR, Kjaer TR, Fine RS, Lu Y, Schurmann C, Highland HM *et al.* Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature* 2017 **542** 186–190. (<https://doi.org/10.1038/nature21039>)
- 45 Hauer NN, Popp B, Taher L, Vogl C, Dhandapanay PS, Büttner C, Uebe S, Sticht H, Ferrazzi F, Ekici AB *et al.* Evolutionary conserved networks of human height identify multiple Mendelian causes of short stature. *European Journal of Human Genetics* 2019 **27** 1061–1071. (<https://doi.org/10.1038/s41431-019-0362-0>)
- 46 Collett-Solberg PF, Ambler G, Backeljauw PF, Bidlingmaier M, Biller BMK, Boguszewski MCS, Cheung PT, Choong CSY, Cohen LE, Cohen P *et al.* Diagnosis, genetics, and therapy of short stature in children: a Growth Hormone Research Society International Perspective. *Hormone Research in Paediatrics* 2019 **92** 1–14. (<https://doi.org/10.1159/000502231>)
- 47 Argente J, Tatton-Brown K, Lehwalder D & Pfäffle R. Genetics of growth disorders – which patients require genetic testing? *Frontiers in Endocrinology* 2019 **10** 602. (<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00602>)
- 48 Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM & 2007 ISS Consensus Workshop Participants. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 4210–4217. (<https://doi.org/10.1210/jc.2008-0509>)
- 49 Wit JM, Kamp GA, Oostdijk W & on behalf of the Dutch Working Group on Triage and Diagnosis of Growth Disorders in Children. Towards a rational and efficient diagnostic approach in children referred for growth failure to the general paediatrician. *Hormone Research in Paediatrics* 2019 **91** 223–240. (<https://doi.org/10.1159/000499915>)
- 50 Offiah AC & Hall CM. Radiological diagnosis of the constitutional disorders of bone. As easy as A, B, C? *Pediatric Radiology* 2003 **33** 153–161. (<https://doi.org/10.1007/s00247-002-0855-8>)

Received 26 May 2021

Revised version received 29 July 2021

Accepted 10 September 2021

## Artículo 2

### “Clinical and molecular description of 16 families with heterozygous *IHH* variants”

#### Descripción clínica y molecular de 16 familias con variantes en heterocigosis en *IHH*

J Clin Endocrinol Metab. 2020;105(8):1-13

Variantes en heterocigosis en *IHH* pueden causar braquidactilia A1, caracterizada por acortamiento o ausencia de las falanges medias de los dedos. El objetivo del trabajo fue describir las características fenotípicas y genotípicas de 16 probandos con variantes en heterocigosis en *IHH* que fueron estudiados por talla baja y/o braquidactilia de causa desconocida, y en quienes se realizó un panel de NGS o bien secuenciación Sanger.

Se detectaron 15 variantes en los 16 pacientes; entre ellas la primera delección completa del gen. Ninguno de los pacientes presentó el fenotipo clásico de braquidactilia A1 y los rasgos más frecuentemente encontrados fueron talla baja (presente en 68% de los pacientes con un rango entre -2 y -3.8 DE) y acortamiento de la falange media del 5º dedo (75%) así como leve micromelia. La concurrencia de talla baja y acortamiento de falanges sólo se encontró en 43% de los pacientes de la cohorte. El probando afecto de la delección y su progenitor, también afecto, no presentaron un fenotipo más severo que aquellos con variantes sin sentido o con cambio de sentido, a pesar de la ausencia completa del gen.

Las variantes identificadas cosegregaron con el fenotipo talla baja y/o braquidactilia en los 13 probandos cuyas muestras de familiares estuvieron disponibles para estudio. Destaca la heterogeneidad clínica al encontrar dos probandos con talla baja sin braquidactilia y cinco con braquidactilia y talla normal.

En conclusión, *IHH* es un buen candidato a estudio en pacientes con talla baja y/o anomalías esqueléticas leves en manos, sobre todo si se aprecia un patrón de herencia autosómico dominante.



## Clinical and Molecular Description of 16 Families With Heterozygous *IHH* Variants

Lucía Sentchordi-Montané,<sup>1,2,3,4</sup> Sara Benito-Sanz,<sup>1,5</sup> Miriam Aza-Carmona,<sup>1,4,5</sup> Arrate Pereda,<sup>6</sup> Manuel Parrón-Pajares,<sup>4,7</sup> Carolina de la Torre,<sup>1</sup> Gabriela A. Vasques,<sup>8,9</sup> Mariana F.A. Funari,<sup>9</sup> André M. Travessa,<sup>10</sup> Patrícia Dias,<sup>10</sup> Larisa Suarez-Ortega,<sup>11</sup> Jesús González-Buitrago,<sup>12</sup> Nancy Elizabeth Portillo-Najera,<sup>13</sup> Isabel Llano-Rivas,<sup>14</sup> María Martín-Frías,<sup>15</sup> Joaquín Ramírez-Fernández,<sup>16</sup> Jaime Sánchez del Pozo,<sup>17</sup> Lucía Garzón-Lorenzo,<sup>17</sup> Gabriel A. Martos-Moreno,<sup>18,19,20</sup> Cristina Alfaro-Izuaola,<sup>21</sup> Inés Mulero-Collantes,<sup>22</sup> Pablo Ruiz-Ocaña,<sup>23</sup> Paula Casano-Sancho,<sup>24</sup> Ana Portela,<sup>25</sup> Lorea Ruiz-Pérez,<sup>26</sup> Angela del Pozo,<sup>3,5</sup> Elena Vallespín,<sup>3,5</sup> Mario Solís,<sup>3</sup> Antônio M. Lerario,<sup>8,27</sup> Isabel González-Casado,<sup>4,28</sup> Purificación Ros-Pérez,<sup>29</sup> Guiomar Pérez de Nanclares,<sup>6</sup> Alexander A. L. Jorge,<sup>8,9</sup> and Karen E. Heath<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM); IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid 28031, Spain; <sup>3</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Skeletal Dysplasia Multidisciplinary Unit (UMDE), Hospital Universitario La Paz, 28046, Madrid, Spain; <sup>5</sup>CIBERER, ISCIII, 28029 Madrid, Spain; <sup>6</sup>Rare Diseases Research Group, Molecular (Epi)Genetics Laboratory, BioAraba Health Research Institute, Hospital Universitario Araba-Txagorritxu, 01009 Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain; <sup>7</sup>Department of Radiology, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain; <sup>8</sup>Unidades de Endocrinología Genética (LIM/25), Hospital das Clinicas da Faculdades de Medicina, Universidades de São Paulo, São Paulo 01246-903, Universidades de São Paulo, São Paulo 01246-903, Brazil; <sup>9</sup>Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42), Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo 05403-000, Brazil; <sup>10</sup>Serviço de Genética Médica, Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Centro Académico de Medicina de Lisboa, 1649-028, Lisbon, Portugal; <sup>11</sup>Division of Endocrinology, Hospital Sant Joan de Déu, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain; <sup>12</sup>Department of Pediatrics, Hospital San Pedro de Alcántara, 10003 Cáceres, Spain; <sup>13</sup>Department of Pediatrics, Hospital Alto Deba, 20500 Arrasate, Guipuzkoa, Spain; <sup>14</sup>Osakidetza Basque Health Service, Cruces University Hospital Department of Genetics, 48903 Barakaldo, Bizkaia, Spain; <sup>15</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain; <sup>16</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; <sup>17</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario Doce de Octubre, 28041, Madrid, Spain; <sup>18</sup>Department of Endocrinology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, 28009 Madrid, Spain; <sup>19</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain; <sup>20</sup>CIBEROBN, ISCIII, 28029 Madrid, Spain; <sup>21</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Rey Juan Carlos, 28933 Móstoles, Madrid, Spain; <sup>22</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Río Hortega, 47012 Valladolid, Spain; <sup>23</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Puerta del Mar, 11009 Cádiz, Spain; <sup>24</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Institut de Recerca Pediàtrica, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, 08950 Espluges de Llobregat, Barcelona, Spain and CIBERDEM, ISCIII, 28029 Madrid, Spain; <sup>25</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Pediatric Unit, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain; <sup>26</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Hospital General Universitario de Alicante, 03010, Alicante, Spain; <sup>27</sup>Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, US; <sup>28</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario La Paz, 28046, Madrid, Spain; and <sup>29</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

© Endocrine Society 2020. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Received 27 January 2020. Accepted 17 April 2020.

First Published Online 20 April 2020.

Corrected and Typeset 27 June 2020.

Abbreviations: ACFD, acrocapitofemoral dysplasia; BDA1, brachydactyly type A1; ISS, idiopathic short stature; *IHH*, Indian hedgehog gene; NGS, next-generation sequencing; Ptc, Patched; VUS, variant of unknown significance.

**ORCID numbers:** 0000-0002-4083-3352 (L. Sentchordi-Montané); 0000-0002-6455-8682 (G. A. Vasques); 0000-0003-4316-4999 (M. F.A. Funari); 0000-0002-8336-6432 (A. M. Lerario); 0000-0003-2567-7360 (A. A. L. Jorge); 0000-0002-5816-7044 (K. E. Heath).

**Context:** Heterozygous variants in the Indian hedgehog gene (*IHH*) have been reported to cause brachydactyly type A1 and mild hand and feet skeletal anomalies with short stature. Genetic screening in individuals with short stature and mild skeletal anomalies has been increasing over recent years, allowing us to broaden the clinical spectrum of skeletal dysplasias.

**Objective:** The objective of this article is to describe the genotype and phenotype of 16 probands with heterozygous variants in *IHH*.

**Patients and Methods:** Targeted next-generation sequencing or Sanger sequencing was performed in patients with short stature and/or brachydactyly for which the genetic cause was unknown.

**Results:** Fifteen different heterozygous *IHH* variants were detected, one of which is the first reported complete deletion of *IHH*. None of the patients showed the classical phenotype of brachydactyly type A1. The most frequently observed clinical characteristics were mild to moderate short stature as well as shortening of the middle phalanx on the fifth finger. The identified *IHH* variants were demonstrated to cosegregate with the short stature and/or brachydactyly in the 13 probands whose family members were available. However, clinical heterogeneity was observed: Two short-statured probands showed no hand radiological anomalies, whereas another 5 were of normal height but had brachydactyly.

**Conclusions:** Short stature and/or mild skeletal hand defects can be caused by *IHH* variants. Defects in this gene should be considered in individuals with these findings, especially when there is an autosomal dominant pattern of inheritance. Although no genotype-phenotype correlation was observed, cosegregation studies should be performed and where possible functional characterization before concluding that a variant is causative. (*J Clin Endocrinol Metab* 105: 1–13, 2020)

**Freeform/Key Words:** *IHH*, brachydactyly, short stature, NGS

Chondrogenesis is the fundamental biological process that drives linear growth and therefore stature in children, with heritable factors playing a paramount role in this process. Short stature is one of the most common referrals in pediatric endocrinology clinics. After excluding common causes, many are labeled as having idiopathic short stature (ISS), a clinical heterogeneous entity. During the last decade, clinicians and researchers have begun to unravel the genetic causes underlying ISS. On detailed clinical and radiological examination, some of these individuals actually have mild body disproportion and minor skeletal defects (1). Pathogenic variants in genes involved in various signaling pathways have been detected by us and others, in specific subgroups of individuals who share particular clinical features, short stature with or without limb shortening, and mild skeletal anomalies including brachydactyly, such as heterozygous variants in the aggrecan gene (*ACAN*), the natriuretic peptide receptor 2 gene (*NPR2*) encoding natriuretic peptide receptor B (*NPR-B*) and its ligand C-natriuretic peptide (*CNP*)

encoded by the natriuretic peptide precursor C gene (*NPPC*), and Indian hedgehog gene (*IHH*) (2-8). The detailed clinical and radiological examination and the implementation of next-generation sequencing (NGS) in the genetic studies of pediatric short stature cases has led over recent years to our increasing detection of variants in *IHH*.

*IHH* is a peptide that is transported to the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, where it undergoes autoprocesing. There it undergoes cleavage into 2 fragments, the N-terminal, the functional signaling molecule, and the C-terminal, which regulates autoprocesing. After processing of the N-terminal part by cholesterol and palmitate, *IHH* is secreted from the producing cells and binds to the membrane receptor protein Patched (*Ptc*). The membrane protein, smoothened, then receives the signal, and transfers it into the nucleus by the transcription factor *Gli* (Sasai [9], review), where it binds to its target genes. *IHH* is predominantly expressed in the developing skeleton. It is expressed in the prehypertrophic chondrocytes of

cartilage and coordinates proliferation and differentiation of chondrocytes during endochondral ossification (10) and is directly required for the osteoblast lineage in the developing long bones along with other factors such as bone morphogenetic proteins to induce osteoblast differentiation (11).

Brachydactyly type A1 (MIM 112500; BDA1), characterized by shortened or absent middle phalanges in digits along with short stature, is associated with heterozygous variants in *IHH* (12). Since the first description, many families have been reported with variable expressivity and penetrance (13–17). Homozygous variants cause another dysplasia, acrocapitofemoral dysplasia (ACFD, MIM 607778), characterized by cone-shaped epiphyses in phalanges, proximal femurs and tibias (18). Initially, variants causing BDA1 were reported to occur only in the N-terminal active fragment of *IHH* (19), whereas variants causing ACFD were located in the distal N- and C-terminal regions (18). However, during recent years we have detected heterozygous variants throughout the gene in families not with typical BDA1 but with short stature and brachydactyly and, once again, variable expressivity (8). To date no other disorders have been associated with variants in *IHH* (9).

Here, we describe the broad spectrum of the clinical and radiological characteristics of 16 probands and their family members with heterozygous *IHH* variants. We also report the identification of the first complete deletion of *IHH* in a patient with short stature and brachydactyly.

## Cohorts and Methods

All participants provided informed consent for the performed studies and ethical approval was obtained from local ethical committees. Probands were referred by pediatric endocrinologists or clinical geneticists for: group 1: proportionate/disproportionate short stature and mild skeletal defects and/or a parent with disproportionate short stature; group 2: brachydactyly of unknown cause; or, group 3: ISS. All had a complete physical exam and a skeletal survey. Endocrine disorders including somatotrophic axis-related conditions were excluded by biochemical analysis. All participants had also been previously excluded for *SHOX* defects using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (P018G2, MRC Holland) and DNA sequencing.

Blood samples were extracted from the proband and family members, when available. The probands were analyzed using a custom designed skeletal dysplasia NGS panel, SKELETALSEQ.V4-8 (n = 327–416

genes), a custom-designed short-stature NGS panel (8) or in 3 cases (probands 1, 2, and 4) by direct Sanger sequencing. Genes included in these panels are available on request. The identified variants were assessed for amino acid conservation using in silico pathogenicity prediction analysis: CADD V1.4 (<http://cadd.gs.washington.edu/>), SIFT, Polyphen, MutationTaster, various splicing programs available in Alamut V2.14 (Interactive Biosoftware); and allelic frequencies in gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Copy number variant (deletion/duplication) analysis was performed by in-house software (unpublished). All variants detected by NGS were subsequently validated by Sanger sequencing, as was family testing. Kinship was confirmed using microsatellite marker analysis (Devyser Complete quantitative fluorescence–polymerase chain reaction). The *IHH* deletion was confirmed by a single-nucleotide polymorphism array (Infinium CytoSNP-850K v1.2 BeadChip, Illumina) but because of low probe density in this region we further characterized the deletion using a custom-designed *IHH* MLPA assay (probe sequences are available on request).

After the identification of an *IHH* variant, personal and familial records, anthropometric measures as well as the evaluation of the skeletal survey were reviewed by the same clinician (L.S.-M.) and radiologist (M.P.-P.).

## Results

Fifteen different *IHH* variants were detected in 16 probands, 12 not been previously described (Table 1), whereas the variants present in probands 2, 4, and 15 have been previously described (8, 14). Using the American College of Medical Genetics and Genomics guidelines for variant classification (20), 2 of the variants have been classified as pathogenic, 5 as likely pathogenic, and the remaining 8 as variants of unknown significance (VUS). The variants are localized throughout the protein (both N- and C-terminal domains). The pedigrees and genotypes of the 16 families are shown in Fig. 1. Cosegregation of genotype and phenotype was demonstrated in 13 families, whereas family testing was unavailable for the remaining 3 families (probands 9, 14, and 15). No other pathogenic or likely pathogenic variant was detected in the NGS panels, nor any strong VUS candidate.

Interestingly, a complete deletion of *IHH* was identified in proband 16, initially by copy number variant analysis of the NGS skeletal dysplasia panel and subsequently confirmed by a single-nucleotide polymorphism array and a self-designed *IHH* MLPA (Fig. 2). The

**Table 1. Molecular details of *IHH* variants identified in the cohort**

Proband	Mutation	Mutation class	Exon	gnomAD, all, %	CADD V1.4/ SIFT/Polyphen/ MutationTaster	Protein domain	ACMG
1	c.228_229delinsAA p.(Arg77Ser)	Missense	1	Absent	23.1/D/PD/NA	N-terminal domain	VUS (PM2, PP3, PP4)
2	c.283_285del p.(Glu95del) <sup>a</sup>	Inframe deletion	1	Absent	NA	N-terminal domain	Likely pathogenic (PM2, PM4, PP1, PP4, PP5)
3	c.391G>C p.(Glu131Gln)	Missense	2	Absent	32/D/PD/DC	N-terminal domain	Likely pathogenic (PM2, PM5, PP2, PP3, PP4)
4	c.446G>A p.(Arg149His) <sup>b</sup>	Missense	2	Absent	35/D/PD/DC	N-terminal domain	VUS (PM2, PP2, PP3, PP4, PP5)
5	c.470A>G; p.(Asp157Gly)	Missense	2	Absent	33/D/PD/DC	N-terminal domain	VUS (PM2, PP2, PP3, PP4)
6	c.482_510del p.(Asn161Serfs*6)	Frameshift	2	Absent	NA	N-terminal domain	Likely pathogenic (PVS1, PM2)
7	c.531G>A p.(Trp177*)	Nonsense	2	Absent	41/NA/NA/NA	N-terminal domain	Likely pathogenic (PVS1, PM2)
8	c.541del p.(Glu181Serfs*43)	Frameshift	2	Absent	NA	N-terminal domain	Pathogenic (PVS1, PM2, PP4)
9	c.568_570del p.(Val190del)	Inframe deletion	2	Absent	NA	N-terminal domain	VUS (PM2, PM4)
10	c.685G>A p.(Val229Met)	Missense	3	Absent	27/D/PD/DC	C-Hint domain	VUS (PM2, PP2, PP3)
11	c.823C>A p.(His275Asn)	Missense	3	Absent	25.8/D/PD/DC	C-Hint domain	VUS (PM2, PP1, PP2, PP3)
12	c.887_890del p.(Ser296Thrfs*68)	Frameshift	3	Absent	NA	C-Hint domain	Likely pathogenic (PVS1, PM2)
13, 14	c.892G>A p.(Val298Met)	Missense	3	0.002601	33/D/PD/DC	C-Hint domain	VUS (PP1, PP2, PP3, PP4)
15	c.949G>A p.(Val317Met) <sup>b</sup>	Missense	3	0.000416	26.3/D/PD/DC	C-Hint domain	VUS (PP2, PP3)
16	Complete deletion	Deletion	–	Absent	NA	N/A	Pathogenic (PVS1, PS2, PM2)

Coordinates are based on NM\_002181.4 transcript.

Abbreviations: ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics; all, allelic frequency; DC, disease causing; del, deleterious; NA, not analyzed by this/these methods; N/A: not applicable; PD, probably damaging; VUS: variant of unknown significance.

In silico analysis: CADD V1.4: value greater than 15 is considered to be deleterious.

<sup>a</sup>Described previously (14).

<sup>b</sup>These variants have been previously described (8).

deletion, hg19:2:219,923,348-219,942,928x1, was shown to include only *IHH*. The deletion was also detected in the similarly affected father.

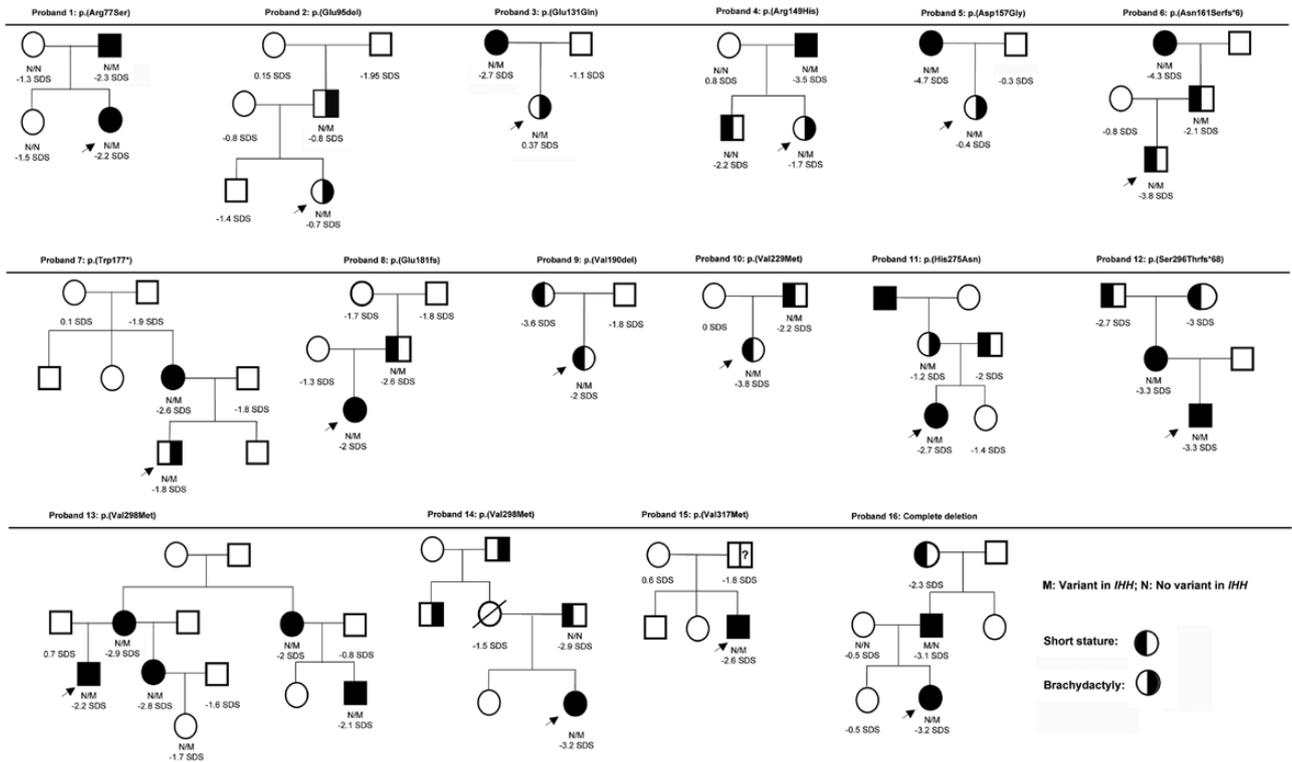
The clinical characteristics and hand radiographs of the 16 probands (5 male, 11 female) are shown in Table 2 and Fig. 3, respectively. The cohort consisted of 12 Spanish patients, 3 Brazilian, and 1 Portuguese. Ages at the time of study ranged from 1.5 to 17 years (median, 12.8 years) and the average height SD was –2 (range, 0.37 to –3.8 SD). Average height SD of the affected parents was –2.54 (range, –0.8 to –4.7). Three probands were born small for gestational age for body length (23%). Unfortunately, complete anthropometric measurements were not available for all participants. Despite only one proband have a sitting height/height ratio SD greater than 2, the majority (10/12, 83%) presented with a sitting height/height ratio greater than 1 SD (21, 22). In contrast arm span/height ratio was less than 0.96 in 7 of 11 (63%). The principal

characteristics observed in the 16 probands were short stature (68%) and shortening of the middle phalanx (75%) (Table 2, Fig. 3).

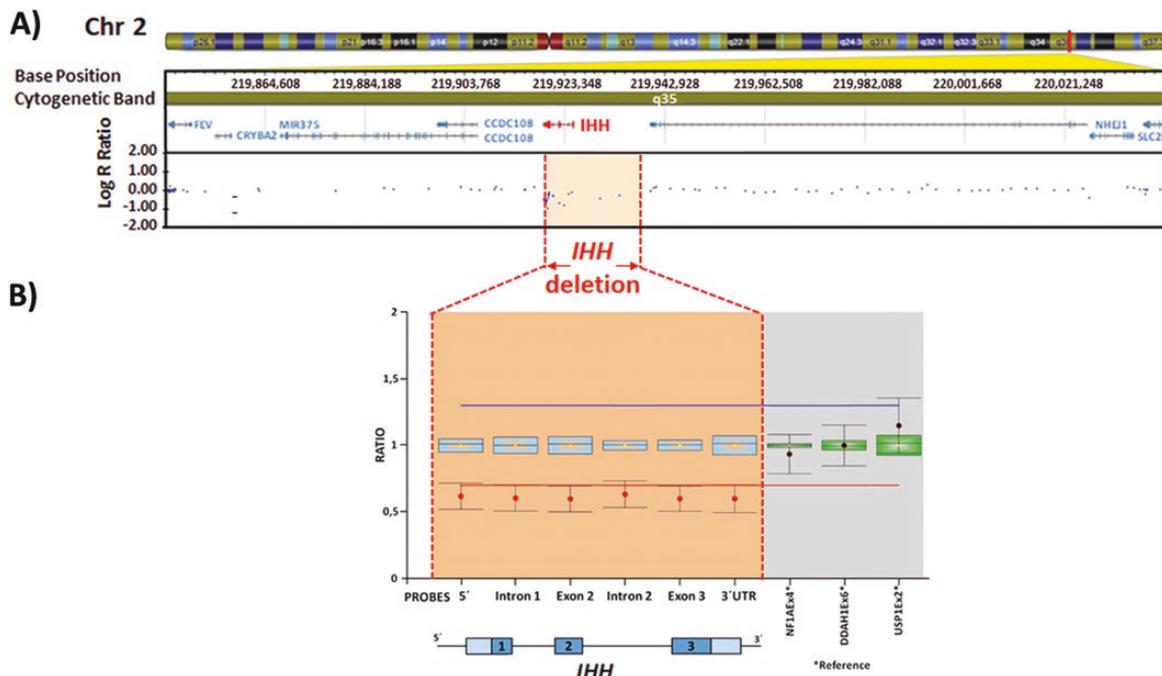
## Discussion

The present study reports the clinical and molecular study of 16 probands with heterozygous mutations in *IHH*, including the identification of the first complete deletion of *IHH*. The deletion was identified in a girl (proband 16) with short stature (–3.2 SD), mild micromelia of the lower limbs, and shortening of the middle phalanges of the second and fifth fingers. The deletion is also present in her father, who shows a similar phenotype. Despite the complete absence of the gene, their phenotype is similar to that observed in the probands with nonsense or missense variants.

Although no functional characterization was performed, some of the variants identified in this cohort



**Figure 1.** Pedigrees obtained from the 16 families affected carrying heterozygous mutations in the Indian hedgehog gene (*IHH*). The arrows indicate the probands. N indicates no *IHH* variant, M indicates *IHH* variant. Height SD is indicated where available. Short stature is indicated by left half-filled symbols, brachydactyly is indicated by right half-filled symbols. When phenotype is unknown a question mark has been placed inside the sex symbol.



**Figure 2.** Characterization of the Indian hedgehog gene (*IHH*) deletion detected in proband 16. A, Single-nucleotide polymorphism (SNP) array (Infinium CytoSNP-850K v1.2 BeadChip, Illumina) showing the deletion hg19:2:219,923,348-219,942,928x1. Sequence coordinates are taken from GRCh37/hg19. B, Coffalyser plot of the custom-designed *IHH* multiplex ligation probe amplification, confirming the complete deletion (represented in the orange shaded box). Normal peaks were classified as having a ratio of 0.7 to 1.3 and deletions were classified as less than 0.7. Asterisks represent control probes, located in other chromosomes.

have convincing evidence for the pathogenicity. First, proband 3 and her mother have a missense variant in codon 131, c.391G>C; p.(Glu131Gln). Another variant

at the same amino acid, c.391G>A; p.Glu131Lys, has been reported several times (12, 15, 23). This variant is one of the few that has been functionally characterized,

**Table 2. Clinical, anthropometric, and radiological characteristics of the cohort**

Proband	Variant	Sex	Geographic origin	Reason for genetic investigation	Age, y	Height SDS	Midparental target height SD	SGA (SD weight/SD length)	Sitting height/height (SD) <sup>a</sup>	Arm span/height	Skeletal maturation (BA:CA)	Hand x-ray findings (shortening)	Feet x-ray findings (shortening)	Affected family members (height SD, brachydactyly ±)
1	c.228_229delinsAA p.(Arg77Ser)	F	Spain	2	13	-2.2	-1.6	No	NA	NA	+2	Left middle phalanx (second, fifth). Right middle phalanx (fifth). Left metacarpals (third, fourth). Right metacarpal (fourth, severe)	Bilateral metatarsal (third, fourth)	Father -2.3 Brachy +
2	c.283_285del p.(Glu95del)	F	Spain	2	11	-0.7	-0.8	Yes (Un/-2)	NA	NA	+2	Middle phalanx (all, more second and fifth). Distal phalanx fourth. Metacarpal fourth, fifth. Mild proximal phalanx first	No abnormal findings	Father -0.8 Brachy +
3	c.391G>C p.(Glu131Gln)	F	Spain	2	11.5	0.37	-2	No	1.59	0.95	+3	Middle phalanx (fifth, second, mild fourth). Distal phalanx (third). Bilateral metacarpal (fifth and third)	Fourth metatarsal	Mother -2.7 Brachy +
4	c.446G>A p.(Arg149His)	F	Spain	2	11	-1.7	-1.4	No	2.6	0.956	=	Middle phalanx (second, fifth). Distal phalanx (first, third)	Bilateral metatarsal (fourth). Left metatarsal (third). General phalanx shortening	Father -3.5 Brachy +

Table 2. Continued

Proband	Variant	Sex	Geographic origin	Reason for genetic investigation	Age, y	Height SDS	Midparental target height SD	SGA (SD weight/SD length)	Sitting height/height (SD) <sup>a</sup>	Arm span/height	Skeletal maturation (BA:CA)	Hand x-ray findings (shortening)	Feet x-ray findings (shortening)	Affected family members (height SD, brachydactyly ±)
5	c.470A>G p.(Asp157Gly)	F	Spain	1	9.5	-0.43	-2.16	No	1.4	0.94	+1.5	Middle phalanx (second, fifth). Distal phalanx (mild first second, third, fourth). Fifth metacarpal short and wide	Bilateral metatarsal (fourth)	Mother -4.7 Brachy+
6	c.482_510del p.(Asn161Serfs*6)	M	Portugal	1	1.5	-3.8	-1.2	Yes (-0.49/-2.39)	NA	NA	=	Clinodactyly (fifth)	No abnormal findings	Father -2.1 Brachy-
7	c.531G>A p.(Trp177*)	M	Spain	1	11.3	-1.8	-2.1	No	1.2	0.93	=	Middle phalanx (second, fifth). Distal phalanx (first, third with premature physal closure in third). Cone shaped epiphyses (third, fourth, fifth)	No abnormal findings	Mother -2.6 Brachy+
8	c.541del p.(Glu181Serfs*43)	F	Brazil	1	2.4	-2	-2.1	No	1.19	0.87	=	Short hands. Broad and short first metacarpal. Broad fifth metacarpal	Cone-shaped epiphyses in proximal phalanges of toes (second, third, fourth, fifth)	Father -2.6 Brachy-
9	c.568_570delGTC p.(Val190del)	F	Spain	1	11.5	-2.02	-2.8	No	1.14	1	+3	Middle phalanx (fifth). Distal phalanx (first, second, third, fifth)	No abnormal findings	NA

**Table 2. Continued**

Proband	Variant	Sex	Geographic origin	Reason for genetic investigation	Age, y	Height SDS	Midparental target height SD	SGA (SD weight/SD length)	Sitting height/height (SD) <sup>a</sup>	Arm span/height	Skeletal maturation (BA:CA)	Hand x-ray findings (shortening)	Feet x-ray findings (shortening)	Affected family members (height SD, brachydactyly ±)
10	c.685G>A p.(Val229Met)	F	Brazil	3	12.9	-3.8	-1.3	No	1.1	NA	-1.5	No abnormal findings	No abnormal findings	Father -2.2 Brachy NA
11	c.823C>A p.(His275Asn)	F	Spain	1	7.3	-2.7	-1.6	No	1	0.97	-1.5	Middle phalanx (fifth, mild)	No abnormal findings	Mother -1.2 Brachy- Grandfather -4
12	c.887_890del p.(Ser296Thrfs*68)	M	Spain	1	5.5	-3.3	-2.4	Yes (-1.26/-2.66)	NA	0.89	-2	Short hands. No abnormal radiological findings	No abnormal findings	Mother -3.3 Brachy- Brachy+
13	c.892G>A p.(Val298Met)	M	Spain	1	17	-2.1	-1.4	No	1.7	0.93	=	Middle phalanx (fifth mild)	No abnormal findings	Mother -2, Brachy- Sister -2.8, Brachy+ Nephew -1.7, Brachy- Mat. aunt -2.9, Brachy NA Cousin -2.2, Brachy- NA
14	c.892G>A p.(Val298Met)	F	Spain	1	12	-3.2	-2.29	No	-0.9	0.98	-2	Middle phalanx (fifth mild). Irregular metaphyses of middle and proximal phalanges (second, third, fourth, fifth). Cone-shaped epiphyses of middle phalanges (second and fifth)	Bilateral metatarsal (fourth and fifth)	NA
15	c.949G>A p.(Val317Met)	M	Brazil	3	7.5	-2.6	-0.6	No	0.35	NA	-2.5	Middle phalanx (fifth and mild second). Clinodactyly (fifth)	No abnormal findings	NA



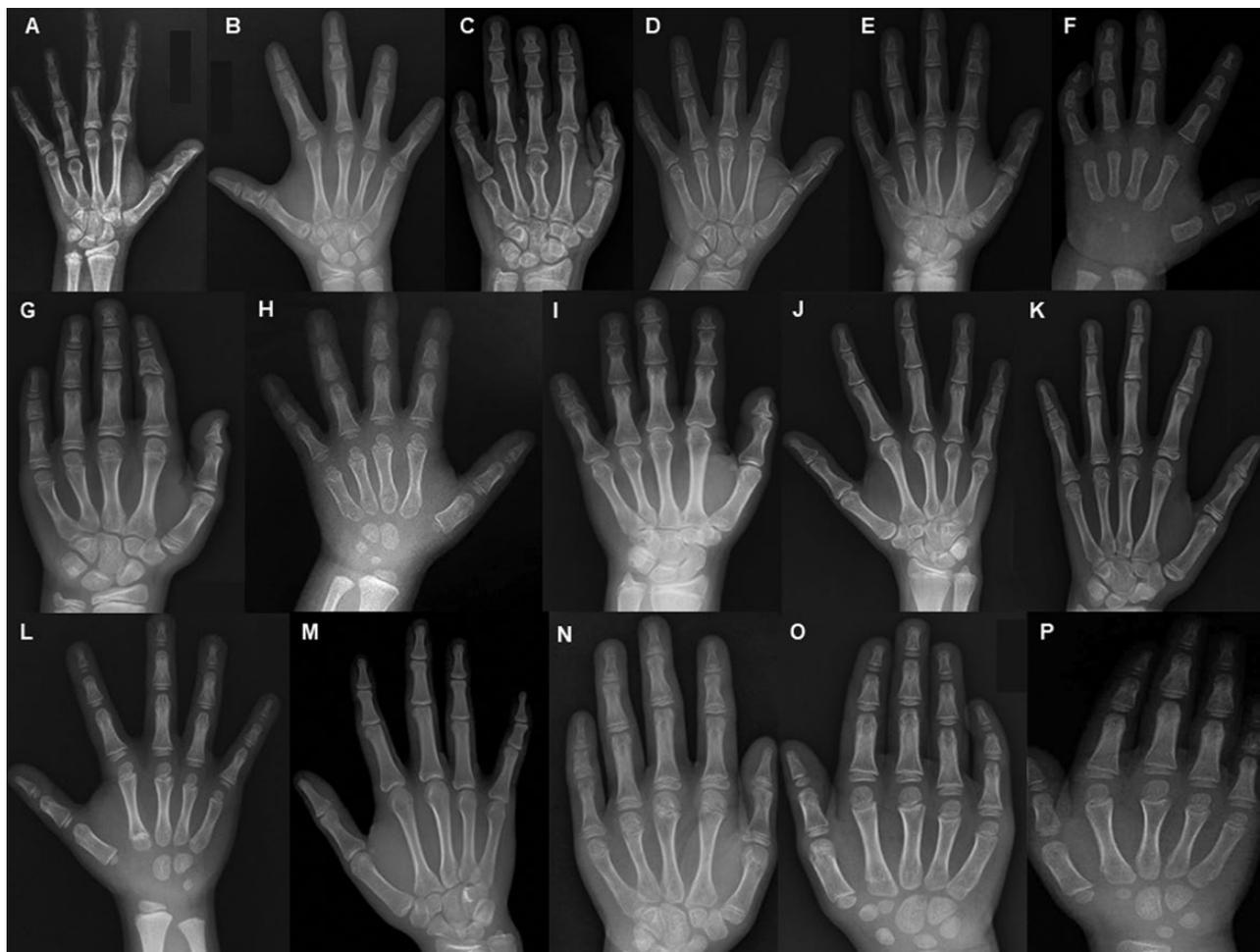
Table 2. Continued

Proband	VARIANT	Sex	Geographic origin	Reason for genetic investigation	Age, y	Height SDS	Midparental target height SD	SGA (SD weight/SD length)	Sitting height/height (SD) <sup>a</sup>	Arm span/height	Skeletal maturation (BA:CA)	Hand x-ray findings (shortening)	Feet x-ray findings (shortening)	Affected family members (height SD, brachydactyly ±)
16	Complete deletion	F	Spain	1	5.7	-3.2	-1.8	No	1.21	0.99	=	Middle phalanx (second, fifth)	No abnormal findings	Father -3.1 Brachy+
	Summary	11 F 5 M	12 Spain 3 Brazil 1 Portugal	Group 1:10 Group 2:4 Group 3:2	Medium age: 12.8 y	Medium height: -2 5 probands with normal height	Medium height: -2	3 Yes/13 No	1/12 Disproportion (>2 SD) 10/12 SD ≥ 1	7/11 Disproportion	5 advanced 6 equal 5 delayed	12 shortened middle phalanges 6 shortened distal phalanges 1 shortened proximal phalanges 5 shortened metacarpals 2 clinodactyly 2 cone-shaped epiphyses 2 no abnormal findings	10/16 No abnormal findings	AD: 13 NA: 3

Reasons for genetic investigation: group 1) Proportionate/disproportionate short stature and mild skeletal defects and/or a parent with disproportionate short stature; group 2) Brachydactyly of unknown cause; group 3) Idiopathic short stature. Skeletal maturation (BA, CA): + applies to advanced BA to CA with BA at least 1 year greater than CA; = means BA less than 1 year greater than or less than CA, - means BA delayed by more than 1 year less than CA. An arm span/height ratio of less than 0.965 was used to determine disproportionality. Hand/feet x-ray findings: shortening of the phalanges is indicated. Affected family members (height expressed in SD, brachy ±: brachydactyly present/not present).

Abbreviations: AD, autosomal dominant inheritance; BA, bone age; CA, chronological age; F, female; NA, not available. M, male; Mat, maternal; SGA, small for gestational age.

<sup>a</sup>Sitting height/height ratio is expressed following references of Fredriks et al (21).



**Figure 3.** Hand radiographs from patients of the cohort (phalanx shortening and other special features). A, Patient 1: middle phalanx shortening (second and fifth) and severe fourth metacarpal shortening; B, Patient 2: Middle phalanx shortening (all, more second and fifth), distal phalanx shortening (fourth), mild fourth metacarpal shortening, mild first proximal phalanx shortening; C, Patient 3: Middle phalanx shortening (second, fifth, and mild fourth), fifth and third metacarpal shortening, distal phalanx shortening (third); D, Patient 4: Middle phalanx shortening (second and fifth) and distal phalanx shortening (first and third); E, Patient 5: Middle phalanx shortening (second and fifth), distal phalanx shortening (mild first, second, third, and fourth), fifth metacarpal short and wide; F, Patient 6: Clinodactyly (fifth); G, Patient 7: Middle phalanx shortening (second and fifth), distal phalanx shortening (first, third with premature physal closure in third) cone-shaped epiphyses (third, fourth, and fifth); H, Patient 8: Short hands, broad and short first metacarpal, broad fifth metacarpal; I, Patient 9: Middle phalanx shortening (fifth), distal phalanx shortening (first, second, third, and fifth); J, Patient 10: No abnormal findings; K, Patient 11: Middle phalanx shortening (fifth); L, Patient 12: Short hands, no abnormal radiological findings; M, Patient 13: Mild middle phalanx shortening (fifth); N, Patient 14: Middle phalanx shortening (fifth mild), irregular metaphyses of middle and proximal phalanges (second, third, fourth, and fifth) with cone-shaped epiphyses of middle phalanges (second and fifth); O, Patient 15: Middle phalanx shortening (fifth and mild second) and clinodactyly (fifth); and P, Patient 16: Middle phalanx shortening (second and fifth).

demonstrating that this variant affects Hedgehog (Hh) binding to the receptor Ptc1, reducing its capacity to induce cellular differentiation, and thus, confirming its pathogenicity (23). The p.(Glu131Gln) variant identified in proband 3 may also impair Hh binding to Ptc.

Second, proband 2 has an inframe deletion variant, p.(Glu95del), which has been previously described (14). Residue Glu95 is estimated to be located on the edge of a groove important for the interaction between *IHH* and its receptor Ptc. The Glu95 deletion predicted the loss of a loop on the edge of this groove, suggesting that the deletion of this conserved amino acid is the cause of BDA1 in the family described by them. Two different variants affecting amino acid 95, p.(Glu95Lys)

and p.(Glu95Gly), had been previously reported in individuals with BDA1 (10, 24). The family with the p.(Gly95Lys) variant had a more severe phenotype, whereas no clinical details were reported for the other case. We still do not know completely how *IHH* interacts with Ptc, and it is difficult to predict why different variants have a different effect on digit formation. But it does appear that this highly conserved Glu95 residue is important for correct *IHH* signaling.

Third, proband 1, with an indel resulting in a missense variant, c.228\_229delinsAA; p.(Arg77Ser), has short stature and an uncommon finger phenotype, asymmetrical shortening of the middle phalanges and metacarpals and shortening of the third and fourth metatarsals.

Interestingly, the same amino acid substitution but different nucleotide change, c.229C>A; p.(Arg77Ser) (rs142036701), was the unique *IHH* variant described in a genome-wide association study of human growth in which 200 000 coding variants were studied in 711 428 individuals (25). This variant has a minor allele frequency of 0.08%. They showed that this variant and another 82 height-associated variants with minor allele frequencies in the range of 0.1% to 4.8% had effects of up to 2 cm per allele, 10 times greater than the average effect of common variants.

Last, proband 9 carries an inframe deletion, c.568\_570del; p.(Val190del), classified as a VUS. A homozygous variant affecting the same codon, c.569T>C; p.(Val190Ala), was reported in 3 members of a consanguineous family with ACFD (18). Two heterozygous carriers of the mutation in the same family showed relative shortening of the metacarpals and proximal phalanges. Although no functional characterization has been performed for this variant, amino acid 190 may be a critical region in *IHH*.

The classical phenotype caused by heterozygous variants in *IHH*, *BDA1*, characterized by short stature and marked shortening of the middle phalanges, which are frequently rudimentary or fused to the terminal phalanges, was not present in any of the 16 probands. In this cohort, the observed phenotype was much milder. Short stature was present in 68% of the probands and 75% had shortening of the middle phalanx of the fifth finger. Nevertheless, both traits were present together in only 7 probands (43%). Upper limb shortening was observed in 7 of 11 (63%) probands, whereas lower limb micromelia was strictly observed in only 1 of 12. However, 10 of 12 of the probands presented with a sitting height/height ratio greater than 1 SD. Thus, our data suggest that mild micromelia might be observed and that upper limbs may be more affected than lower limbs. Other hand anomalies were also observed, including distal phalanx shortening, metacarpal shortening, isolated clinodactyly, and cone-shaped epiphysis. In total, 2 probands had short stature without the characteristic phalanx shortening, 9 had short stature with variable finger anomalies, and 5 had normal stature with phalanx shortening. Thus, clinical heterogeneity is associated with heterozygous *IHH* variants.

Intrafamilial variability and incomplete penetrance was also observed but may be explained, in part, by the age of the probands. Five of the probands (patients 2, 3, 4, 5, and 7) presented with typical features of brachydactyly but normal stature. Proband 7 and his mother have a nonsense variant in *IHH*. The proband has only brachydactyly whereas his mother has

short stature and brachydactyly. Incomplete penetrance may be occurring or simply the child is young and has not reached adult height yet. Proband 2 and his father carry a missense mutation; both presented with isolated brachydactyly but normal stature. Probands 3, 4, and 5 (missense variants) presented with isolated brachydactyly but their affected parents have short stature and brachydactyly.

Proband 13 came from a large family with multiple affected individuals. Mild short stature and brachydactyly was present in all the affected individuals except the proband's niece, who at age 15 months has normal stature, although at the lower limit, and no signs of brachydactyly. This incomplete penetrance maybe due to her young age and it is highly likely that she will go on to at least have short stature. Interestingly, the variant identified in this proband, p.(Val298Met), was also observed in proband 14, suggesting a common ancestor.

Three of the patients were born small for gestational age in length but not in weight, in agreement with previous reports (26).

Our findings demonstrate that *IHH* is a good candidate for screening in patients with short stature and variable brachydactyly or other hand-and-feet anomalies in them or their parents. The description of further patients and larger pedigrees as well as the follow-up of these children to adult height will help us in the future to define more precisely the phenotype and the possible correlation genotype-phenotype.

Also, functional studies will be important to validate the VUS. However, these assays are not rapid nor can they be easily implemented in the diagnostic setting. To date, few variants have been characterized. Three of the first variants to be described in *BDA1*, located in the N-terminal fragment, p.Glu95Lys (E95K), p.Glu131Lys (E131K), and p.Asn100Glu (D100E), were characterized for their autoprocessing, stability, cholesterol modification, palmitoylation, multimer formation, relative alkaline phosphatase induction activity, dissociation assays for Ptc-C-terminal domain, and its binding affinity to heparin (23). The p.Glu95Lys and p.Asn100Glu variants led to a temperature-sensitive and calcium-dependent instability of N-terminal fragment of Indian Hedgehog, which might contribute to an enhanced intracellular degradation of the mutant proteins via the lysosome. All 3 variants affected Hh binding to Ptc, reducing its capacity to induce cellular differentiation.

The mildness, lack of severity or specificity of skeletal findings, and the absence of them in some cases make NGS the ideal method to explore monogenic causes of short stature with minor skeletal defects. But,

it is also equally important to have a detailed clinical examination including anthropometric assessments of the child and parents and radiological assessment of them. Since the implementation of NGS techniques in the study of short stature, we are beginning to identify genetic defects in the milder forms of short stature (6–8, 27).

In summary, thanks to this study together with our previous study (8), we have now described a total of 21 probands with heterozygous *IHH* variants. Some have mild skeletal defects but others could have been classified as nonsyndromic short stature or ISS. What is clear is that none of these 21 probands showed typical features of BDA1. Thus, this detailed clinical examination of individuals with *IHH* variants in this study together with our previous study (8) has broadened the clinical and radiological spectrum of *IHH* variants.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the families for their participation in this study.

**Financial Support:** This work was supported in part by the following grants: SAF2015-66831-R and SAF2017-84646-R from the Ministerio de Economía y Empresa (MINECO) (to K.E.H.); Fundación SEEP (to K.E.H and L.S.-M.), PI16-00073 from Carlos III Institute of Health of the Ministry of Economy and Competitiveness (Spain) cofinanced by the European Regional Development Fund (to G.P.N. and A.P.), GV2017/111040 from the Department of Health of the Basque Government (to G.P.N.) and 2013/03236–5 (to A.A.L.J.) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP).

## Additional Information

**Correspondence and Reprint Requests:** Karen E. Heath, PhD, MSc, BSc, Institute of Medical & Molecular Genetics (INGEMM); Paseo Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. E-mail: [karen.heath@salud.madrid.org](mailto:karen.heath@salud.madrid.org).

**Disclosure Summary:** The authors have nothing to disclose. All authors have submitted the International Committee of Medical Journal Editors Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

**Data Availability:** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available but are available from the corresponding author on reasonable request.

## References

1. Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M, van Duyvenvoorde HA, Ruivenkamp CA, Kant SG. Mechanisms in endocrinology: novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(4):R145-R173.
2. Vasques GA, Arnhold IJP, Jorge AAL. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(4):222–229.
3. Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (*NPR2*) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat*. 2015;36(4):474–481.
4. Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, et al. Heterozygous *NPR2* mutations cause disproportionate short stature, similar to Léri-Weill dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(8):E1133–E1142.
5. Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, et al. Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):460–469.
6. Sentchordi-Montané L, Aza-Carmona M, Benito-Sanz S, et al. Heterozygous aggrecan variants are associated with short stature and brachydactyly: description of 16 probands and a review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;88(6):820–829.
7. Hisado-Oliva A, Ruzafa-Martin A, Sentchordi L, et al. Mutations in C-natriuretic peptide (*NPPC*): a novel cause of autosomal dominant short stature. *Genet Med*. 2018;20(1):91–97.
8. Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, et al. *IHH* gene mutations causing short stature with nonspecific skeletal abnormalities and response to growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(2):604–614.
9. Sasai N, Toriyama M, Kondo T. Hedgehog signal and genetic disorders. *Front Genet*. 2019;10:1103.
10. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, et al. BMP and *Ihh*/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 2001;128(22):4523–4534.
11. Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP. *Ihh* signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development*. 2004;131(6):1309–1318.
12. Gao B, Guo J, She C, et al. Mutations in *IHH*, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A–1. *Nature Genet*. 2001;28(4):386–388.
13. Liu M, Wang X, Cai Z, et al. A novel heterozygous mutation in the Indian hedgehog gene (*IHH*) is associated with brachydactyly type A1 in a Chinese family. *J Hum Genet*. 2006;51(8):727–731.
14. Lodder EM, Hoogeboom AJ, Coert JH, de Graaff E. Deletion of 1 amino acid in Indian hedgehog leads to brachydactyly A1. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(16):2152–2154.
15. Stattin EL, Lindén B, Lönnnerholm T, Schuster J, Dahl N. Brachydactyly type A1 associated with unusual radiological findings and a novel Arg158Cys mutation in the Indian hedgehog (*IHH*) gene. *Eur J Med Genet*. 2009;52(5):297–302.
16. Jang MA, Kim OH, Kim SW, Ki CS. Identification of p.Glu131Lys mutation in the *IHH* gene in a Korean patient with brachydactyly type A1. *Ann Lab Med*. 2015;35(3):387–389.
17. Salian S, Shukla A, Nishimura G, Girisha KM. Severe form of brachydactyly type A1 in a child with a c.298G>A mutation in *IHH* gene. *J Pediatr Genet*. 2017;6(3):177–180.
18. Hellemans J, Coucke PJ, Giedion A, et al. Homozygous mutations in *IHH* cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. *Am J Hum Genet*. 2003;72(4):1040–1046.
19. Byrnes AM, Racacho L, Grimsey A, et al. Brachydactyly A-1 mutations restricted to the central region of the N-terminal active fragment of Indian hedgehog. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(9):1112–1120.
20. Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics

- and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.
21. Fredriks AM, van Buuren S, van Heel WJ, Dijkman-Neerincx RH, Verloove-Vanhorick SP, Wit JM. Nationwide age references for sitting height, leg length, and sitting height/height ratio, and their diagnostic value for disproportionate growth disorders. *Arch Dis Child*. 2005;90(8):807-812.
  22. Malaquias AC, Scalco RC, Fontenele EG, et al. The sitting height/height ratio for age in healthy and short individuals and its potential role in selecting short children for SHOX analysis. *Horm Res Paediatr*. 2013;80(6):449-456.
  23. Ma G, Yu J, Xiao Y, et al. Indian hedgehog mutations causing brachydactyly type A1 impair hedgehog signal transduction at multiple levels. *Cell Res*. 2011;21(9):1343-1357.
  24. Kirkpatrick TJ, Au KS, Mastrobattista JM, McCreedy ME, Bulman DE, Northrup H. Identification of a mutation in the Indian hedgehog (*IHH*) gene causing brachydactyly type A1 and evidence for a third locus. *J Med Genet*. 2003;40(1):42-44.
  25. Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, et al; EPIC-InterAct Consortium; CHD Exome+ Consortium; ExomeBP Consortium; T2D-Genes Consortium; GoT2D Genes Consortium; Global Lipids Genetics Consortium; ReproGen Consortium; MAGIC Investigators. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature*. 2017;542(7640):186-190.
  26. Freire BL, Homma TK, Funari MFA, et al. Multigene sequencing analysis of children born small for gestational age with isolated short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(6):2023-2030.
  27. Dauber A. Genetic testing for the child with short stature—has the time come to change our diagnostic paradigm? *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(7):2766-2769.

## Artículo 3

**“Heterozygous aggrecan variants are associated with short stature and brachydactyly: Description of 16 probands and a review of the literature”**

**Asociación de variantes en heterocigosis en agrecano con talla baja y braquidactilia: descripción de 16 probandos y revisión de la literatura.**

**Clin Endocrinol (Oxf). 2018;88(6):820-829**

Las variantes en *ACAN* son responsables de dos displasias esqueléticas de herencia autosómica dominante (displasia espondiloepifisaria tipo Kimberley y osteocondritis dissecans) y de una displasia severa de herencia autosómica recesiva (displasia espondiloepimetafisaria tipo agrecano). Los estudios de secuenciación masiva han permitido la identificación de variantes en heterocigosis en niños con talla baja, anomalías esqueléticas y dismorfia facial leve, algunos de los cuales presentan maduración esquelética adelantada, brote puberal escaso, cese del crecimiento precoz y osteoartritis temprana.

El trabajo describe las características clínicas y moleculares de 16 probandos con variantes en heterocigosis en *ACAN* tras la realización de un panel de secuenciación masiva. De ellos 14 presentaban talla baja y defectos esqueléticos y los otros dos presentaban displasia espondiloepifisaria tipo Kimberley.

Se encontraron variantes a lo largo de todo el gen, 6 de las variantes se clasificaron como patogénicas y 10 como VUS. Los pacientes con variantes patogénicas presentaron menor talla y mayor porcentaje de edad ósea avanzada que aquellos con VUS; en estos se encontró por el contrario mayor incidencia de coxa vara. El rasgo que comparten todos los pacientes es la braquidactilia pero no encontramos diferencias clínico-radiológicas en el resto de las variables recogidas (dismorfia, artropatía o discopatía precoz, otros defectos esqueléticos). En el análisis del conjunto probandos-familiares se aprecia heterogeneidad clínica que parece relacionarse con la edad. Con respecto a los pacientes con *SEDK* las variantes encontradas están en distinta localización del gen a las descritas previamente.

El trabajo contiene una revisión comparativa de la literatura que documenta el espectro de manifestaciones clínico-radiológicas de los pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN*, y recoge la frecuencia relativa de cada uno de los rasgos característicos.

Se sugiere que *ACAN* debe ser considerado como gen candidato en pacientes con talla baja y defectos esqueléticos leves, sobre todo braquidactilia, así como en pacientes con displasia espondiloepifisaria. La presencia de maduración esquelética adelantada y complicaciones osteoarticulares no debe ser el único criterio para sospechar la entidad.

## ORIGINAL ARTICLE

# Heterozygous aggrecan variants are associated with short stature and brachydactyly: Description of 16 probands and a review of the literature

Lucía Sentchordi-Montané<sup>1,2,3</sup>  | Miriam Aza-Carmona<sup>2,3,4</sup> | Sara Benito-Sanz<sup>2,4</sup> | Ana C. Barreda-Bonis<sup>3,5</sup> | Consuelo Sánchez-Garre<sup>6</sup> | Pablo Prieto-Matos<sup>7</sup> | Pablo Ruiz-Ocaña<sup>8</sup> | Alfonso Lechuga-Sancho<sup>8</sup> | Atilano Carcavilla-Urquí<sup>9</sup> | Inés Mulero-Collantes<sup>10</sup> | Gabriel A. Martos-Moreno<sup>11,12</sup> | Angela del Pozo<sup>2,4</sup> | Elena Vallespín<sup>2,4</sup> | Amaka Offiah<sup>13</sup> | Manuel Parrón-Pajares<sup>3,14</sup> | Isabel Dinis<sup>15</sup> | Sergio B. Sousa<sup>16</sup> | Purificación Ros-Pérez<sup>17</sup> | Isabel González-Casado<sup>3,5</sup> | Karen E. Heath<sup>2,3,4</sup> 

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Skeletal dysplasia Multidisciplinary Unit (UMDE), Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>4</sup>CIBERER, ISCIII, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>6</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Hospital de Terrassa, Terrassa, Spain

<sup>7</sup>Department of Pediatrics, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>8</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain

<sup>9</sup>Department of Pediatrics, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

<sup>10</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain

<sup>11</sup>Department of Endocrinology, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>12</sup>Department of Pediatrics, Universidad Autónoma de Madrid and CIBEROBN, ISCIII, Madrid, Spain

<sup>13</sup>Department of Oncology and Metabolism, Academic Unit of Child Health, Sheffield Children's NHS Foundation Trust, Sheffield, UK

<sup>14</sup>Department of Pediatric Radiology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>15</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Diabetes and Growth Unit, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>16</sup>Medical Genetics Unit, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>17</sup>Department of Pediatrics, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, Spain

## Correspondence

Karen Heath, Institute of Medical & Molecular Genetics (INGEMM), Madrid, Spain.  
Email: karen.heath@salud.madrid.org

## Funding information

Ministerio de Economía y Competitividad, Grant/Award Number: SAF2012-30871 and SAF2015-66831-R; Fundación SEEP

## Summary

**Objective:** Mutations in the aggrecan gene (*ACAN*) have been identified in two autosomal dominant skeletal dysplasias, spondyloepiphyseal dysplasia, Kimberley type (SEDK), and osteochondritis dissecans, as well as in a severe recessive dysplasia, spondyloepimetaphyseal dysplasia, aggrecan type. Next-generation sequencing (NGS) has aided the identification of heterozygous *ACAN* mutations in individuals with short stature, minor skeletal defects and mild facial dysmorphisms, some of whom have advanced bone age (BA), poor pubertal spurt and early growth cessation as well as precocious osteoarthritis.

**Design and methods:** This study involves clinical and genetic characterization of 16 probands with heterozygous *ACAN* variants, 14 with short stature and mild skeletal defects (group 1) and two with SEDK (group 2). Subsequently, we reviewed the literature to determine the frequency of the different clinical characteristics in *ACAN*-positive individuals.

**Results:** A total of 16 *ACAN* variants were located throughout the gene, six pathogenic mutations and 10 variants of unknown significance (VUS). Interestingly, brachydactyly was observed in all probands. Probands from group 1 with a pathogenic mutation tended to be shorter, and 60% had an advanced BA compared to 0% in those with a VUS. A higher incidence of coxa valga was observed in individuals with a VUS (37% vs 0%). Nevertheless, other features were present at similar frequencies.

**Conclusions:** *ACAN* should be considered as a candidate gene in patients with short stature and minor skeletal defects, particularly those with brachydactyly, and in patients with spondyloepiphyseal dysplasia. It is also important to note that advanced BA and osteoarticular complications are not obligatory conditions for aggrecanopathies/aggrecan-associated dysplasias.

#### KEYWORDS

*ACAN*, aggrecan, brachydactyly, short stature, skeletal dysplasia

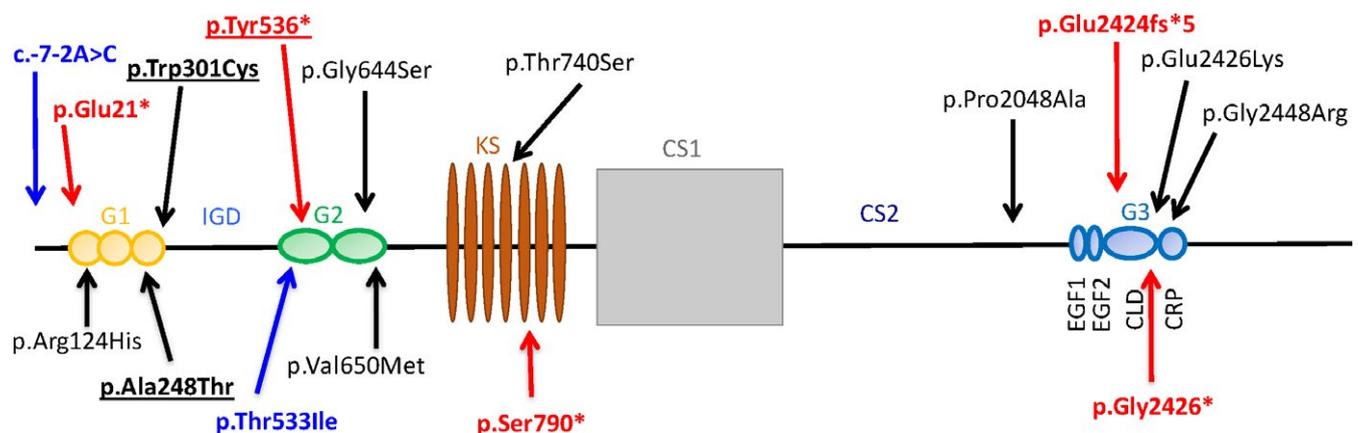
## 1 | INTRODUCTION

Longitudinal bone growth occurs at the growth plate as a result of chondrogenesis. It is regulated by a complex network of signals from endocrine and paracrine systems as well as interactions between cellular growth factors and extracellular matrix. Mutations in many of these pathways result in growth delay and/or skeletal defects.

Short stature is one of the most common reasons for referral to a paediatric endocrinologist. Next-generation sequencing (NGS) has permitted the identification of genetic defects in subgroups of

short stature individuals, including heterozygous mutations in the aggrecan gene (*ACAN*).

Aggrecan is a major structural component of the cartilage growth plate. Until recently, *ACAN* mutations had been observed in a few families with spondyloepiphyseal dysplasia, Kimberley type (SEDK, MIM 608361)<sup>1</sup>; spondyloepimetaphyseal dysplasia, aggrecan type (SEMD, MIM 612813)<sup>2</sup>; and osteochondritis dissecans (MIM 165800).<sup>3</sup> More recently, through the implementation of NGS, heterozygous *ACAN* mutations have been reported in individuals with a milder skeletal dysplasia, presenting with short stature and



**FIGURE 1** Structure of *ACAN* and the locations of the variants identified in the 16 probands. The G1 region encoded by exons 3-6, the IGD region by exon 7, the G2 region by exons 8-10, the GAG (KS-CS1-CS2) attachment region encoded by exons 11-12, while the G3 region encoded by exons 13-19. Missense variants written in black, while premature truncating (nonsense, frameshift, splicing) mutations written in red. Mutations corresponding to SEDK written in blue. Families with osteoarthritis and/or discopathy underlined [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



**TABLE 1** Details of the 16 heterozygous ACAN variants present in this cohort in individuals with short stature and mild skeletal defects (probands 1-14) and SEDK (probands 15, 16)

Proband	Variant	Exon	Aggrecan domain	GerPRS	Amino acid conservation	CADD V1.3	SIFT	PolyPhen	MutationTaster	GnomAD (MAF %)	Number of affected family members	ACMG classification
1	c.61G>T (p.Glu21*)	2	G1A	5.3	-	35	-	-	-	-	2	Pathogenic
2	c.371G>A (p.Arg124His)	3	G1A	5.36	High	24.9	Del	Poss dam	Dis Caus	Fin:0.0046, Lat: 0.0029, NFE: 0.0017	1	VUS
3	c.742G>A (p.Ala248Thr)	5	G1B	5.36	High	24.9	Del	Prob dam	Dis Caus	Eur: 0.0063 Lat: 0.0058 SA: 0.0032 Fin: 0.0011 EA: 0.0053	1	VUS
4	c.903G>C (p.Trp301Cys)	6	G1B'	5.56	High	24.7	Del	Prob dam	Dis Caus	-	2	VUS
5	c.1608C>A (p.Tyr536)	9	G2B	4.41	-	38	-	-	-	-	1	Pathogenic
6	c.1930G>A (p.Gly644Ser)	10	G2B'	5.11	High	25.2	Del	Prob dam	Dis Caus	EA: 0.074 Afr: 0.0041 SA: 0.0032 NFE: 0.0008	1	VUS
7	c.1948G>A (p.Val650Met)	10	G2B'	5.11	High	25.4	Del	Prob dam	Dis Caus	NFE: 0.027 Lat: 0.026 SA: 0.0065 Afr: 0.0041	1	VUS
8	c.2218A>T (p.Thr740Ser)	12	KS	5.77	High	22.1	Del	Prob dam	Dis Caus	NFE: 0.008	1	VUS
9	c.2369C>G (p.Ser790*)	12	KS	5.77	-	22.1	-	-	-	-	0	Pathogenic
10	c.6142C>G (p.Pro2048Ala)	12	CS2	5.26	High	18.5	Del	Poss dam	Poly	NFE: 0.022 SA: 0.022 Lat: 0.0029	1	VUS
11	c.7269delG (p.Glu2424 fs*5)	15	G3	-	-	-	-	-	-	-	2	Pathogenic
12	c.7276G>A (p.Glu2426Lys)	16	G3	5.69	High	35	Del	Prob dam	Dis Caus	EA: 0.084 SA: 0.035 Afr: 0.021 NFE: 0.0031 Lat: 0.0029	1	VUS
13	c.7276G>T (p.Gly2426*)	16	G3	5.69	High	56	-	-	-	-	2	Pathogenic
14	c.7342G>A (p.Gly2448Arg) <sup>†</sup>	17	G3	5.31	High	23.5	Del	Prob dam	Dis Caus	NFE: 0.026 Afr: 0.016 Lat: 0.014 SA: 0.0032	2	VUS

(Continued)

TABLE 1 (Continued)

Proband	Variant	Exon	Intron 1	Aggrecan domain	GerpRS	Amino acid conservation	CADD V1.3	SIFT	PolyPhen	MutationTaster	GnomAD (MAF %)	Number of affected family members	ACMG classification
15	c-7-2A>C*		Intron 1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	Pathogenic
16	c.1598C>T p.(Thr533Ile)	9	G2B	G2B	4.49	High	23.7	Del	Prob dam	Dis Caus	-	1	VUS

The co-ordinates are according to ACAN transcript NM\_013227.3. Aggrecan domains: G1 (A, B, B') and G2 (B, B') globular domains, chondroitin (CS) and keratin (KS) sulphate attachment regions, selectin-like domain (G3). Del: deleterious, Tol: tolerated, Prob dam: probably damaging, Poss dam: possibly damaging, Dis Caus: disease causing, Poly: polymorphism. CADD V1.3 values >14 were classified as deleterious. Patients 1 and 13 were included in the International Aggrecan Consortium (Gkourogianni et al., 2017). The gnomAD MAF: T: total; NFE: non-Finnish European; Lat: Latin; Afr: African; EA: East Asian; Fin: Finnish; SA: South Asian. Highly conserved amino acid (AlamutV2.10).

Gene and protein domain localization indicated. Conservation, in silico pathogenicity predictions and number of affected family members shown for each mutation. ACMG classification also indicated.

\*Splicing tools in Alamut V2.10 predicted that it may affect splicing, but a minigene assay did not confirm these predictions.

\*Splicing tools predict the ablation of intron 1 canonical splice acceptor site, which was subsequently confirmed using a minigene assay.

advanced bone age (BA).<sup>4-10</sup> This led to the creation of an International Aggrecan Consortium for the clinical and genetic evaluation of 103 ACAN heterozygotes from 20 families.<sup>6</sup> Height appeared to be less affected during childhood (median -2 SDS), and most had advanced BA compared to chronological age (CA).

Aggrecan consists of an N-terminal domain, two globular domains (G1 and G2), two interglobular domains (CS and KS attachment regions), a selectin-like domain (G3) and a C-terminal domain.<sup>11</sup> Mutations are located throughout the protein, and no genotype-phenotype correlations have been observed.<sup>6,10</sup> The pathogenic mechanisms for the accelerated bone maturation, cartilage degradation and the clinical heterogeneity remain elusive.

We present a retrospective study of the clinical and genetic findings of 16 probands with heterozygous ACAN variants, detected during routine genetic studies using a skeletal dysplasia NGS panel. We also review all cases reported in the literature to determine the frequency of the different clinical characteristics related to aggrecanopathies.

## 2 | PATIENTS AND METHODS

All participants provided informed consent for the conducted studies, and the ethical approval was obtained from the Hospital La Paz Ethical Committee.

The 16 probands were referred for molecular study from Spanish and Portuguese endocrinology and genetic clinics. Ten formed part of a cohort of 100 children with short stature and mild skeletal defects in either the proband or one of their parents, in whom SHOX defects had been previously excluded using MLPA (P018G1, MRC Holland) and DNA sequencing. Endocrine disorders including GH-IGF1-related conditions were also excluded by biochemical analysis. The remaining six probands were referred for routine skeletal dysplasia genetic diagnosis (n > 1000 patients). SHOX mutations were similarly excluded in four of these, not conducted in probands 15-16. BA and skeletal surveys were carried out. Blood samples were extracted from the proband and family members, when available.

All probands were analysed using a custom-designed skeletal dysplasia next-generation sequencing (NGS) panel, SKELETALSEQ.V3-6 (n = 315-368 genes) and sequenced on a MiSeq/NextSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA). Bioinformatic analyses were conducted as previously described.<sup>11</sup> Conservation, pathogenicity prediction analysis and population frequencies of the identified ACAN variants were carried out using CADD V1.3 (<http://cadd.gs.washington.edu/>), GerpRS (<http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/>) and Alamut V2.10 (Interactive Biosoftware, France) and gnomAD database (<http://gnomad.broadinstitute.org>). Variants were subsequently validated by Sanger sequencing as was family testing. Kinship was confirmed using microsatellite marker analysis (Devys Complete QF-PCR, Stockholm, Sweden).

After the identification of an ACAN variant, each referring clinician was asked to complete a specific aggrecanopathy clinical questionnaire including personal and familial records, anthropometric measures, facial dysmorphisms, age of puberty onset and pubertal

**TABLE 2** Clinical characteristics of probands from group 1 with short stature and mild skeletal defects. The total number presenting each clinical feature is based on paediatric cases (n = 13), thus excluding adult patient 14

Proband	Geographical origin	Mutation cDNA (protein)	Age (years)	Gender (F/M)	Anthropometric data				Facial dysmorphism				
					SGA (Y/N)	Height (SDS)	Target height (SDS)	SH/H	BA vs CA	Macrocephaly	Frontal bossing	Mid-facial hypoplasia	Depressed nasal bridge
1	Sp	c.61G>T (p.Glu21*)	4.5	F	N	-3.5	-3.0	0.56	+1.5	+	+	+	-
2	Sp	c.371G>A (p.Arg124His)	8.0	F	N	-3.7	-2.4	0.54	-2	-	-	-	-
3	Ec	c.742G>A (p.Ala248Thr)	14.5	M	N	-1.8	-2.6	0.52	0	-	-	-	-
4	Sp	c.903G>C (p.Trp301Cys)	7.0	F	N	-3.5	-3.6	NA	0	-	+	+	+
5	Sp	c.1608C>A (p.Tyr536*)	4.5	F	N	-3.5	-3.0	0.60	0	-	-	-	-
6	Ch	c.1930G>A (p.Gly644Ser)	16.0	F	N	-2.1	-2.0	0.57	0	-	-	-	-
7	Sp	c.1948G>A (p.Val650Met)	12.0	M	N	-2.6	-1.4	0.52	-3	-	-	-	+
8	Sp	c.2218A>T (p.Thr740Ser)	3.0	M	N	-3.2	NA	0.57	0	-	+	+	-
9	Sp	c.2369C>G (p.Ser790*)	14.5	M	Y	-2.2	-0.6	0.52	+2	-	+	-	-
10	Sp	c.6142C>G (p.Pro2048Ala)	12.5	F	Y	-2.2	-2.1	NA	0	-	-	-	-
11	Sp	c.7269delG (p.Glu2424 fs*5)	1.5	M	N	-3.0	-3.2	NA	+2	-	-	-	+
12	Sp	c.7276G>A (p.Glu2426Lys)	8.5	F	Y	-2.5	-1.8	NA	0	-	+	-	+
13	Sp	c.7276G>T (p.Gly2426*)	18.0	M	Y	-4.3	-3.4	0.54	0	+	-	-	-
14	Sp	c.7342G>A (p.Gly2448Arg)	46	F	NA	-3.7	-4.3	0.52	NA	-	+	+	-
TOTAL (paediatric cohort, n=13)			Median 10.2	7F 6M	4	-2.9	-2.5	0.54	3 Adv 10 Eq/Del	2	5	3	4

Geographical origin: Sp, Spain; Ec, Ecuador; Ch, China. Gender: M, male; F, female. SGA: N, no; Y, yes. SH/H, sitting height/height. BA vs CA.

+, BA > 1 year CA (advanced).

0, BA = CA (equal; between +1 and -1 year).

-, BA < 1 year CABA (delayed).

NA, Not available.

Facial dysmorphism and skeletal findings: +, present; -, absent.

sput and other associated medical conditions, similar to that previously published.<sup>6</sup> Advanced BA was defined as a BA greater than 1 year compared to the CA, while delayed BA was defined as BA less than 1 year relative to the CA. Brachydactyly was defined as short metacarpals and/or fingers. The clinical data, BA and skeletal surveys were then revised by three experts (LS-M, AO and MP). Subsequently, the 16 probands were divided into two clinical groups: those presenting with short stature and mild skeletal defects (group 1, probands 1-14) and two with SEDK (group 2, probands 15-16).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Molecular genetics

A total of 16 heterozygous *ACAN* variants were identified (Figure 1, Table 1). No other pathogenic mutation or variant of unknown significance (VUS) associated with short stature and skeletal defects, including brachydactyly, was detected in the probands. Six variants were classified as pathogenic mutations (4 nonsense,

Skeletal findings													Affected family members (n)	Affected family members height (SDS)
Broad nose and philtrum	Thin lips	High arched palate	Hypertelorism	Epicantus	Triangular face	Puberty spurt (Menarche)	Brachydactyly	Hyperlordosis	Coxa valga	Other skeletal findings	Precocious arthropathy or discopathy in family member			
-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	2	-3.0 -1.5	
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	1	-2.7	
-	-	-	-	-	-	NA	+	-	+	Mildly flattened capital femoral epiphyses, slender femora	Osteoarthritis and discopathy in mother	1	-3.0	
-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	Slender femora Osteochondral knee mild defects	Familiar osteochondritis dissecans in affected father and uncle	2	-4.4 -3.8	
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Osteochondral knee mild defects	Osteoarthritis in father	1	-4.5	
-	-	-	-	-	-	NA	+	-	-	Madelung deformity, short femoral necks, mild epiphyseal knee defects	-	1	-3.7	
-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	1	-2.6	
-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	1	-3.7	
+	-	-	+	-	-	NA	+	+	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	NA	+	-	-	-	-	1	-2.3	
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2	-5.8 -3.8	
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Cone-shaped epiphysis	-	1	-1.79	
-	-	-	-	-	-	Poor	+	-	-	Short femoral neck	-	2	-5.0 -3.7	
-	-	-	-	-	-	Poor (11y)	+	-	-	-	-	2	-4.3 -3.5	
2	2	2	1	1	1	-	13	3	3	6	3 families	18	Median -3.77	

1 frameshift and 1 splicing), while the remaining ten were classified as VUS (Table 1) using the American Society of College of Genetics and Genomics (ACMG) recommendations for classifying variants.<sup>12</sup>

Family testing was carried out in all 16 probands. Mutations were inherited in all but one case (proband 9), which appears to have arisen as a *de novo* event or due to germinal mosaicism. The variants were identified in a total of 20 family members, 19 adults and one child, all with short stature and/or mild skeletal defects or SEDK (fathers

of probands 15 and 16). Unfortunately, further cosegregation studies from multiple generations were not possible.

### 3.2 | Clinical group 1 (patients 1-14) with short stature and mild skeletal defects

Thirteen of the 14 probands were children (age range 1.5-18 years, median 10.2 years). Probands 1 and 13 were previously included in the International Aggregation Consortium study.<sup>6</sup> Clinical

characteristics are shown in Table 2. Anthropometric measurements were assessed in the 13 children of group 1. The median height SDS was below average (-2.9), sitting height-to-height ratio was in the normal range (0.54), and BMI was -0.31 SDS. Advanced BA was observed in three probands, while equal or delayed BA with respect to CA was determined in ten. Three probands had reached their final height, two of whom had had a poor pubertal spurt. Examples of growth patterns are shown in Figure S1. Radiological features and hand photographs are shown in Figures S2 and S3, respectively. Brachydactyly (short fingers and/or short metacarpals) was observed in all probands in group 1. Seven probands (53%) showed a similar phenotype with frontal bossing, depressed nasal bridge and/or mid-facial dysplasia (Table 2). Three of the patients (probands 2, 9 and 12) have recently initiated growth hormone therapy, but no response data are currently available. To determine whether the clinical characteristics were similar or different in individuals with a clearly pathogenic mutation compared to those with a VUS, we made a comparison of the clinical and radiological characteristics of these probands from group 1 (Table 3).

### 3.3 | Group 2 (probands 15-16)—SEDK

Heterozygous ACAN mutations were identified in the two probands with moderate skeletal anomalies including platyspondyly, who were subsequently diagnosed as having SEDK (Table 1). Proband 15 was found to have a mutation in the canonical splice acceptor site of intron 1 (c.-7-2A>C), which is predicted to result in the removal of exon 2, where the initiation codon is located. We demonstrated, using a minigene assay, that this mutation indeed ablated the intron 1 splice acceptor site, thus confirming the pathogenicity of this variant (Figure S4). The second case, proband 16, has a missense variant (VUS) in ACAN (p.Thr533Ile). Clinical and radiological characteristics of both probands are shown in Table 4 and Figure S2, respectively.

## 4 | DISCUSSION

A total of 16 heterozygous variants were detected throughout ACAN, 14 in individuals with short stature, mild skeletal defects and/or facial dysmorphisms (group 1) and two with SEDK (group 2). No other mutation/variant was identified in the skeletal dysplasia patient in the 16 probands, which could explain their phenotype. As functional characterization is not currently feasible for confirming the pathogenicity of the ACAN VUS, we compared the clinical features in probands from group 1 with a pathogenic mutation (nonsense, frameshift, splicing,  $n = 5$ ) and those with VUS (missense variants,  $n = 8$ ) (Table 3). Individuals with a pathogenic mutation were shorter (median -3.33 vs -2.7 SDS), and 60% had an advanced BA compared to 0% in those with a VUS. Advanced BA:CA was only observed in 3/5 individuals with a pathogenic mutation; thus, two individuals had a BA equal or delayed with respect to the CA. To date, a total of 58 probands and 106 family members (total = 164

heterozygous ACAN-positive individuals with short stature and mild skeletal defects) have been reported in this study and in the literature (Table 5).<sup>4-10</sup> Although advanced BA is a good indicator for the presence of mutations in ACAN, it cannot be the principal selection criteria. The other major difference was that a third of the individuals with a VUS had coxa valga, whereas no individual with a pathogenic mutation presented with this clinical feature. Nevertheless, other features such as skeletal defects, facial dysmorphisms and precocious arthropathy or discopathy were present at similar frequencies in both variant classification groups. An interesting observation and in contrast to previous data, brachydactyly was observed in all probands.

After analysing the individuals according to the variant classification, we conducted a study of the clinical features of the probands and affected family members from group 1 ( $n = 32$ ; 14 children and 18 adults). No sex or ethnic differences were observed. Only 23% of the children had advanced BA, once again significantly lower than that previously described (Table 5). The degree of short stature was also very variable. Another previously undescribed feature was the presence of mild hip abnormalities in five probands (38%). Parents of two of these probands suffer with osteoarthritis. Osteoarthritis and disc disease were uncommon in our cohort with only three parents having these medical complications (23%) (Table 5).

Clinical heterogeneity occurred in some families, as previously reported in a few cases.<sup>6,10</sup> Proband 3 (p.Ala248Thr- VUS) presents with normal stature although in the lower range (-1.8 SDS), BA is equal to CA but has brachydactyly and minor skeletal defects. He has not yet reached adult height, and early growth cessation occurs in this growth disorder. His mother, with the same variant, presents with short stature (-3 SDS), precocious osteoarthritis and discopathy. Thus, the differences in height and clinical presentation are likely to be associated with age. In a similar way, proband 12 (p.Glu2426Lys- VUS) presents with short stature (-2.5 SDS), BA equal to CA, mild dysmorphic features and skeletal defects. Her father has the same variant but has normal stature although within the lower limit (-1.79 SDS) and only brachydactyly. This clinical heterogeneity is similarly observed in other skeletal dysplasias such as those associated with heterozygous SHOX or NPR2 mutations.<sup>13</sup>

Two heterozygous ACAN variants (1 pathogenic and 1 VUS) were identified in two individuals with SEDK. To date, only one SEDK case with an ACAN mutation in the CS1 domain has been reported in the literature.<sup>1</sup> Prior to the implementation of NGS, patients with this form of spondyloepiphyseal dysplasia were generally tested for mutations in COL2A1 and, if negative, remained molecularly undiagnosed. Thus, further cases may be identified in the future.

Interestingly, proband 6 presented with Madelung deformity and proband 15 and his father, considered to have SEDK, have curved radii and limited elbow extension. Madelung deformity is typically observed in individuals with Léri-Weill dyschondrosteosis (MIM 127300), isolated or due to post-traumatic conditions.<sup>14</sup> SHOX defects have been excluded in all probands. This observation is not

**TABLE 3** Comparison of clinical features observed in group 1 child probands (n = 13) with pathogenic mutations (n = 5) and VUS (n = 8) as classified by ACMG

Variant type (n = number of probands)	Inheritance/de novo	SGA	Median height SDS	Target height SDS	SH/H	BA vs CA (Adv or Equal/Delayed) (%)	Facial dysmorphism (%)	Brachydactyly (%)	Hyperlordosis (%)	Coxa valga (%)	Other skeletal findings (%)	Precocious arthropathy or discopathy in family member (%)	Affected family members height SDS
Pathogenic mutation (n=5)	4 AD 1 de novo	2	-3.33	-2.64	0.550	3 Adv (60%) 2 Equal/ Delayed (40%)	4 80%	5 100%	2 40%	0 0%	2 40%	1 20%	-5.8/-1.50
VUS (missense) (n=8)	8 AD	2	-2.70	-2.27	0.544	8 Equal/ Delayed (100%)	5 62%	8 100%	1 12%	3 37%	4 50%	2 25%	-4.4/-1.79

AD, autosomal dominant; SGA, small for gestational age; SH/H, sitting height./height; BA vs. CA: bone age vs chronological age; Adv, advanced BA (>1 year); Equal/Delayed, BA equal to CA or delayed (<1 year).

**TABLE 4** Clinical and genetic features of probands 15 and 16, both with SEDK

Proband origin	Geographical origin	Mutation	Gender (M/F)	Age (years)	SGA (Y/N)	Height SDS	SH/H	Target height SDS	BA vs CA	Facial dysmorphism	Morphologic findings	Skeletal findings	Affected family members
15	Pt	c.-7-2A>C (intron 1)	M	7.5	Y	-4.20	0.53	-3.6	-2	No	Stocky appearance, short neck, limited elbow extension	Brachydactyly, curved radius, mild platyspondyly	Father's height -3.66 SDS Stocky appearance, obese, brachydactyly with shortened metacarpals, curved radius, limited extension of elbows platyspondyly, coxarthrosis
16	Sp	c.1598C>T (exon 8) p.(Thr533Ile) (G2 domain)	M	10	N	-0.76	NA	-0.54	=	No	Obesity, short trunk, waddling gait	Bilateral irregular femoral epiphyses, mild thoracic platyspondyly	Father's height -0.38 SDS, limp.

Geographical origin: Pt, Portugal; Sp, Spain. BA vs CA: BA, bone age; CA, chronological age; +, BA > CA (advanced), =, BA = CA (equal); -, BA < CA (delay); NA, not available.

**TABLE 5** Overview table of main molecular and clinical characteristics of individuals with heterozygous ACAN variants/mutations and short stature (excluding SEDK and familial osteochondritis dissecans) reported in the current study and previously in the literature

Reference (ref number)	Number of patients (children/adults) from X families	SGA	Range of height (SDS) Children Adults	Advanced BA in children	Frontal bossing	Flat nasal bridge	Mid-facial hypoplasia	Brachydaactly metacarpal	Short thumbs and/or short first metacarpal	Broad great toes	Hyperlordosis	Hip anomalies	Mild osteochondral knee defects	Early growth cessation (adults)	Early-onset arthritis/OD (families)	Intervertebral disc disease (families)
Nilsson et al., <sup>4</sup>	14 (5/9)* 3 families	2/4	-4.0/-1.2 -3.8/-2.3	3/5	NR	NR	6/9	6/9	3/9	NR	NR	NR	NR	5/5	1/3	0/3
Quintos et al., <sup>5</sup>	3 (1/2)** 1 family	0/1	-2.70 -4.7/-2.6	1/1	NR	NR	1/3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	2/2	0/1	0/1
Manouk van der Steen et al., <sup>7</sup>	10 (4/6) 3 families	3/3	-3.7/-2.4 -5.4/-3.7	3/4	NR	NR	9/10	NR	3/10	6/10	3/10	NR	NR	NR	3/3	0/3
Gkourogianni et al., (International Aggrecon Consortium) <sup>6</sup>	102* (32/70) 20 families	NR	-4.2/-0.6 -5.9/-0.9	19/23 probands	2/32 probands	8/20	8/20	5/20	3/20	NR	NR	NR	NR	23/70	13/20	8/20
Dateki et al., <sup>8</sup>	4 (2/2) 1 family	0/2	-2.7/-2.5 -3.1/-3.0	2/2	NR	NR	3/4	NR	NR	NR	1/4	NR	NR	NR	0/1	1/1
Hu et al., <sup>9</sup>	9 (3/6) 3 families	1/1	-4.3/-2.9 -5.4/-2.9	0/3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0/3	0/3
Hauer et al., <sup>10</sup>	11 (6/5) 6 families	1/6	-3.9/-2.0 -3.8/-1.8	2/5	3/6	NR	NR	3/6	2/6	2/6	NR	1/6	NR	NR	1/6	NR
Current study	32 (14/18)** 14 families	4/13	-4.3/-1.86 -5.4/-1.79	3/13	5/13	4/13	3/13	12/13	11/13	NR	3/13	5/13	3/13	6/6	3/14	1/14
Summary <sup>§</sup>	164 (59/105) 45 families	11/40	-4.7/-0.6 -5.9/-0.9	28/45	9/49	4/13	22/39	19/28	19/38	8/16	7/27	5/13	3/13	27/74	20/45	10/39

NR, nonsense mutation; Fs, frameshift mutation; Spl, splice donor site variant; Mis, missense variant; NR, not reported.

\*Three families are included in the International Aggrecon Consortium (5 children, 9 adults).<sup>6</sup>

\*\*the family reported in this study is included in the International Aggrecon Consortium (1 child, two adults).<sup>6</sup>

\*\*\*two families (two children, two adults) are included in the International Aggrecon Consortium.<sup>6</sup> Results shown here are related to the paediatric cohort.

†Gkourogianni et al. 2017<sup>6</sup> reported a large cohort of probands and relatives (International Aggrecon Consortium). Clinical and molecular characteristics are related to the 20 families, not to individuals as with the other studies. In addition, data were compiled from both adults and children. We have attempted to separate these data when possible.

§Combined data from the current study and previous studies. The numbers documented for type of mutation, early-onset arthritis/OD and intervertebral disc disease data are given as the number of families, while the other characteristics are totals for the number of individuals (probands or adults). Once again, most of the data from the International Aggrecon Consortium († ref [6]) cannot be summarized as the data are presented for families rather than individuals. Patients included in three earlier studies (\*, \*\*, \*\*\*) have not been duplicated in these data.

that surprising as SHOX binds to SOX5 and SOX6 which along with SOX9 (SOX trio) activate an aggrecan enhancer, thus participating in common regulatory pathways in chondrogenesis.<sup>15</sup>

The description of our cohort supports the undertaking of a detailed clinical examination and skeletal survey in short stature individuals with suspicion of a mild skeletal dysplasia. Our observation of an association with brachydactyly may help clinicians to request genetic analysis of ACAN.

For now, the diagnosis of this dysplasia is paramount for patients and their families. Individuals with ACAN mutations are at risk of short stature, early growth cessation and poor pubertal spurt, and other health-related problems such as obesity and orthopaedic problems should be prevented or their effects reduced. Careful monitoring of patients with ACAN mutations may help us to identify important genotype-phenotype correlations and to understand their long-term clinical outcomes. Additional familial studies, analysis of larger cohorts, generation of animal models and functional analysis will be also required to determine the incidence of ACAN mutations and the pathogenic mechanism(s).<sup>16</sup>

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the families for their participation in this study. This work was supported in part by the following grants: SAF2012-30871 and SAF2015-66831-R from the MINECO (to K.E.H) and Fundación SEEP (L.S-M and K.E.H). S.B-S was awarded a postdoctoral CIBERER fellowship.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have nothing to disclose.

## ORCID

Lucía Sentchordi-Montané  <http://orcid.org/0000-0002-4083-3352>

Karen E. Heath  <http://orcid.org/0000-0002-5816-7044>

## REFERENCES

- Gleghorn L, Ramesar R, Beighton P, Wallis G. A mutation in the variable repeat region of the aggrecan gene (AGC1) causes a form of spondyloepiphyseal dysplasia associated with severe, premature osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2005;77:484-490.
- Tompson SW, Merriman B, Funari VA, et al. A recessive skeletal dysplasia, SEMD aggrecan type, results from a missense mutation affecting the C-type lectin domain of aggrecan. *Am J Hum Genet.* 2009;84:72-79.
- Stattin EL, Wiklund F, Lindblom K, et al. A missense mutation in the aggrecan C-type lectin domain disrupts extracellular matrix interactions and causes dominant familial osteochondritis dissecans. *Am J Hum Genet.* 2010;86:126-137.
- Nilsson O, Guo MH, Dunbar N, et al. Short Stature, accelerated bone maturation, and early growth cessation due to heterozygous aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E1510-E1518.
- Quintos JB, Guo MH, Dauber A. Idiopathic short stature due to novel heterozygous mutation of the aggrecan gene. *J Ped Endocrinol Metab.* 2015;28:927-932.
- Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, et al. Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;102:460-469.
- Van der Steen M, Pfundt R, Maas SJWH, Bakker-van Waarde WM, Roelof J, Odink RJ, Hokken-Koelega ACS. ACAN gene mutations in short children born SGA and response to Growth Hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102:1458-1467.
- Dateki S, Nakatomi A, Watanabe S, et al. Identification of a novel heterozygous mutation of the aggrecan gene in a family with idiopathic short stature and multiple intervertebral disc herniation. *J Hum Genet.* 2017;62:717-721.
- Hu X, Gui B, Su J, et al. Novel pathogenic ACAN variants in non-syndromic short stature patients. *Clin Chim Acta.* 2017;469:126-129.
- Hauer NN, Sticht H, Boppudi S, et al. Genetic screening confirms heterozygous mutations in ACAN as a major cause of idiopathic short stature. *Sci Rep.* 2017;7:12225.
- Barraza-García J, Rivera-Pedroza CI, Hisado-Oliva A, et al. Broadening the phenotypic spectrum of POP1-skeletal dysplasias: Identification of POP1 mutations in a mild and severe skeletal dysplasia. *Clin Genet.* 2017;92:91-98.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405-424.
- Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AL, Santaolalla-Caballero F, et al. Heterozygous NPR2 mutations cause disproportionate short stature, similar to Léry-Weil dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100:E1133-E1142.
- Knutson EJ, Goldfarb CA. Madelung deformity. *Hand (N.Y.).* 2014;9:289-291.
- Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, et al. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet.* 2011;20:1547-1559.
- Gibson BG, Briggs MD. The aggrecanopathies: an evolving phenotypic spectrum of human genetic skeletal diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11:86.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

**How to cite this article:** Sentchordi-Montané L, Aza-Carmona M, Benito-Sanz S, et al. Heterozygous aggrecan variants are associated with short stature and brachydactyly: Description of 16 probands and a review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf.)*. 2018;88:820–829. <https://doi.org/10.1111/cen.13581>



## Artículo 4

**"*IHH* gene mutations causing short stature with nonspecific skeletal abnormalities and response to growth hormone therapy"**

**Mutaciones en *IHH* como causa de talla baja y anomalías esqueléticas inespecíficas; respuesta a tratamiento con hormona de crecimiento**

**J Clin Endocrinol Metab. 2018;103(2):604-614**

Se estudiaron 17 familias con talla baja autosómica dominante mediante secuenciación completa del exoma y además se realizó cribado de variantes en *IHH* en 290 pacientes con talla baja (incluyendo TBI, talla baja con antecedente de PEG y talla baja con braquidactilia inespecífica o sospecha de displasia esquelética leve), con el objetivo de investigar la etiología de la talla baja. Se efectuaron estudios moleculares para evaluar el impacto potencial de las variantes en *IHH* en el extremo N-terminal.

Se identificaron 10 variantes patogénicas o posiblemente patogénicas en *IHH*. Los estudios de simulación molecular revelaron una menor energía potencial de las moléculas de *IHH* mutadas en el extremo N-terminal frente a moléculas nativas.

Las variantes identificadas cosegregaban con talla baja con un patrón de herencia autosómico dominante. Los individuos afectados manifestaron típicamente talla baja con desproporción leve y el hallazgo frecuente de acortamiento de la falange media del quinto dedo. Ninguno de ellos presentó los rasgos clásicos de braquidactilia A1, previamente asociada con variantes en *IHH*. Cinco de estos pacientes presentaron buena respuesta al tratamiento con hormona de crecimiento recombinante humana, con una media de mejoría de talla al cabo de un año de tratamiento de 0.6 desviaciones estándar. No se dispone de datos a talla final.

El estudio demuestra la asociación de variantes patogénicas en *IHH* con talla baja y anomalías esqueléticas no específicas. Establece, así mismo, la relevancia de *IHH* como causa de talla baja, así como una buena respuesta preliminar al tratamiento con hormona de crecimiento.

## ***IHH* Gene Mutations Causing Short Stature With Nonspecific Skeletal Abnormalities and Response to Growth Hormone Therapy**

Gabriela A. Vasques,<sup>1</sup> Mariana F. A. Funari,<sup>2</sup> Frederico M. Ferreira,<sup>3</sup> Miriam Aza-Carmona,<sup>4,5,6</sup> Lucia Sentchordi-Montané,<sup>4,5</sup> Jimena Barraza-García,<sup>4,5,6</sup> Antonio M. Lerario,<sup>1,7</sup> Guilherme L. Yamamoto,<sup>8,9</sup> Michel S. Naslavsky,<sup>9</sup> Yeda A. O. Duarte,<sup>10</sup> Debora R. Bertola,<sup>8</sup> Karen E. Heath,<sup>4,5,6</sup> and Alexander A. L. Jorge<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Endocrinologia Genética (LIM/25), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 01246-903; <sup>2</sup>Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 05403-010; <sup>3</sup>Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 05403-900; <sup>4</sup>Institute of Medical and Molecular Genetics, IdiPAZ, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain 28049; <sup>5</sup>Centro de Investigación Biomedica em Red de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain 28029; <sup>6</sup>Skeletal Dysplasia Multidisciplinary Unit, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain 28046; <sup>7</sup>Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109; <sup>8</sup>Unidade de Genética Clínica, Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 05403-000; <sup>9</sup>Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 05508-090; and <sup>10</sup>Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 03178-200

**Context:** Genetic evaluation has been recognized as an important tool to elucidate the causes of growth disorders.

**Objective:** To investigate the cause of short stature and to determine the phenotype of patients with *IHH* mutations, including the response to recombinant human growth hormone (rhGH) therapy.

**Patients and Methods:** We studied 17 families with autosomal-dominant short stature by using whole exome sequencing and screened *IHH* defects in 290 patients with growth disorders. Molecular analyses were performed to evaluate the potential impact of *N*-terminal *IHH* variants.

**Results:** We identified 10 pathogenic or possibly pathogenic variants in *IHH*, an important regulator of endochondral ossification. Molecular analyses revealed a smaller potential energy of mutated *IHH* molecules. The allele frequency of rare, predicted to be deleterious *IHH* variants found in short-stature samples (1.6%) was higher than that observed in two control cohorts (0.017% and 0.08%;  $P < 0.001$ ). Identified *IHH* variants segregate with short stature in a dominant inheritance pattern. Affected individuals typically manifest mild disproportional short stature with a frequent finding of shortening of the middle phalanx of the fifth finger. None of them have classic features of brachydactyly type A1, which was previously associated with *IHH* mutations. Five patients heterozygous for *IHH* variants had a good response to rhGH therapy. The mean change in height standard deviation score in 1 year was 0.6.

**Conclusion:** Our study demonstrated the association of pathogenic variants in *IHH* with short stature with nonspecific skeletal abnormalities and established a frequent cause of growth disorder, with a preliminary good response to rhGH. (*J Clin Endocrinol Metab* 103: 604–614, 2018)

**M**ost apparently healthy children with short stature are classified as having idiopathic short stature (ISS). The conventional evaluation based on clinical findings complemented by laboratory and image examinations is unable to identify the cause of growth impairment observed in these children. Variation in human height is mostly explained by heritable factors; thus, genetic evaluation could elucidate the causes for growth disorders (1). Common polymorphisms are associated with height in healthy individuals, with a small effect size per locus (2). Alternatively, there is evidence that rare genetic variants are involved with larger effects on stature (3–5). The candidate gene approach has identified defects in a few genes associated with growth impairment observed in children classified as ISS (6). Recently, several whole-exome sequencing (WES) studies have reported gene defects responsible for distinct forms of short stature, including genes expressed in growth plate (7). Heterozygous mutations in *ACAN* have been identified in families with ISS with accelerated bone maturation (8, 9). An *FBN1* mutation was identified in two patients with severe short stature and mild form of acromicric dysplasia (10). Finally, heterozygous mutations in *NPPC* were recently associated with autosomal-dominant short stature and small hands phenotype (11). Hence, WES is a potent tool to screen for candidate genes, identify associations between genes and the phenotype, and broaden the phenotypic spectrum of growth disorders associated with a known gene.

In the current study, we first investigated families with autosomal-dominant short stature through WES. This approach allowed us to identify three families with pathogenic variants in the Indian hedgehog gene [*IHH*, Mendelian Inheritance in Man (MIM) 600726]. This gene codifies an important paracrine regulator of endochondral ossification. Heterozygous mutations in *IHH* are recognized as the cause of brachydactyly type A1 (BDA1; MIM 112500) (12). Because our patients with heterozygous *IHH* variants did not present classic features of this skeletal dysplasia, we have expanded the investigation of *IHH* defects in a large cohort of patients with ISS and patients with mild skeletal dysplasia. Our results have extended the known phenotype of *IHH* defects and revealed that heterozygous *IHH* mutations are a fairly frequent cause of short stature with nonspecific skeletal abnormalities (MIM 616255). Additionally, we have observed a good short response to recombinant human growth hormone (rhGH) in affected patients under therapy.

## Patients and Methods

### Patients

The respective local ethics committees approved the studies, and the patients or guardians gave their written informed consent. WES was performed on 17 independent Brazilian families with autosomal-dominant ISS as part of an exome sequencing project of patients with growth disorders. All probands fulfilled the following diagnostic criteria: normal birth weight for gestational age, height standard deviation score (SDS)  $\leq -2$ , unremarkable medical history, and absence of abnormal findings on clinical examination or in laboratory tests that could account for short stature. A second Brazilian cohort of children with short stature of unknown cause [111 with ISS and 19 born small for gestational age (SGA) but with family history of short stature] had *IHH* screened by Sanger sequencing (n = 81) or targeted gene sequencing panel (n = 49). Clinical characteristics of the Brazilian cohort are shown in Supplemental Table 1. Additionally, a Spanish cohort of short-stature patients referred for unspecific brachydactyly (n = 60) or mild skeletal dysplasia (n = 100) was evaluated with a skeletal dysplasia–targeted gene sequencing panel that included *IHH*. In all enrolled patients and their relatives, genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes by using standard techniques. A cohort of 609 Brazilian elderly adults (<http://abraom.ib.usp.br/>), representative of the healthy population, was analyzed with WES and was used to compare the frequency of *IHH* variants in the Brazilian healthy population.

### Exome sequencing

We performed WES in the probands and their first-degree relatives according to previously published protocols (10, 13). Briefly, the libraries were constructed with the SureSelect Target Enrichment System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) according to the manufacturer's instructions. The sequences were generated in the HiSeq 2500 platform (Illumina, San Diego, CA) running on paired-end mode. Reads were aligned to the GRCh37/hg19 assembly of the human genome with the Burrows-Wheeler Alignment (BWA-mem) aligner. Variant calling included single-nucleotide variants and small insertions and deletions and was performed with FreeBayes. The resulting data (in variant call format) were annotated with ANNOVAR. The median coverage of the target bases was 114 $\times$ , with 97% of the target bases having  $\geq 10\times$  coverage.

### Targeted sequencing

Patients were analyzed by a customized panel of targeted sequencing, which included *IHH* [for Brazilian patients: Agilent SureSelect assay (Agilent Technologies); for Spanish patients: NimbleGen SeqCap EZ capture (Roche, Pleasanton, CA)]. Sequencing was performed on an Illumina MiSeq or NextSeq platform in paired-end mode. Inhouse bioinformatic analysis was performed. The sequences were aligned to the reference human assembly (GRCh37/hg19). The median coverage of the target bases was 409 $\times$  and 215 $\times$ , with 95% and 94.1% of the target bases being covered  $\geq 20\times$  for Brazilian and Spanish patients, respectively.

## Data analysis

The exome and the targeted panel sequencing data were screened for rare variants (minor allele frequency < 0.1% in public and in-house databases) located in exonic regions and consensus splice site sequences. Subsequently, our variant filtration prioritized genes on the basis of their potential to be pathogenic: loss-of-function variants and variants predicted to be pathogenic by multiple *in silico* programs. For variants identified by WES, we selected variants that fitted an autosomal-dominant model in the selected families (Supplemental Figs. 1–3). The sequencing reads carrying candidate variants were inspected visually using the Integrative Genomics Viewer (Broad Institute, Cambridge, MA).

## Sanger sequencing

All putative pathogenic variants observed by exome and targeted panel sequencing as well as segregation analysis in the families were validated and genotyped by Sanger sequencing. The primers for *IHH* candidate gene screening were designed to amplify all exons and exon-intron boundaries of the NM\_002181.3 transcript (primer sequences and amplification protocols are available upon request). Polymerase chain reaction products were bidirectionally sequenced and analyzed in an ABI 3100/3700XL sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## Pathogenicity analysis of identified variants

The pathogenicity of the variants identified during genetic analysis was classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP) guidelines (13). To support the interpretation of familial cosegregation, a mathematical quantitative criterion was added to the ACMG/AMP guidelines to allow a statistical quantification of familial aggregation data (14). Population data criteria were evaluated by using two public genomic databases: Genome Aggregation Database (gnomAD: <http://gnomad.broadinstitute.org/>) and Brazilian genomic variants (ABraOM: <http://abraom.ib.usp.br/>). Several

different computational tools were used to obtain predictive data of each variant (Supplemental Table 2). Because the crystal structure of the N-terminal domain of human *IHH* had been resolved, the potential impact of the mutations located in this region (Table 1) was further evaluated by molecular simulations carried out with the human *IHH* molecular model and its mutated versions (Supplemental Methods).

To provide additional genetic evidence of the association of *IHH* with short-stature phenotype with nonspecific skeletal findings (15), we performed aggregate variant analyses comparing allele frequencies between our cohorts of patients and public databases (gnomAD and ABraOM). In these databases, we selected variants with similar characteristics of the *IHH* variants observed in our cohort of short stature patients: rare variants (minor allele frequency < 0.01) with loss-of-function effect (stop gain, frame-shift, or consensus splicing site variants) or rare nonsynonymous variants predicted to be pathogenic by at least four *in silico* tools (PROVEAN, SIFT, PolyPhen-2, and Mutation Assessor). Allele frequency differences between groups were analyzed by  $\chi^2$  test, and statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were performed by using the SIGMAstat statistical software package (Windows version 4.0; SPSS Inc., San Rafael, CA).

## Results

### Genetic analysis

Three different heterozygous *IHH* variants were identified in 3 of 17 families with ISS individuals analyzed through WES (Fig. 1A–1C; Supplemental Figs. 1–3). Because the affected individuals did not present specific signs of a skeletal dysplasia (including BDA1), we screened 130 children with short stature of unknown cause for rare variants in *IHH*. In this group, another two heterozygous *IHH* variants were identified (Fig. 1D and 1E). Among a cohort of Spanish patients with short stature and

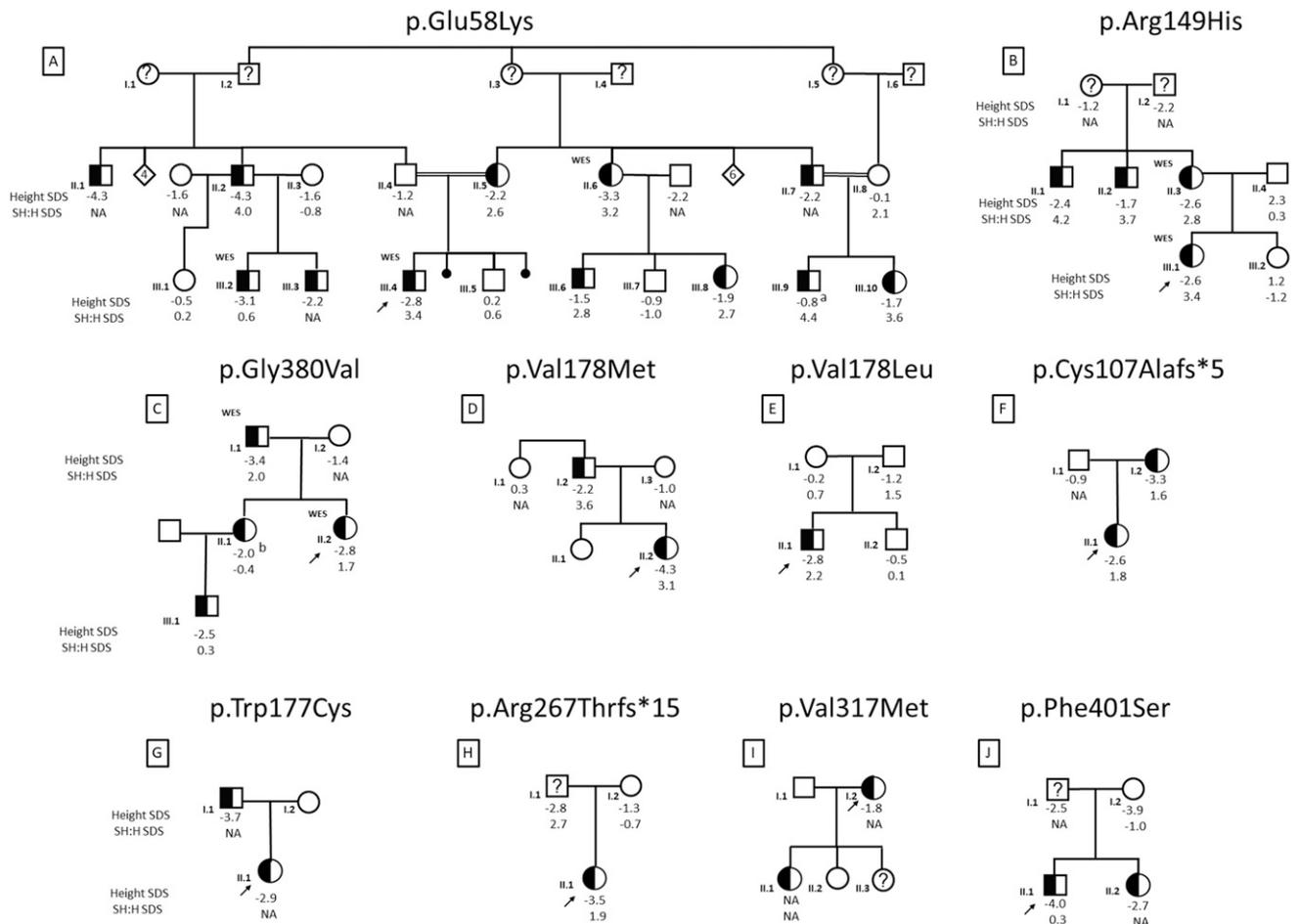
**Table 1. In Silico Analysis and ACMG/AMP Classification of *IHH* Identified Variants**

<i>IHH</i> cDNA Variant <sup>a</sup> (Protein)	Domain	SIFT	Polyphen	Mutation Assessor	PROVEAN	CADD V1.3	GERP ++	ACMG-AMP Classification
Identified in Brazilian patients								
c.172G>A (p.Glu58Lys)	N-terminal signaling domain	0/D	1.0/D	3.085/M	−3.03/D	33.0	4.22	Pathogenic
c.446G>A (p.Arg149His)	N-terminal signaling domain	0.01/D	1.0/D	3.085/M	−4.63/D	35.0	5.78	Likely pathogenic
c.532G>A (p.Val178Met)	N-terminal signaling domain	0.02/D	0.99/D	3.085/M	−2.77/D	32.0	5.68	Likely pathogenic
c.532G>C (p.Val178Leu)	N-terminal signaling domain	0/D	0.699/P	3.085/M	−2.77/D	24.7	5.68	Pathogenic
c.1139G>T (p.Gly380Val)	C-terminal domain	0.04/D	1.0/D	3.235/M	−5.87/D	29.0	4.64	Likely pathogenic
Identified in Spanish patients								
c.319delT (p.Cys107Alafs*5)	N-terminal signaling domain	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
c.531G>C (p.Trp177Cys)	N-terminal signaling domain	0/D	1.0/D	3.075/M	−11.96/D	25.9	5.68	Likely pathogenic
c.797dupC (p.Arg267Thrfs*15)	C-terminal domain	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
c.949G>A (p.Val317Met)	C-terminal domain	0.01/D	0.998/D	3.145/M	−2.12/N	26.3	5.16	Likely pathogenic
c.1202T>C (p.Phe401Ser)	C-terminal domain	0.009/D	0.99/D	2.470/M	−2.78/D	28.9	4.64	Likely pathogenic

ACMG/AMP classification (13, 14).

Abbreviations: cDNA, complementary DNA; NA, not available.

<sup>a</sup>Gene transcript ID: NM\_002181.3, Gene:ENSG00000163501, transcript: ENST00000295731.



**Figure 1.** Pedigrees of the affected families carrying heterozygous *IHH* mutations. (A–E) Brazilian families with ISS. (F–J) Spanish families with mild skeletal dysplasia or brachydactyly. The arrows indicate the probands, and WES indicates individuals who underwent WES. Individuals with heterozygous *IHH* mutations are indicated by half-filled symbols, whereas individuals homozygous for *IHH* wild-type allele are indicated as open symbols. Question marks indicate an unknown genotype. Height SDS and SH:H SDS at first medical visit are shown below the symbols. Abbreviation: NA, no data available. <sup>a</sup>Adult height SDS of  $-1.9$ ; <sup>b</sup>previous treatment with rhGH.

mild skeletal dysplasia or brachydactyly ( $n = 160$ ), five additional heterozygous *IHH* variants were identified by targeted sequencing (Fig. 1F–1J). Thus, a total of 10 heterozygous *IHH* variants were identified, 2 frameshift mutations resulting in the premature termination of the protein, and 8 missense variants (Table 1). All of them are predicted to be pathogenic by multiple *in silico* programs. Six of the variants are located in the N-terminal domain [p.Glu58Lys (c.172G>A), p.Arg149His (c.446G>A), p.Cys107Alafs\*5 (c.319delT), p.Trp177Cys (c.531G>C), p.Val178Leu (c.532G>C), p.Val178Met (c.532G>A)], and four are located in the C-terminal domain [p.Arg267Thrfs\*15 (c.797dupC), p.Val317Met (c.949G>A), p.Gly380Val (c.1139G>T), p.Phe401Ser (c.1202T>C)]. Nine of the variants are absent in public databases, whereas the p.Val317Met variant is present at an extremely low allelic frequency (1/241,680) in gnomAD. Eight of the variants were confirmed to segregate with the autosomal-dominant short-stature phenotype (Fig. 1). One variant was *de novo* (paternity and maternity confirmed). Thus, after

applying the ACMG-AMP guidelines, four variants were classified as pathogenic and six as likely pathogenic (Table 1).

Primary sequence analyses showed that all *IHH*-mutated amino acid residues are extremely conserved among non-redundant homologous and related sequences. Although some hydrogen bonds were locally disrupted near the mutated amino acid residues, in general, the presence of the mutations provided more molecular contacts for the whole molecules (Supplemental Fig. 4). In addition, results of the *IHH* molecular simulations revealed that *IHH* models bearing N-terminal mutations presented a smaller mean potential energy compared with that of the native molecules (Supplemental Table 3; Supplemental Fig. 5). Conversely, except for the *IHH* Glu58Lys and Arg149His molecules, the binding energies of the atoms Zn412, Ca413 and Ca414 to all others mutated molecules are greater than that of the wild type one (Supplemental Table 3).

The allele frequency of rare *IHH* variants predicted to be deleterious found in both cohort of patients with short

stature (1.7% and 1.56% for Brazilian and Spanish cohorts, respectively) was expressively higher than that observed in individuals from gnomAD (0.017%;  $P < 0.001$ ) (Table 2). Considering only the Brazilian cohort, we also observed a significantly higher frequency of rare *IHH* variants predicted to be deleterious in short-stature individuals (1.7%) in comparison with the ABraOM database [1/1218 alleles (0.08%);  $P < 0.001$ ] (Table 2; Supplemental Fig. 6). Furthermore, the allele frequency of *IHH* variants was similar in Brazilian children with [4/214 alleles (1.9%)] or without [1/80 alleles (1.3%)] familial short stature.

### Clinical phenotypes

The phenotypic characteristics of the probands and other children with heterozygous *IHH* variants are shown in Table 3. Four of the 12 Brazilian children were born SGA regarding birth length, and the other 8 had a birth length SDS in the lower part of the normal range (mean birth length,  $-1.4 \pm 0.09$  SDS; range,  $-2.7$  to  $-0.1$  SDS). The mean height SDS of the Brazilian children was  $-2.6 \pm 0.9$  (range,  $-4.3$  to  $-0.8$  SDS). The affected patient (AIII.9) with a height SDS of  $-0.8$  (Fig. 1A) was a 14.6-year-old boy with advanced bone age (16.5 years), and his adult height SDS is  $-1.9$ . Most affected Brazilian children ( $n = 8/12$ ) presented mild disproportionate short stature [mean sitting height to height ratio (SH:H) SDS,  $2.4 \pm 1.2$ ; range, 0.3 to 3.6]. Most affected children had mild delayed bone age, but we observed two of them with advanced bone age (Table 3 individuals AIII.6 and AIII.9). Abnormal hand radiographs were observed in 6 of 12 Brazilian children. Two children presented only shortening of the middle phalanx of the fifth finger. Other radiological hand findings include varying degrees of shortening of the middle phalanx of the second and fifth fingers with cone-shaped epiphyses (Fig. 2A; Supplemental Fig. 7). Foot radiographs of patients with heterozygous *IHH* mutations showed a recurrent shortening of the distal phalanx of the hallux. Other radiological findings observed in feet

were cone-shaped epiphyses of proximal phalanges of the second, third, fourth, and fifth toes (Fig. 2B; Supplemental Fig. 8).

All five Spanish cases were detected in a cohort of patients with mild skeletal dysplasia (3/100) or suspected to have brachydactyly (2/60). Low birth length ( $-2.9$  SDS) was observed in one patient (GII.1). The height SDS of Spanish children ranged from  $-4.0$  to  $-2.6$  SDS (mean,  $-3.2 \pm 0.6$  SDS). SH:H SDS values were in the upper part of the normal range (1.8 and 1.9 SDS) in two of three available probands. Patient JII.1 had a severe delay ( $-3.8$  years) in bone age with respect to chronological age. All five patients had mild abnormal skeletal surveys, typically shortening of middle phalanx of the second and fifth fingers (Supplemental Fig. 7).

A total of 14 adult individuals heterozygous for *IHH* variants could be assessed (10 Brazilian and 4 Spanish). Their mean height SDS was  $-3.0 \pm 1.1$  (range,  $-4.3$  to  $-1.7$ ). Eight of nine affected adult individuals available have altered body proportion (SH:H SDS ranged from 2.0 to 4.2) (Supplemental Table 4).

### Growth response to rhGH treatment

Five patients, all from the Brazilian cohort, with heterozygous *IHH* variants have been treated with rhGH therapy ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ) (Table 4). The onset of treatment was prepuberty in all of them. One girl had started puberty during the first year of rhGH treatment (patient CII.2). After exclusion of this patient from first-year growth response, the four remaining patients had a mean improvement in height SDS of 0.6 (range, 0.46 to 0.79) and their height velocity ranged from 8.0 to 10.8 cm/y.

### Discussion

Longitudinal bone growth is essential to determine adult body height and depends on the growth plate chondrogenesis, a complex process regulated by endocrine and paracrine factors. Over the past years, mutations in different genes involved in the growth plate have been

**Table 2. Comparison of Allele Frequency for Rare and Potential Deleterious Alleles Between Patients Selected for Short Stature and Public Databases**

Variable	Potential Deleterious Alleles <sup>a</sup>	Total No. of Analyzed Alleles	Allele Frequency (%)
gnomAD	40	236,524	0.017
ABraOM	1	1218	0.082
Brazilian cohort of children with short stature of unknown cause	5	294	1.70 <sup>b</sup>
Spanish cohort of patients with mild skeletal dysplasia	5	320	1.56 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Rare variants (MAF of 0.01) with loss-of-function effect (stop gain, frameshift, or consensus splicing site variants) or rare nonsynonymous variants predicted to be pathogenic by at least four *in silico* tools (PROVEAN, SIFT, PolyPhen-2 and Mutation Assessor).

<sup>b</sup> $P < 0.001$  for comparison with gnomAD or ABraOM.

**Table 3. Clinical Phenotypes of Probands and Their Child Family Members With Heterozygous *IHH* Mutations**

Patient ID	<i>IHH</i> Mutations	Sex	Birth Length SDS	Age (y)	Bone Age (y)	Height SDS	SH:H SDS	Hand Radiographic Findings
Brazilian children								
AIII.2	p.Glu58Lys	M	-2.1	5.6	5.0	-3.1	0.6	Cone-shaped epiphyses of middle phalanx of fifth finger and of distal phalanx of thumb
AIII.3	p.Glu58Lys	M	-0.8	1.5	NA	-2.2	NA	NA
AIII.4	p.Glu58Lys	M	-2.7	3.4	2.7	-2.8	3.4	Cone-shaped epiphyses of middle phalanx of second and fifth fingers and of distal phalanx of thumb
AIII.6	p.Glu58Lys	M	-1.6	8.9	9.4	-1.5	2.8	No abnormal findings
AIII.8	p.Glu58Lys	F	-1.9	3.5	2.7	-1.9	2.7	Shortening of middle phalanx of fifth finger
AIII.9	p.Glu58Lys	M	-0.1	14.6	16.5	-0.8 <sup>a</sup>	4.4	No abnormal findings (adult bone age)
AIII.10	p.Glu58Lys	F	-0.7	7.4	6.8	-1.7	3.6	Cone-shaped epiphysis of middle phalanx of fifth finger
BIII.1	p.Arg149His	F	-2.4	8.0	6.8	-2.6	3.4	Shortening of middle phalanx of second and fifth fingers with cone-shaped epiphyses
CII.2	p.Gly380Val	F	-0.2	9.2	7.9	-2.8	1.7	No abnormal findings
CIII.1	p.Gly380Val	M	-1.1	1.5	NA	-2.5	0.3	No abnormal findings
DII.2	p.Val178Met	F	-2.3	9.4	5.0	-4.3	3.1	Shortening of middle phalanx of fifth finger
EII.1	p.Val178Leu	M	-1.0	7.1	5.8	-2.8	2.2	No abnormal findings
Spanish individuals								
FI.1	p.Cys107Alafs*5	F	NA	13	13	-2.6	1.8	Braquimetacarpal with shortening of middle phalanx of second and fifth fingers
GII.1	p.Trp177Cys	F	-2.9	16	NA	-2.9	NA	Severe shortening of middle phalanx of second and fifth fingers with cone-shaped epiphyses
HII.1	p.Arg267Thrfs*15	F	NA	7	6.0	-3.5	1.9	Severe shortening of middle phalanx of second and fifth fingers
II.2	p.Val317Met	F	NA	Adult	NA	-1.8	NA	Severe shortening of middle phalanx of fifth finger and slight shortening of middle phalanx of second finger
JII.1	p.Phe401Ser	M	-0.4	7.8	4.0	-4.0	0.3	No abnormal findings

Birth length and height SDS are according to population curves.

Abbreviations: F, female; M, male; NA, data not available.

<sup>a</sup>During follow-up, the patient had a growth velocity of 0.6 cm/y, and his height SDS for adult age is -1.9.

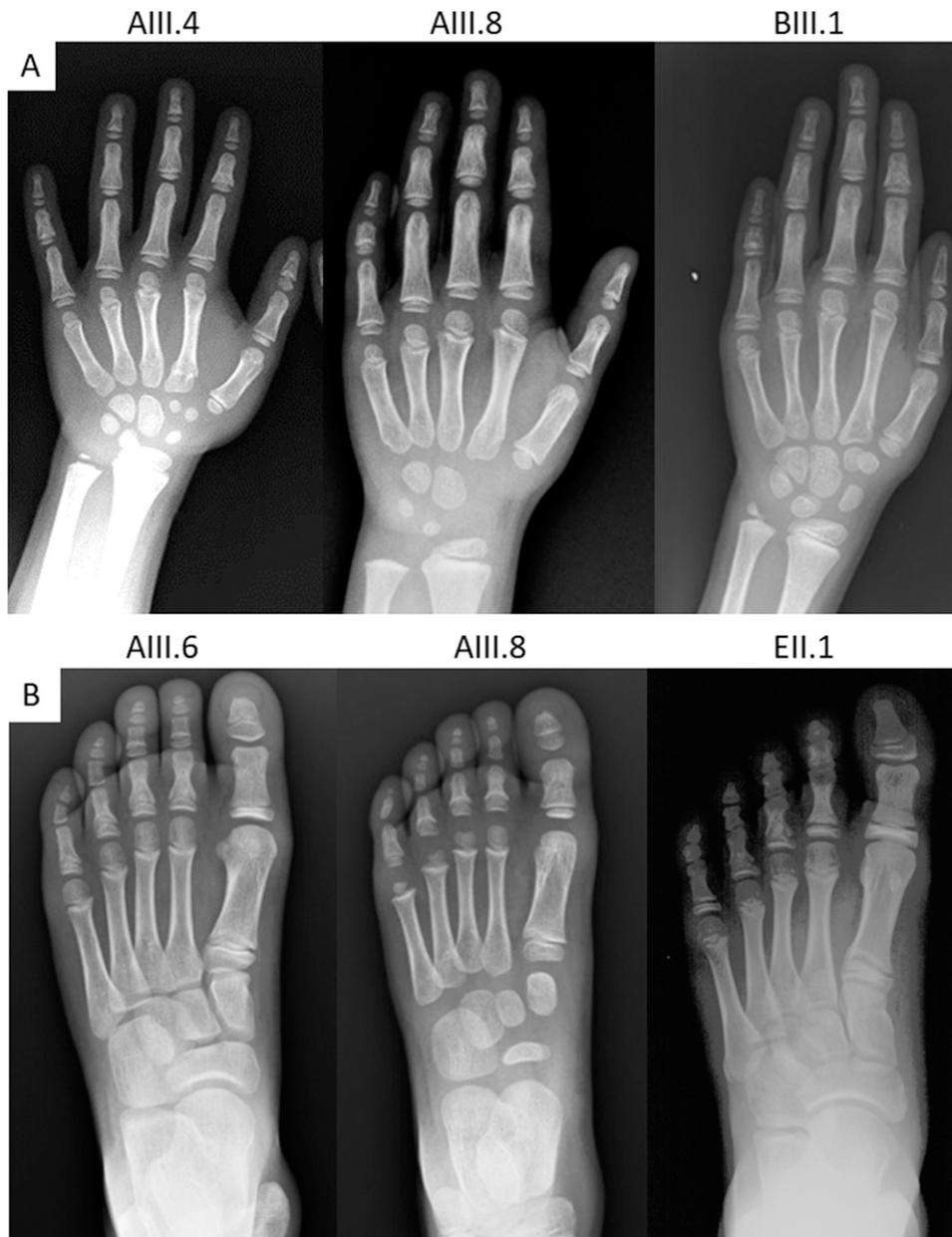
implicated in the etiology of several cases of skeletal dysplasia, a condition frequently presented with marked growth impairment (6, 16). Furthermore, a limited number of genes implicated in severe skeletal dysplasia [*SHOX* (17), *NPR2* (18), *ACAN* (8), *FBN1* (10), *NPPC* (11)] have been associated with nonsyndromic short stature, which is commonly classified as ISS in clinical practice.

In the current study, we identified heterozygous *IHH* mutations in 5 of 147 children initially classified as ISS. Additionally, another 5 heterozygous *IHH* mutations were identified among short stature patients with subtle signs of a skeletal dysplasia (3/100) or with mild brachydactyly (2/60). According to ACMG-AMP criteria (13), the identified *IHH* variants were classified as pathogenic or likely pathogenic (Table 1).

Along with *IHH*, Hedgehog (Hh) family proteins include other two Hh homologs with high level of sequence conservation: Sonic Hh (SHH) and Desert Hh, essential for the nervous system and testis development, respectively (19). Hh proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum as a precursor that undergoes an autocatalytic process to yield the N-terminal domain, which has biological signaling activities (20). Hh action is mediated through Patched and Smoothed receptors

and is positively regulated by cell adhesion molecule-related, downregulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO in a calcium-dependent binding mode (19). *IHH* is expressed in the prehypertrophic chondrocytes of cartilage and coordinates proliferation and differentiation of chondrocytes during endochondral bone development (21). Homozygous *IHH* mutations cause acrocapitofemoral dysplasia (MIM 607778), a disorder characterized by severe disproportionate short stature with cone-shaped epiphyses in hands and hips (22). In addition, heterozygous mutations in *IHH* cause BDA1 (MIM 112500). BDA1 is characterized by a marked shortening of the middle phalanges, which are frequently rudimentary or fused with the terminal phalanges. The proximal phalanges of the thumbs and big toes are also short (12). Interestingly, short stature was not consistently demonstrated in patients with BDA1 (12, 23).

The variants identified in the current study were located throughout the *IHH*, including two frameshift mutations and eight missense mutations. These findings are in contrast with previous variants associated with BDA1, which were all missense and restricted to the central region of the N-terminal active fragment of *IHH*



**Figure 2.** Hand and feet radiographs of children carrying heterozygous *IHH* mutations. (A) Hand radiographs show varying degrees of shortening of the middle phalanx of the second and fifth fingers with cone-shaped epiphyses. (B) Foot radiographs show shortening of distal phalanx of the hallux (individuals AIII.6 and AIII.8) and cone-shaped epiphyses of proximal phalanges.

(24) (Supplemental Fig. 9). Similar to our findings, variants in *SHH* associated to holoprosencephaly (missense, nonsense, or frameshift) are located throughout the gene (25). In addition, after single–amino acid code alignment

of *IHH* and *SHH*, we observed that two of the *IHH* mutations identified in our patients (p.Glu58Lys and p.Arg149His) are located in the identical residues of pathogenic *SHH* mutations (p.Glu53Lys and

**Table 4.** Response to rhGH Therapy in Patients With Heterozygous *IHH* Variants

Patient ID	<i>IHH</i> Mutations	Sex	Age at Initiation of rhGH (y)	Height SDS Before rhGH	Height SDS at 1 y of rhGH	Height Velocity after 1 y of rhGH (cm/y)	Duration of rhGH Therapy (y)	Last Available Height SDS	Total Height SDS Change
AIII.2	p.Glu58Lys	M	6.6	−3.0	−2.6	8.0	1.0	−2.6	0.4
AIII.6	p.Glu58Lys	M	10	−1.5	−1.0	8.0	1.0	−1.0	0.5
BIII.1	p.Arg149His	F	8	−2.6	−1.9	8.1	3.0	−1.8	0.8
EII.1	p.Val178Leu	M	7.1	−2.8	−2.0	10.8	4.7	−0.4	2.4
CII.2	p.Gly380Val	F	10.4	−2.6	−1.7	11.2	4.0	−1.5	1.1

Abbreviations: F, female; M, male.



p.Arg144Pro, respectively) (26). The results of the structural analyses and molecular mechanics simulations experiments based on the *IHH* molecular structure showed that all mutations located at N-terminal domain could affect the structure and, therefore, the biological function of the molecule. The presence of these mutations determines a smaller total mean potential energy that is associated with a more stable molecule, affecting the calcium and zinc cofactor-binding energy (Supplemental Table 3). A greater calcium-binding energies observed in four mutated *IHH* molecules (p.Glu58Lys, p.Val178Leu, p.Val178Met, and p.Trp177Cys) could affect the interaction to binding partners CDO and brother of CDO, a mechanism already described to *IHH* mutations associated to BDA1 (19).

It is a challenge to determine the functional impact of variants located in the C-terminal domain of Hh proteins. Nevertheless, one study found no difference in phenotype severity between individuals with holoprosencephaly caused by *SHH* mutations located in the N- or C-terminal domains (27). It is postulated that C-terminal variants could impair the preprotein maturation and autocleavage process (26). Further studies are necessary to elucidate molecular mechanisms of *IHH* variants responsible for nonsyndromic short stature.

We provide several lines of genetic evidence that the identified *IHH* variants are associated with short stature with nonspecific skeletal abnormalities (15). First, at each case level, we demonstrated in several families a segregation with growth impairment phenotype in a dominant inheritance pattern (Fig. 1). Additionally, a *de novo* variant (both paternity and maternity confirmed) was identified in a patient with short stature and normal stature parents (Fig. 1E). Second, we provide statistical evidence that rare *IHH* variants are enriched in the two analyzed cohorts of short-stature patients in comparison with public databases that involve a large number of individuals not selected by stature (Table 2; Supplemental Fig. 6).

Patients described in the current study typically manifest mild disproportional short stature. It seems that disproportionality has become more pronounced over the years during childhood. Four probands were born SGA regarding birth length. Intrauterine growth impairment with normal birth weight, especially in children with familial short stature, may suggest defects in genes that play a role in bone elongation. There is a variable phenotype considering the severity of short stature and radiological findings, even among individuals within the same family. The most recurrent radiological finding observed in our patients was varying degrees of shortening of the middle phalanx of the fifth finger, a defining feature of brachymesophalangia V (BMP-V) (28). BMP-V is the most common skeletal anomaly of the hand and

can be observed alone (clinically known as brachydactyly type A3) or in association to other skeletal abnormalities and developmental syndromes. Epiphyses of the fifth finger may be associated with a susceptibility to a chondrogenesis disorder because they are among the last to be ossified in the hand. BMP-V was observed in 64.3% (9/14) hand radiographs from individuals heterozygous from *IHH* variants in our cohort, whereas the frequency of BMP-V observed in a population study was 12.1% (165/1360;  $P < 0.001$ ) (28).

The response to rhGH therapy could be assessed in five patients heterozygous for *IHH* variants (Table 4). We considered the short-term response to rhGH therapy presented by this small group of children to be good. The improvement in height SDS at 1 year of rhGH therapy was similar to or better than that previously reported in two larger studies that evaluated responsiveness to rhGH in children with ISS (0.60 SDS and 0.49 SDS, respectively) (29, 30). A different study developed criteria based on height velocity targets for first-year responses in ISS children. Those researchers proposed that height velocity below the mean  $-1$  SD on their plots should be considered a “poor” response. None of our patients had a first-year height velocity below the mean  $-1$  standard deviation; two were plotted above the mean and can be considered as good (31).

In conclusion, our data demonstrate the association of rare pathogenic variants in *IHH* with short stature with nonspecific skeletal abnormalities (MIM 616255). Given the subtle and low specific clinical and radiological findings observed in our patients, only a broad molecular study allowed this association. Thus, we have expanded the phenotype associated with heterozygous *IHH* mutations and established a frequent cause of growth disorder, with a preliminary good response to rhGH.

## Acknowledgments

**Financial Support:** This work was supported by Grants 2013/03236-5 (to A.A.L.J.) and 2013/02162-8 (Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala) from the São Paulo Research Foundation; Grants 301871/2016-7 and 459845/2014-4 (to A.A.L.J.) from the National Council for Scientific and Technological Development; Grants SAF2012-30871 and SAF2015-66831-R from El Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (to K.E.H.); and an award from the Foundation of the Spanish Society of Pediatric Endocrinology (to L.S.-M. and K.E.H.).

**Correspondence and Reprint Requests:** Alexander A. L. Jorge, MD, PhD, Faculdade de Medicina da USP (LIM-25), Av. Dr. Arnaldo, 455 5° andar sala 5340, CEP 01246-903 Sao Paulo, Brazil. E-mail: alexj@usp.br.

**Disclosure Summary:** The authors have nothing to disclose.

## References

1. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;**99**(9):3080–3092.
2. Wood AR, Esko T, Yang J, Vedantam S, Pers TH, Gustafsson S, Chu AY, Estrada K, Luan J, Kutalik Z, Amin N, Buchkovich ML, Croteau-Chonka DC, Day FR, Duan Y, Fall T, Fehrmann R, Ferreira T, Jackson AU, Karjalainen J, Lo KS, Locke AE, Mägi R, Mihailov E, Porcu E, Randall JC, Scherag A, Vinkhuyzen AA, Westra HJ, Winkler TW, Workalemahu T, Zhao JH, Absher D, Albrecht E, Anderson D, Baron J, Beekman M, Demirkan A, Ehret GB, Feenstra B, Feitosa MF, Fischer K, Fraser RM, Goel A, Gong J, Justice AE, Kanoni S, Kleber ME, Kristiansson K, Lim U, Lotay V, Lui JC, Mangino M, Mateo Leach I, Medina-Gomez C, Nalls MA, Nyholt DR, Palmer CD, Pasko D, Pechlivanis S, Prokopenko I, Ried JS, Ripke S, Shungin D, Stancáková A, Strawbridge RJ, Sung YJ, Tanaka T, Teumer A, Trompet S, van der Laan SW, van Setten J, Van Vliet-Ostaptchouk JV, Wang Z, Yengo L, Zhang W, Afzal U, Arnlöv J, Arscott GM, Bandinelli S, Barrett A, Bellis C, Bennett AJ, Berne C, Blüher M, Bolton JL, Böttcher Y, Boyd HA, Bruinenberg M, Buckley BM, Buyske S, Caspersen IH, Chines PA, Clarke R, Claudi-Boehm S, Cooper M, Daw EW, De Jong PS, Deelen J, Delgado G, Denny JC, Dhonukshe-Rutten R, Dimitriou M, Doney AS, Dörr M, Eklund N, Eury E, Folkersen L, Garcia ME, Geller F, Giedraitis V, Go AS, Grallert H, Grammer TB, Gräßler J, Grönberg H, de Groot LC, Groves CJ, Haessler J, Hall P, Haller T, Hallmans G, Hannemann A, Hartman CA, Hassinen M, Hayward C, Heard-Costa NL, Helmer Q, Hemani G, Henders AK, Hillege HL, Hlatky MA, Hoffmann W, Hoffmann P, Holmen O, Houwing-Duistermaat JJ, Illig T, Isaacs A, James AL, Jeff J, Johansen B, Johansson Å, Jolley J, Juliusdottir T, Junttila J, Kho AN, Kinnunen L, Klopp N, Kocher T, Kratzer W, Lichtner P, Lind L, Lindström J, Lobbens S, Lorentzon M, Lu Y, Lyssenko V, Magnusson PK, Mahajan A, Maillard M, McArdle WL, McKenzie CA, McLachlan S, McLaren PJ, Menni C, Mergler S, Milani L, Moayeri A, Monda KL, Morken MA, Müller G, Müller-Nurasyid M, Musk AW, Narisu N, Nauck M, Nolte IM, Nöthen MM, Oozageer L, Pilz S, Rayner NW, Renstrom F, Robertson NR, Rose LM, Roussel R, Sanna S, Scharnagl H, Scholtens S, Schumacher FR, Schunkert H, Scott RA, Sehmi J, Seufferlein T, Shi J, Silventoinen K, Smit JH, Smith AV, Smolonska J, Stanton AV, Stirrups K, Stott DJ, Stringham HM, Sundström J, Swertz MA, Sväven AC, Tayo BO, Thorleifsson G, Tyrer JP, van Dijk S, van Schoor NM, van der Velde N, van Heemst D, van Oort FV, Vermeulen SH, Verweij N, Vonk JM, Waite LL, Waldenberger M, Wennauer R, Wilkens LR, Willenborg C, Wilsaard T, Wojczynski MK, Wong A, Wright AF, Zhang Q, Arveiler D, Bakker SJ, Beilby J, Bergman RN, Bergmann S, Biffar R, Blangero J, Boomsma DI, Bornstein SR, Bovet P, Brambilla P, Brown MJ, Campbell H, Caulfield MJ, Chakravarti A, Collins R, Collins FS, Crawford DC, Cupples LA, Danesh J, de Faire U, den Ruijter HM, Erbel R, Erdmann J, Eriksson JG, Farrall M, Ferrannini E, Ferrières J, Ford I, Forouhi NG, Forrester T, Gansevoort RT, Gejman PV, Geiger C, Golay A, Gottesman O, Gudnason V, Gyllensten U, Haas DW, Hall AS, Harris TB, Hattersley AT, Heath AC, Hengstenberg C, Hicks AA, Hindorf LA, Hingorani AD, Hofman A, Hovingh GK, Humphries SE, Hunt SC, Hyponen E, Jacobs KB, Jarvelin MR, Jousilahti P, Jula AM, Kaprio J, Kastelein JJ, Kayser M, Kee F, Keinanen-Kiukkaanniemi SM, Kiemeny LA, Kooner JS, Kooperberg C, Koskinen S, Kovacs P, Kraja AT, Kumari M, Kuusisto J, Lakka TA, Langenberg C, Le Marchand L, Lehtimäki T, Lupoli S, Madden PA, Männistö S, Manunta P, Marette A, Matise TC, McKnight B, Meitinger T, Moll FL, Montgomery GW, Morris AD, Morris AP, Murray JC, Nelis M, Ohlsson C, Oldehinkel AJ, Ong KK, Ouwehand WH, Pasterkamp G, Peters A, Pramstaller PP, Price JF, Qi L, Raitakari OT, Rankinen T, Rao DC, Rice TK, Ritchie M, Rudan I, Salomaa V, Samani NJ, Saramies J, Sarzynski MA, Schwarz PE, Sebert S, Sever P, Shuldiner AR, Sinisalo J, Steinthorsdottir V, Stolk RP, Tardif JC, Tönjes A, Tremblay A, Tremoli E, Virtamo J, Vohl MC, Amouyel P, Asselbergs FW, Assimes TL, Bochud M, Boehm BO, Boerwinkle E, Bottinger EP, Bouchard C, Cauchi S, Chambers JC, Chanock SJ, Cooper RS, de Bakker PI, Dedoussis G, Ferrucci L, Franks PW, Froguel P, Groop LC, Haiman CA, Hamsten A, Hayes MG, Hui J, Hunter DJ, Hveem K, Jukema JW, Kaplan RC, Kivimäki M, Kuh D, Laakso M, Liu Y, Martin NG, März W, Melbye M, Moebus S, Munroe PB, Njølstad I, Oostra BA, Palmer CN, Pedersen NL, Perola M, Pérusse L, Peters U, Powell JE, Power C, Quertermous T, Rauramaa R, Reinmaa E, Ridker PM, Rivadeneira F, Rotter JI, Saaristo TE, Saleheen D, Schlessinger D, Slagboom PE, Snieder H, Spector TD, Strauch K, Stumvoll M, Tuomilehto J, Uusitupa M, van der Harst P, Völzke H, Walker M, Wareham NJ, Watkins H, Wichmann HE, Wilson JF, Zanan P, Deloukas P, Heid IM, Lindgren CM, Mohlke KL, Speliotes EK, Thorsteinsdottir U, Barroso I, Fox CS, North KE, Strachan DP, Beckmann JS, Berndt SI, Boehnke M, Borecki IB, McCarthy MI, Metspalu A, Stefansson K, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Franke L, Willer CJ, Price AL, Lettre G, Loos RJ, Weedon MN, Ingelsson E, O'Connell JR, Abecasis GR, Chasman DI, Goddard ME, Visscher PM, Hirschhorn JN, Frayling TMElectronic Medical Records and Genomics (eMERGE) ConsortiumMIGEN ConsortiumPAGEGE ConsortiumLifeLines Cohort Study. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet.* 2014;**46**(11):1173–1186.
3. Zoledziewska M, Sidore C, Chiang CWK, Sanna S, Mulas A, Steri M, Busonero F, Marcus JH, Marongiu M, Maschio A, Ortega Del Vecchio D, Floris M, Meloni A, Delitala A, Concas MP, Murgia F, Biino G, Vaccargiu S, Nagaraja R, Lohmueller KE, Timpson NJ, Soranzo N, Tachmazidou I, Dedoussis G, Zeggini E, Uzzau S, Jones C, Lyons R, Angius A, Abecasis GR, Novembre J, Schlessinger D, Cucca FUK10K consortiumUnderstanding Society Scientific Group. Height-reducing variants and selection for short stature in Sardinia. *Nat Genet.* 2015;**47**(11):1352–1356.
4. Scalco RC, Hwa V, Domené HM, Jasper HG, Belgorosky A, Marino R, Pereira AM, Tonelli CA, Wit JM, Rosenfeld RG, Jorge AA. *STAT5B* mutations in heterozygous state have negative impact on height: another clue in human stature heritability. *Eur J Endocrinol.* 2015;**173**(3):291–296.
5. Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, Lo KS, Wood AR, Kjaer TR, Fine RS, Lu Y, Schurmann C, Highland HM, Rieger S, Thorleifsson G, Justice AE, Lamparter D, Stirrups KE, Turcot V, Young KL, Winkler TW, Esko T, Karaderi T, Locke AE, Masca NG, Ng MC, Mudgal P, Rivas MA, Vedantam S, Mahajan A, Guo X, Abecasis G, Aben KK, Adair LS, Alam DS, Albrecht E, Allin KH, Allison M, Amouyel P, Appel EV, Arveiler D, Asselbergs FW, Auer PL, Balkau B, Banas B, Bang LE, Benn M, Bergmann S, Bielak LF, Blüher M, Boeing H, Boerwinkle E, Böger CA, Bonnycastle LL, Bork-Jensen J, Bots ML, Bottinger EP, Bowden DW, Brandslund I, Breen G, Brilliant MH, Broer L, Burt AA, Butterworth AS, Carey DJ, Caulfield MJ, Chambers JC, Chasman DI, Chen YI, Chowdhury R, Christensen C, Chu AY, Cocca M, Collins FS, Cook JP, Corley J, Galbany JC, Cox AJ, Cuellar-Partida G, Danesh J, Davies G, de Bakker PI, de Borst GJ, de Denus S, de Groot MC, de Mutsert R, Deary IJ, Dedoussis G, Demerath EW, den Hollander AI, Dennis JG, Di Angelantonio E, Drenos F, Du M, Dunning AM, Easton DF, Ebeling T, Edwards TL, Ellinor PT, Elliott P, Evangelou E, Farmaki AE, Faul JD, Feitosa MF, Feng S, Ferrannini E, Ferrario MM, Ferrières J, Florez JC, Ford I, Fornage M, Franks PW, Frikke-Schmidt R, Galesloot TE, Gan W, Gandin I, Gasparini P, Giedraitis V, Giri A, Grotto G, Gordon SD, Gordon-Larsen P, Gorski M, Grarup N, Grove ML, Gudnason V, Gustafsson S, Hansen T, Harris KM, Harris TB, Hattersley AT, Hayward C, He L, Heid IM, Heikkilä K, Helgeland Ø, Hernesniemi J, Hewitt AW, Hocking LJ, Hollensted M, Holmen OL, Hovingh GK, Howson JM, Hoyng CB, Huang PL, Hveem K, Ikram MA, Ingelsson E, Jackson AU, Jansson JH, Jarvik GP, Jensen GB, Jhun MA, Jia Y, Jiang X, Johansson S, Jørgensen ME, Jørgensen T, Jousilahti P, Jukema JW, Kahali B, Kahn RS, Kähönen

- M, Kamstrup PR, Kanoni S, Kaprio J, Karaleftheri M, Kardias SL, Karpe F, Kee F, Keeman R, Kiemeny LA, Kitajima H, Kluijvers KB, Kocher T, Komulainen P, Kontto J, Kooner JS, Kooperberg C, Kovacs P, Kriebel J, Kuivaniemi H, Küry S, Kuusisto J, La Bianca M, Laakso M, Lakka TA, Lange EM, Lange LA, Langefeld CD, Langenberg C, Larson EB, Lee IT, Lehtimäki T, Lewis CE, Li H, Li J, Li-Gao R, Lin H, Lin LA, Lin X, Lind L, Lindström J, Linneberg A, Liu Y, Liu Y, Lophatananon A, Luan J, Lubitz SA, Lyytikäinen LP, Mackey DA, Madden PA, Manning AK, Männistö S, Marenne G, Marten J, Martin NG, Mazul AL, Meidtner K, Metspalu A, Mitchell P, Mohlke KL, Mook-Kanamori DO, Morgan A, Morris AD, Morris AP, Müller-Nurasyid M, Munroe PB, Nalls MA, Nauck M, Nelson CP, Neville M, Nielsen SF, Nikus K, Njølstad PR, Nordestgaard BG, Ntalla I, O'Connell JR, Oksa H, Loochuis LM, Ophoff RA, Owen KR, Packard CJ, Padmanabhan S, Palmer CN, Pasterkamp G, Patel AP, Pattie A, Pedersen O, Peissig PL, Peloso GM, Pennell CE, Perola M, Perry JA, Perry JR, Person TN, Pirie A, Polasek O, Posthuma D, Raitakari OT, Rasheed A, Rauramaa R, Reilly DF, Reiner AP, Renström F, Ridker PM, Rioux JD, Robertson N, Robino A, Rolandsson O, Rudan I, Ruth KS, Saleheen D, Salomaa V, Samani NJ, Sandow K, Sapkota Y, Sattar N, Schmidt MK, Schreiner PJ, Schulze MB, Scott RA, Segura-Lepe MP, Shah S, Sim X, Sivapalaratnam S, Small KS, Smith AV, Smith JA, Southam L, Spector TD, Speliotes EK, Starr JM, Steinhilber D, Stringham JM, Stumvoll M, Surendran P, 't Hart LM, Tansey KE, Tardif JC, Taylor KD, Teumer A, Thompson DJ, Thorsteinsdottir U, Thuesen BH, Tönjes A, Tromp G, Trompet S, Tsafantakis E, Tuomilehto J, Tybjaerg-Hansen A, Tyrer JP, Uher R, Uitterlinden AG, Ulivi S, van der Laan SW, Van Der Leij AR, van Duijn CM, van Schoor NM, van Setten J, Varbo A, Varga TV, Varma R, Edwards DR, Vermeulen SH, Vestergaard H, Vitart V, Vogt TF, Vozzi D, Walker M, Wang F, Wang CA, Wang S, Wang Y, Wareham NJ, Warren HR, Wessel J, Willems SM, Wilson JG, Witte DR, Woods MO, Wu Y, Yaghoobkar H, Yao J, Yao P, Yerges-Armstrong LM, Young R, Zeggini E, Zhan X, Zhang W, Zhao JH, Zhao W, Zhao W, Zheng H, Zhou W, Rotter JI, Boehnke M, Kathiresan S, McCarthy MI, Willer CJ, Stefansson K, Borecki IB, Liu DJ, North KE, Heard-Costa NL, Pers TH, Lindgren CM, Oxdig C, Kutalik Z, Rivadeneira F, Loos RJ, Frayling TM, Hirschhorn JN, Deloukas P, Lettre GEPIC-InterAct ConsortiumCHD Exome+ ConsortiumExomeBP ConsortiumT2D-Genes ConsortiumGoT2D Genes ConsortiumGlobal Lipids Genetics ConsortiumReproGen ConsortiumMAGIC Investigators. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature*. 2017;542(7640):186–190.
6. Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M, van Duyvenvoorde HA, Ruivenkamp CA, Kant SG. Mechanisms in Endocrinology: Novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(4):R145–R173.
  7. de Bruin C, Dauber A. Insights from exome sequencing for endocrine disorders. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(8):455–464.
  8. Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, Crocker M, Douglas J, Dunbar N, Fairchild J, Funari MF, Heath KE, Jorge AA, Kurtzman T, LaFranchi S, Lalani S, Lebl J, Lin Y, Los E, Newbern D, Nowak C, Olson M, Popovic J, Pruhová Š, Elblova L, Quintos JB, Segerlund E, Sentchordi L, Shinawi M, Stattin EL, Swartz J, Angel AG, Cuéllar SD, Hosono H, Sanchez-Lara PA, Hwa V, Baron J, Nilsson O, Dauber A. Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):460–469.
  9. Nilsson O, Guo MH, Dunbar N, Popovic J, Flynn D, Jacobsen C, Lui JC, Hirschhorn JN, Baron J, Dauber A. Short stature, accelerated bone maturation, and early growth cessation due to heterozygous aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):E1510–E1518.
  10. de Bruin C, Finlayson C, Funari MFA, Vasques GA, Lucheze Freire B, Lerario AM, Andrew M, Hwa V, Dauber A, Jorge AAL. Two patients with severe short stature due to a FBN1 Mutation (p.Ala1728Val) with a mild form of acromicric dysplasia. *Horm Res Paediatr*. 2016;86(5):342–348.
  11. Hisado-Oliva A, Ruzafa-Martin A, Sentchordi L, Funari MFA, Bezanilla-López C, Alonso-Bernáldez M, Barraza-García J, Rodríguez-Zabala M, Lerario AM, Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Campos-Barros A, Jorge AAL, Heath KE. Mutations in C-natriuretic peptide (NPPC): a novel cause of autosomal dominant short stature [published online ahead of print June 29, 2017]. *Genet Med*.
  12. Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, Yang X, Guo S, Feng G, He L. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet*. 2001;28(4):386–388.
  13. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–424.
  14. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of cosegregation in the pathogenicity classification of genomic variants. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1077–1081.
  15. Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH, Ceyhan-Birsoy O, DiStefano M, Dwight SS, Goldstein J, Ghosh R, Seifert BA, Sneddon TP, Wright MW, Milko LV, Cherry JM, Giovanni MA, Murray MF, O'Daniel JM, Ramos EM, Santani AB, Scott AF, Plon SE, Rehm HL, Martin CL, Berg JS. Evaluating the clinical validity of gene-disease associations: an evidence-based framework developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet*. 2017;100(6):895–906.
  16. Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Sangiorgi L, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Superti-Furga A, Warman M, Unger S. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(12):2869–2892.
  17. Marchini A, Ogata T, Rappold GA. A Track Record on SHOX: From Basic Research to Complex Models and Therapy. *Endocr Rev*. 2016;37(4):417–448.
  18. Vasques GA, Arnhold IJP, Jorge AAL. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(4):222–229.
  19. Kavran JM, Ward MD, Oladosu OO, Mulepati S, Leahy DJ. All mammalian Hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *J Biol Chem*. 2010;285(32):24584–24590.
  20. Pereira J, Johnson WE, O'Brien SJ, Jarvis ED, Zhang G, Gilbert MT, Vasconcelos V, Antunes A. Evolutionary genomics and adaptive evolution of the Hedgehog gene family (Shh, Ihh and Dhh) in vertebrates. *PLoS One*. 2014;9(12):e74132.
  21. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 2001;128(22):4523–4534.
  22. Hellemans J, Coucke PJ, Giedion A, De Paepe A, Kramer P, Beemer F, Mortier GR. Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. *Am J Hum Genet*. 2003;72(4):1040–1046.
  23. Liu M, Wang X, Cai Z, Tang Z, Cao K, Liang B, Ren X, Liu JY, Wang QK. A novel heterozygous mutation in the Indian hedgehog gene (IHH) is associated with brachydactyly type A1 in a Chinese family. *J Hum Genet*. 2006;51(8):727–731.
  24. Byrnes AM, Racacho L, Grimsey A, Hudgins L, Kwan AC, Sangalli M, Kidd A, Yaron Y, Lau YL, Nikkel SM, Bulman DE. Brachydactyly A-1 mutations restricted to the central region of the N-terminal active fragment of Indian Hedgehog. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(9):1112–1120.

25. Wallis D, Muenke M. Mutations in holoprosencephaly. *Hum Mutat.* 2000;**16**(2):99–108.
26. Roessler E, El-Jaick KB, Dubourg C, Vélez JI, Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Lacbawan F, Zhou N, Ouspenskaia M, Paulussen A, Smeets HJ, Hehr U, Bendavid C, Bale S, Odent S, David V, Muenke M. The mutational spectrum of holoprosencephaly-associated changes within the SHH gene in humans predicts loss-of-function through either key structural alterations of the ligand or its altered synthesis. *Hum Mutat.* 2009;**30**(10):E921–E935.
27. Solomon BD, Bear KA, Wyllie A, Keaton AA, Dubourg C, David V, Mercier S, Odent S, Hehr U, Paulussen A, Clegg NJ, Delgado MR, Bale SJ, Lacbawan F, Ardinger HH, Aylsworth AS, Bhengu NL, Braddock S, Brookhyser K, Burton B, Gaspar H, Grix A, Horovitz D, Kanetzke E, Kayserili H, Lev D, Nikkel SM, Norton M, Roberts R, Saal H, Schaefer GB, Schneider A, Smith EK, Sowry E, Spence MA, Shalev SA, Steiner CE, Thompson EM, Winder TL, Balog JZ, Hadley DW, Zhou N, Pineda-Alvarez DE, Roessler E, Muenke M. Genotypic and phenotypic analysis of 396 individuals with mutations in Sonic Hedgehog. *J Med Genet.* 2012;**49**(7):473–479.
28. Williams KD, Nahhas RW, Cottom CR, Lawrence S, Subedi J, Jha B, Czerwinski SA, Blangero J, Williams-Blangero S, Towne B. Evaluation of qualitative methods for phenotyping brachymesophalangia-V from radiographs of children. *Am J Hum Biol.* 2012;**24**(1):68–73.
29. Finkelstein BS, Imperiale TF, Speroff T, Marrero U, Radcliffe DJ, Cuttler L. Effect of growth hormone therapy on height in children with idiopathic short stature: a meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2002;**156**(3):230–240.
30. Lee PA, Säwendahl L, Oliver I, Tauber M, Blankenstein O, Ross J, Snajderova M, Rakov V, Pedersen BT, Christesen HT. Comparison of response to 2-years' growth hormone treatment in children with isolated growth hormone deficiency, born small for gestational age, idiopathic short stature, or multiple pituitary hormone deficiency: combined results from two large observational studies. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2012;**2012**(1):22.
31. Bakker B, Frane J, Anhalt H, Lippe B, Rosenfeld RG. Height velocity targets from the national cooperative growth study for first-year growth hormone responses in short children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;**93**(2):352–357.

## Discusión

El presente trabajo revela la importante contribución de genes implicados en displasias esqueléticas en la etiopatogenia de la talla baja en pacientes que presentan anomalías esqueléticas leves, destacando la pertinencia de explorar los aspectos esqueléticos en los pacientes con talla baja de etiología desconocida. Asimismo, aporta descripciones novedosas que amplían el espectro fenotípico y genotípico de entidades nuevas y conocidas, como son las relacionadas con variantes patogénicas en heterocigosis en *ACAN* y *IHH*, profundizando así en el papel de estos dos genes en la regulación del crecimiento.

La investigación se centra en la caracterización clínica, radiológica y molecular de pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves sin diagnóstico etiopatogénico, como parte de un proyecto más amplio de displasias esqueléticas. Conocer las características de las displasias esqueléticas y la capacidad diagnóstica de la secuenciación masiva inspiró la búsqueda de formas leves de displasia entre los pacientes con talla baja con expresividad fenotípica leve o inespecífica.

Tras el aprendizaje de la metodología de trabajo llevada a cabo en el INGEMM (Instituto de Genética Médica y Molecular) en el diagnóstico genético de las displasias esqueléticas se diseñó el proyecto central de la tesis. De esta manera una cohorte de 108 pacientes con talla baja (por debajo de -2 DE) y anomalías esqueléticas leves fueron seleccionados y siguieron la misma rutina diagnóstica que los pacientes con displasias esqueléticas. Un grupo de médicos colaboradores (endocrinólogos pediátricos y genetistas clínicos) remitieron los datos clínicos y radiológicos cumplimentaron un formulario diseñado para obtener el mayor detalle posible. Dichos formularios y radiografías fueron después revisadas y si cumplían los criterios para entrar en el estudio se procedía a la realización del panel de NGS. Con los hallazgos se volvía sobre la información clínica y en ocasiones se solicitaban tanto datos clínicos familiares como muestras de ADN de estos, con el objetivo de ahondar en la caracterización clínica y radiológica y comprobar la segregación familiar como paso previo a emitir un diagnóstico.

Como resultado, se han publicado tres trabajos en la literatura. Atendiendo a la fecha de publicación, los dos primeros trabajos (“Asociación de variantes en heterocigosis en *agrecano* con talla baja y braquidactilia: descripción de 16 probandos y revisión de la literatura” y “Descripción clínica y molecular de 16 familias con variantes en heterocigosis en *IHH*”) contienen los detalles clínicos y moleculares de series de pacientes que proceden de dos fuentes: el flujo habitual de pacientes remitidos para estudio por sospecha de displasia esquelética y en segundo lugar la cohorte antes mencionada. El tercer trabajo “Prevalencia elevada de variantes en genes asociados a displasias esqueléticas en individuos con talla baja y anomalías esqueléticas

menores” contiene los resultados de la cohorte de 108 pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves, central a la investigación de esta tesis.

El estudio demuestra que los genes implicados en displasias esqueléticas están presentes en los pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves en una proporción importante (19,4%). La caracterización clínica y radiológica de estos pacientes los diferencia de aquellos con TBI, por lo que un entrenamiento en estos dos aspectos puede conducir a sospechar determinadas entidades genéticas y aportar datos clave en la ruta diagnóstica.

Esta investigación quiere destacar la importancia del fenotipado como paso previo al estudio genético con el objeto de determinar qué pacientes pueden ser candidatos a estudio molecular. A continuación, se discutirán los resultados más relevantes.

## 1. Aspectos fenotípicos

### 1.1 Serie de pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN*

Lo más destacado de la serie de 16 pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN* es la descripción de una proporción mucho menor de pacientes con maduración esquelética adelantada que lo reportado hasta entonces por otros autores <sup>[151] [175] [176]</sup>. El 40% de probandos con variantes patogénicas de la serie presentó una maduración esquelética normal o retrasada, y sólo el 23% de la cohorte global (que incluyó variantes patogénicas y VUS) presentó una edad ósea adelantada. Este hallazgo apunta a que, si bien la maduración esquelética adelantada es un buen indicador, no es imprescindible para considerar el diagnóstico como lo han confirmado series posteriores <sup>[207] [208] [209] [210]</sup>.

En nuestra serie destaca la observación de braquidactilia en todos los probandos. Esta característica había sido recogida en alguna de las publicaciones previas, si bien con una frecuencia mucho menor <sup>[151] [176] [177]</sup>. Con respecto a otras anomalías esqueléticas destaca además la presencia de anomalías en caderas y defectos leves osteocondrales en las rodillas en un porcentaje pequeño de pacientes, rasgo no observado anteriormente, así como una proporción baja de osteoartritis y discopatía en los progenitores de los probandos.

Desde la primera descripción <sup>[151]</sup> apenas han pasado siete años y son cientos los pacientes diagnosticados mediante realización de WES y/o paneles de secuenciación masiva. El espectro fenotípico encontrado es amplio, lo que coincide con nuestro estudio. Las cohortes de partida de los estudios son diversas y heterogéneas, describiéndose variantes en heterocigosis en *ACAN* en pacientes con talla baja sindra, talla baja idiopática con diferente grado de déficit de talla, talla baja con antecedente de PEG sin recuperación, o bien, talla baja con anomalías

esqueléticas leves <sup>[177] [211] [212] [213] [214] [215] [216]</sup>, lo que apoya el cribado de esta entidad en distintas circunstancias.

## 1.2. Serie de pacientes con variantes en heterocigosis en *IHH*

El trabajo reúne las características clínicas, radiológicas y moleculares de 16 pacientes con variantes en heterocigosis en *IHH*. Se describen 15 variantes genéticas de las cuales 2 se clasifican como patogénicas, 5 como probablemente patogénicas y 8 como VUS. Lo más destacado del trabajo es la presencia de un fenotipo más leve en relación al clásico de braquidactilia A1 atribuido a *IHH* <sup>[217]</sup>. Los hallazgos clínicos más presentes en la serie fueron talla baja, acortamiento de la falange media del 5º dedo y micromelia leve, lo que coincide con la serie de pacientes brasileños y españoles publicada anteriormente en colaboración con el Dr. Alexander Jorge de la Universidad de Sao Paulo <sup>[218]</sup>. Además, nuestra serie describe pacientes con acortamiento de falanges distales, medias y proximales, así como también acortamiento de metacarpianos, epífisis en cono, clinodactilia y manos sin rasgos diferenciadores. La serie también cuenta con pacientes con talla baja sin anomalías esqueléticas y pacientes con braquidactilia, pero talla normal. De forma novedosa se describe la detección de la primera deleción completa de *IHH* en un probando y su progenitor. Ninguno presenta un fenotipo más grave que el de otros pacientes con variantes missense y nonsense.

## 1.3. Examen clínico en el probando: Desproporción corporal

El trabajo central de la tesis reúne los resultados del análisis clínico, radiológico y molecular de una cohorte de 108 pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves. La desproporción relativa a los miembros inferiores aparece como predictor clínico de encontrar un hallazgo molecular. En el análisis multivariante realizado se encuentra un elevado índice de concordancia para la ratio Ts/T (tanto en términos absolutos como en DE) así como para Ts/T >1 DE. No se encuentra sin embargo relación estadísticamente significativa con la desproporción relativa a los miembros superiores, efectuada a través de la ratio envergadura/talla.

La elevada proporción en nuestra serie de pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN* (10/21 probandos) ha podido interferir en este aspecto. Gerver y cols. <sup>[219]</sup> observan una ratio envergadura/talla elevada en una cohorte de pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN*, tanto en la infancia como en la adolescencia. Este hecho parece relevante, pues ante un paciente en el que se sospecha una displasia esquelética esperamos encontrar micromelia relativa a miembros superiores e inferiores <sup>[220]</sup>. Esta característica de los pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN* resulta, por tanto novedosa, y podría servir para distinguirlos

clínicamente de otros pacientes. El estudio de cohortes más amplias sería necesario para confirmar este rasgo.

En nuestra serie de pacientes con variantes en *ACAN* no encontramos una proporción importante de pacientes con Ts/T elevada, y no disponemos de datos de desproporción relativa a miembros superiores. Por el contrario, en la serie de pacientes con variantes en *IHH* si reportamos desproporción corporal ya que 10/12 pacientes presentaron ratio Ts/T > 1 DE y 7/11 ratio envergadura/talla < 0.96.

La medición de las proporciones corporales se demuestra útil y necesaria en la caracterización clínica de los pacientes con talla baja, y las observaciones de nuestro trabajo así lo confirman. Se trata de valores “objetivos” que pertenecen a la exploración física del paciente, a diferencia de otros como la dismorfia o las anomalías esqueléticas leves, que tienen una clara influencia del observador <sup>[20]</sup>. Las medidas más extendidas para determinar la desproporción corporal son la Ts y envergadura. El sistema de puntuación propuesto por Rappold y cols. para el cribado genético de *SHOX* establece dos valores de referencia (ratio Ts/T >0,555 y ratio envergadura/talla <0,965) para asignar desproporción a expensas de miembros en un paciente <sup>[93]</sup>. Su uso se ha generalizado en la práctica clínica, aunque existen diferencias étnicas, por sexos y por edades, y por tanto la necesidad de usar tablas de referencia adecuadas. Decidir qué tablas utilizar puede ser una decisión difícil de establecer; en nuestro trabajo utilizamos las tablas de Fredricks <sup>[220]</sup> para Ts/T y las referencias de Maastricht <sup>[221]</sup> para envergadura/talla dada su aceptación internacional.

Nuestra línea de trabajo demuestra que la desproporción corporal es un hallazgo clave en las entidades que cursan con talla baja secundaria a variantes en genes que intervienen en la condrogénesis. La medición de Ts y envergadura es sencilla y aplicable para todos los clínicos, y por tanto deben ser recogidas ante todo paciente con talla baja de etiología desconocida e interpretadas con las tablas de referencia más apropiadas. Determinar que la talla baja de un paciente es desproporcionada va más allá de la simple inspección en la mayoría de los pacientes. Puesto que tiene consecuencias en la ruta diagnóstica y permite orientar el estudio genético, debe recogerse siguiendo la metodología más adecuada.

La descripción de cohortes amplias y de distintos orígenes geográficos de los genes más recientemente descritos (*ACAN*, *IHH*, *NPPC*) permitirá definir la desproporción característica de cada una de estas entidades al igual que sucede con otras entidades como la deficiencia de *SHOX* <sup>[93]</sup>, la hipocondroplasia <sup>[124]</sup> y las variantes en heterocigosis en *NPR2* <sup>[161]</sup>.



#### 1..4. Examen clínico en los progenitores

Hemos podido demostrar que el examen clínico de los progenitores es de gran utilidad en el diagnóstico clínico de los pacientes con talla baja. En el estudio estadístico de la cohorte de 108 pacientes la presencia de anomalías esqueléticas en el padre ha sido un predictor de encontrar un hallazgo molecular. El hecho de que hayan sido los rasgos paternos y no maternos o ambos está en relación con la elevada proporción de herencia paterna de nuestra cohorte, que interpretamos como aleatoria dado el tamaño de la muestra.

Recoger de forma lo más extensa posible los hallazgos clínicos y radiológicos de los progenitores nos ha permitido ampliar los espectros fenotípicos y demostrar cosegregación familiar en multitud de casos. Esto es especialmente relevante en aquellos probandos con variantes de significado incierto; la descripción del fenotipo de progenitores afectados, e incluso de otros miembros familiares, apoya la patogenicidad de dichas variantes.

Uno de los ejemplos más representativos es una de las pacientes de la tercera publicación; se trata de una niña de 10 años con una variante patogénica en *EXT1*, que no presenta encondromas en el momento del reclutamiento. Sin embargo, su padre presentaba talla baja, micromelia y deformidad de Madelung. Gracias al estudio radiológico que se solicitó a raíz del hallazgo genético se detectaron además encondromas en varias localizaciones. La mayor expresividad en varones está ampliamente descrita en la exostosis múltiple, así como la penetrancia incompleta <sup>[222]</sup>. La aparición de encondromas en esta paciente es incierta, quedando sujeta a vigilancia al menos hasta el cierre de las epífisis ya que supone la etapa de mayor riesgo de presentación. Por lo tanto, el examen clínico del padre ha dado la clave en este caso para solicitar el estudio molecular.

Nuestro trabajo confirma, al igual que otras series, que la herencia AD es la más frecuente en pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves con hallazgos moleculares <sup>[47]</sup>. Dada la heterogeneidad clínica y la penetrancia incompleta que caracteriza a este grupo de genes, el examen clínico y/o radiológico de los padres debe ser detallado, considerando que puede haber casos de talla baja sin rasgos adicionales, otros con anomalías esqueléticas leves y otros con desproporción sin talla baja. Existen asimismo en nuestra cohorte casos aislados con variantes *de novo*; en estos casos la ausencia de rasgos esqueléticos en el examen clínico de los progenitores no aportará información adicional. Aunque estos casos son menos frecuentes siempre deben considerarse.

## 2. Importancia de la caracterización radiológica

El análisis radiológico ha demostrado ser otro de los pilares del fenotipado en el grupo de pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves. En la cohorte de 108 pacientes, la braquidactilia es el rasgo más frecuente, tanto en el grupo con hallazgos moleculares como el grupo sin ellos. A pesar de ello, como veremos a continuación, la presencia de braquidactilia podría orientar el diagnóstico de pacientes con talla baja de etiología desconocida hacia variantes en genes reguladores de la condrogénesis.

En la serie de pacientes *ACAN*, hemos podido observar como todos los pacientes presentan alguna anomalía radiológica. La braquidactilia unida a pulgar corto y/o acortamiento del primer metacarpiano es la más frecuente, ya que está presente en todos los probandos. En la serie de pacientes *IHH* ocurre algo similar; la mayoría de los probandos presenta alguna anomalía esquelética siendo el acortamiento mesofalángico del 5º dedo el hallazgo más encontrado.

Manos pequeñas, manos cortas o braquidactilia pueden ser términos conceptualmente poco precisos. Las manos pequeñas o cortas son aquellas cuya medida está por debajo de un límite considerado normal. El diagnóstico puede ser clínico, antropométrico y radiológico <sup>[223]</sup>. Los especialistas en Genética Médica utilizan este criterio cuando hay evidencia visual, sin necesidad de medir, lo cual está sujeto a controversia. Afirmar que un paciente tiene las manos pequeñas puede resultar sencillo con la simple inspección en algunos casos; pero en otros está sujeto a variabilidad inter-observador. Si nos apoyamos en la antropometría, existen tablas de referencia de normalidad para los distintos parámetros de la mano (longitud total de la mano, longitud del tercer dedo, longitud de la palma y relación longitud del dedo medio/longitud de la mano), al igual que para la mayoría de segmentos corporales <sup>[224]</sup>. La obtención de este tipo de medidas puede resultar tediosa e imprecisa y las tablas de referencia existentes corresponden a distintos grupos étnicos. Por ello, su aplicación en la práctica habitual no es frecuente. Por otro lado, hablamos de braquidactilia cuando existe acortamiento de alguna de las falanges o metacarpianos/metatarsianos. Desde el punto de vista radiológico puede resultar sencillo cuando hay acortamiento de una o varias falanges y/o metacarpianos con respecto al resto. La braquidactilia global o general (propia de las manos cortas o pequeñas) se determina generalmente con referencia a la normalidad de los atlas de maduración esquelética (Greulich y Pyle en nuestro caso) <sup>[225]</sup>.

Clásicamente la radiografía de la muñeca ha servido a los endocrinos pediatras para informar sobre la maduración esquelética y, por estimación, el potencial de crecimiento de un niño en un hueso sin patología. Sin embargo, la radiografía puede aportar mucha más

información. Un radiólogo experto en displasias esqueléticas apreciará muchos detalles y será capaz de delimitar con certeza los hallazgos <sup>[226]</sup>, aunque con cierto entrenamiento se puede valorar no sólo la maduración sino también el tamaño y morfología de falanges y metacarpianos. Basándonos en la literatura y en nuestra investigación los tres puntos a considerar son <sup>[73]</sup> <sup>[79]</sup>:

- **Maduración esquelética:** Una madurez retrasada está típicamente asociada a defectos del eje somatotropo; pero también es característica del RCCD, del hipoprecimiento secundario a patología orgánica <sup>[20]</sup> o de las displasias epifisarias <sup>[227]</sup>. La madurez adelantada suele asociarse a pubertad precoz y obesidad, a determinadas displasias esqueléticas como acrodisostosis y algunos tipos de pseudohipoparatiroidismo <sup>[228]</sup>. En los últimos años se relaciona con variantes en heterocigosis en *ACAN* como ya se ha mencionado anteriormente, aunque no de forma unánime.
- **Tamaño y forma de falanges y metacarpianos:** El acortamiento de algunas regiones orienta hacia las braquidactilias <sup>[223]</sup>, el pseudohipoparatiroidismo <sup>[228]</sup> o la DLW <sup>[85]</sup>. Las epífisis en cono son características de entidades como la acrodisostosis, la displasia epifisaria múltiple, la displasia gelefísica, el pseudohipoparatiroidismo y el síndrome tricornofalángico entre otras <sup>[77]</sup> <sup>[73]</sup> <sup>[79]</sup> <sup>[229]</sup>. También se ha descrito braquidactilia general en pacientes con variantes en *ACAN* <sup>[176]</sup>, *NPPC* <sup>[168]</sup> e *IHH* <sup>[218]</sup>.
- **Morfología radiocubital a nivel de la muñeca:** El fenotipo completo de la DLW se asocia a la deformidad de Madelung <sup>[85]</sup>. En ensanchamiento metafisario del extremo distal radiocubital debe ponernos en alerta ante posibles displasias metafisarias como los raquitismos de distinta índole <sup>[230]</sup> o la displasia metafisaria de Schmid <sup>[231]</sup>.

### 3. Fenotipos leves, heterogéneos e inespecíficos

La mayoría de los pacientes recogidos en las tres publicaciones de esta tesis se caracterizan por presentar fenotipos leves. La afectación de la talla es mayor en la serie de pacientes con variantes en *ACAN* (talla media -2.9 DE) que en la serie de pacientes con variantes en *IHH* (talla media -2 DE), si bien en ambas aparecen rangos de talla muy amplios, (entre -4.3 y -1.86 DE) y (entre -4.7 y -0.8 DE) respectivamente. Así pues, en ambas series hay pacientes con tallas bajas severas y pacientes con tallas dentro de la normalidad. La mayor afectación de la talla se repite en los padres (*ACAN*: talla media -3.77 DE vs. *IHH*: -2.54 DE), como también reflejan otros autores <sup>[176]</sup> <sup>[218]</sup>.

Por otro lado, ninguno de los pacientes presenta dolor, deformidad ni desproporción importante en el momento de la recogida de datos. La excepción a la levedad clínica la constituyen algunos de los pacientes con variantes en *ACAN* (donde la maduración esquelética

adelantada puede predecir una talla por debajo de -3 DE) y la posible aparición de complicaciones ortopédicas en pacientes con variantes en *ACAN*, *COL2A1* y *EXT1*. En dichos casos el pronóstico es incierto.

Tanto en la serie de pacientes con variantes en *ACAN* como en la de pacientes con variantes en *IHH* y en la cohorte completa de 108 pacientes se ha encontrado una enorme heterogeneidad clínica. Para la publicación de la cohorte de *ACAN* hicimos una evaluación clínica, radiológica y genética de todos los estudios en cohortes similares publicadas hasta la fecha. En todas las series se encuentra un grado muy variable de talla baja y una importante heterogeneidad clínica intrafamiliar que se confirma en descripciones posteriores <sup>[208] [232] [233]</sup>. La serie de pacientes con variantes en *IHH* llama la atención por varios dos motivos; en primer lugar, ningún paciente presenta el fenotipo clásico de la braquidactilia A1, por otro lado, encontramos un espectro de anomalías en falanges y metacarpianos que no había sido descrito hasta el momento y que harían incluso sospechar a priori otras entidades. Esta heterogeneidad, que afecta tanto a la severidad de la talla baja, la presencia de desproporción, a los hallazgos de la serie esquelética y a la diferencia de fenotipo entre probandos y progenitores coincide con la descrita en pacientes con variantes en heterocigosis en *SHOX*, *FGFR3* y *NPR2* <sup>[86] [125] [161]</sup>, así como otras series de pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN* e *IHH* <sup>[218] [234] [235]</sup>.

La inespecificidad de los hallazgos clínicos y radiológicos es otra de las características a señalar. Ninguno de los pacientes incluidos en la cohorte de 108 pacientes presentaba rasgos específicos de displasias esqueléticas conocidas después de una evaluación clínica y radiológica. En cambio, encontramos 10 variantes en *ACAN*, 7 en *IHH* y una variante en *COL2A1*, *CREBBP*, *EXT1* y *PTPN11*. Todos ellos presentaron características inespecíficas que hacían difícil su diagnóstico clínico.

## 4. Caracterización molecular

### 4.1. Ventajas del diagnóstico molecular

El diagnóstico etiológico de la talla baja trasciende distintos ámbitos. Desde el punto de vista puramente científico, está permitiendo ahondar en los mecanismos de regulación del crecimiento y buscar dianas terapéuticas. Desde el punto de vista del paciente los beneficios son numerosos ya que permite:

- Ofrecer un pronóstico cercano de la talla del paciente durante la infancia y la talla que podrá alcanzar en la vida adulta. Esta información resta incertidumbre y evita falsas expectativas así como la realización de continuas y/o nuevas pruebas complementarias.

- Elaborar un seguimiento estratégico, una hoja de ruta en cada paciente, en aras de vigilar posibles complicaciones <sup>[47] [211]</sup>, proponiendo además medidas preventivas.
- Optar a participar en ensayos clínicos de potenciales tratamientos
- Realizar consejo genético.

La utilidad del diagnóstico molecular en las distintas entidades que forman parte de esta investigación se detalla a continuación.

- a- Pacientes con variantes en *ACAN*: El cese del crecimiento precoz y concurrencia de un brote puberal escaso caracterizan esta entidad. Algunos autores preconizan el tratamiento con análogos de GnRH junto con GH con el fin de mejorar la talla final de estos pacientes <sup>[179] [208] [234] [236]</sup>. Son necesarios más estudios para confirmarlo y probablemente sean futuros ensayos clínicos aleatorizados quienes den la respuesta. Además, la posible aparición de artropatía de caderas y rodillas, así como la discopatía intervertebral de carácter precoz en pacientes afectos invita a mantener un IMC en rango normal, aconsejar actividades deportivas adecuadas de forma temprana y llevar a cabo exámenes complementarios para confirmarlas cuando aparezcan los primeros síntomas.
- b- Pacientes con variantes en *IHH*: No se han descrito hasta la fecha complicaciones ortopédicas ni de otra índole en los pacientes afectos. Por otra parte, existen publicaciones que mencionan buena respuesta al tratamiento con GH <sup>[218]</sup>, si bien se necesitan estudios de mayor envergadura para aconsejar la utilización de este fármaco para mejorar la talla final.
- c- Pacientes con variantes en *COL2A1*: El seguimiento de estos pacientes está estandarizado dado el amplio conocimiento de las colagenopatías <sup>[210]</sup>. No sólo se dirige a las complicaciones osteoarticulares, sino también a la posible afectación auditiva y visual. En caso de que el paciente esté recibiendo tratamiento con GH esta debe ser retirada <sup>[237]</sup>.
- d- Pacientes con variantes en *CREBBP*: En este caso tras descartar posibles malformaciones congénitas que hayan podido pasar desapercibidas el seguimiento se enfoca en aspectos educativos y conductuales, también basados en la experiencia <sup>[238]</sup>.
- e- Pacientes con variantes en *EXT1*: La aparición de encondromas y las complicaciones estéticas y ortopédicas derivadas de ellos centrarán el seguimiento <sup>[239]</sup>.
- f- Pacientes con variantes en *PTPN11*: En este caso los pacientes se podrán beneficiar de tratamiento con GH <sup>[240]</sup>, introducido recientemente en nuestro país. Además deberán someterse al cribado de morbilidades conocidas en relación con el síndrome de Noonan <sup>[154]</sup>.

La mayoría de los pacientes incluidos en este estudio no podrán de momento beneficiarse de tratamientos basados en la evidencia científica que mejoren su talla. No obstante, pasan a pertenecer a “grupos de pacientes con diagnóstico” y esto les da la ventaja de poder formar parte de ensayos clínicos aleatorizados con GH <sup>[47]</sup>, o con otras terapias promotoras del crecimiento. El tratamiento con GH fuera de las indicaciones aceptadas no es inhabitual como refleja la literatura <sup>[126]</sup>, aunque se necesitan estudios bien diseñados, prospectivos y a talla final para establecer recomendaciones. Es importante destacar las limitaciones de la predicción de talla final en pacientes afectados de displasia esqueléticas. Además, en el terreno de las displasias esqueléticas siempre es controvertido su uso ante el posible empeoramiento de las deformidades y complicaciones ortopédicas <sup>[186]</sup>. En pacientes con TBI el debate permanece abierto y es puesto en duda por muchos autores <sup>[43] [241] [242] [243]</sup>. Existen series de pacientes tratados sin efectos adversos y con un beneficio moderado en hipocondroplasia y en pacientes con variantes en heterocigosis en *NPR2* <sup>[165] [186]</sup>, si bien no se han realizado ensayos clínicos aleatorizados.

En vista del número creciente de pacientes que están siendo diagnosticados de entidades con variantes en genes implicados en displasias esqueléticas, parece necesaria la investigación en este campo. Se necesitan estudios aleatorizados con terapias promotoras del crecimiento de mayor envergadura y duración, siendo esta una línea de investigación prometedora. La evidencia de un diagnóstico molecular supone un cambio de paradigma y una oportunidad tanto para replantear seguimientos con intervalos de tiempo más cortos y monitorizar la potencial exacerbación de las anomalías esqueléticas e incluso para plantear la retirada de tratamientos que aún no han demostrado un claro beneficio <sup>[47]</sup>.

La experiencia derivada de ensayos clínicos y fármacos utilizados en los últimos años en entidades como hipofosfatasa, acondroplasia, raquitismo hipofosfatémico ligado a X o fibrodisplasia osificante progresiva <sup>[203] [210] [244]</sup> ofrecen un horizonte esperanzador, donde las terapias específicas dirigidas al mecanismo patogénico subyacente cada vez estén más cerca.

#### 4.2. Problemas derivados de la interpretación de variantes de significado incierto (VUS)

La clasificación de las variantes encontradas se ha realizado, tal y como se ha mencionado previamente, siguiendo las recomendaciones de la ACMG <sup>[146]</sup> y SHERLOC <sup>[147]</sup>. Se considera que las variantes patogénicas o probablemente patogénicas son diagnósticas de una entidad. Por el contrario, las VUS son candidatos eventuales que pueden suponer “un problema” para investigadores y clínicos. Las razones por las que hay tantas VUS se derivan directamente de las propias recomendaciones de ACMG. Estas ponen mucho énfasis en la frecuencia de

variantes en población general (gnomAD), en los resultados de estudios funcionales, en los análisis de cosegregación familiar y en el conocimiento fisiológico de los dominios importantes de una proteína. Los estudios genéticos de crecimiento presentan per se dificultades añadidas directamente relacionadas con estos aspectos:

1. La base de datos de controles sanos (gnomAD), puede contener muchas variantes patogénicas relacionadas con desórdenes del crecimiento. Los individuos con talla baja y anomalías esqueléticas leves están sin duda incluidos, al considerarse individuos sanos.
2. Existen muy pocos estudios funcionales realizados en los genes encontrados en nuestro estudio. Hasta la fecha no hay estudios funcionales en *ACAN* y muy pocos en *IHH* <sup>[245]</sup> <sup>[246]</sup> <sup>[247]</sup> <sup>[248]</sup>. A día de hoy tenemos un conocimiento limitado sobre la fisiopatología de estas entidades y el posible efecto deletéreo de las variantes en las proteínas.
3. Es frecuente que ambos progenitores de un probando tengan talla baja, lo que interfiere los estudios de cosegregación. Por otro lado, las características clínicas y/o radiológicas no son severas y la penetrancia incompleta existe.
4. Reunir datos fenotípicos y muestras de ADN para los estudios de cosegregación de tres generaciones es arduo y más ante situaciones clínicas leves. Las nuevas técnicas de fertilización, cada vez más frecuentes, añaden también complejidad al estudio familiar.

Sin embargo, en este estudio hemos incluido las VUS en las estadísticas, pensando que promueven más beneficios que problemas. Su utilidad se resume en los siguientes puntos:

1. La descripción de pacientes con talla baja con relación a variantes en heterocigosis en *ACAN* e *IHH* es relativamente reciente. Por tanto, la caracterización molecular es aún incipiente y toda información disponible para clínicos e investigadores puede ser útil. Actualmente, el laboratorio está realizando estudios funcionales de las variantes en *IHH* para poder determinar cuáles son patogénicas y cuáles no. Esto nos ayudará a profundizar en el conocimiento de la proteína IHH y su implicación en el crecimiento. Trasladar esta información contribuirá a que las variantes identificadas puedan ascender en la clasificación (a variantes patogénicas o probablemente patogénicas), lo que en último término permitirá mejorar el consejo genético y la monitorización del paciente.
2. Al tratarse de entidades clínicamente leves y de reciente descripción, la prevalencia en población general no es aún conocida. Las bases consultadas pueden contener individuos afectados de estas condiciones sin diagnosticar, lo que restaría puntuación en la evidencia de patogenicidad <sup>[249]</sup>.
3. Los estudios de segregación concordantes refuerzan la sospecha de patogenicidad, aún en ausencia de tres generaciones de miembros familiares.

4. Encontrar una variante de significado incierto en más de una familia donde exista cosegregación apoya la realización de estudios funcionales.
5. La inespecificidad y levedad de los fenotipos encontrados no refuerza la patogenicidad, si bien hemos encontrado variantes patogénicas o probablemente patogénicas con estos mismos fenotipos.

Todas estas consideraciones apoyan que en un futuro alguna de estas variantes de significado incierto pueda ser catalogada como probablemente patogénica o incluso patogénica y contribuir a ampliar el espectro genotípico.

### 4.3. Correlación fenotipo-genotipo

Los espectros fenotípicos encontrados en la presente investigación son leves, inespecíficos y heterogéneos como ya se ha mencionado y, por lo tanto, no se han podido establecer relaciones fenotipo-genotipo.

El ejemplo más representativo lo constituye la primera familia con una delección completa del gen que se describe en el trabajo que reúne la serie de pacientes con variantes en heterocigosis en *IHH*. La paciente y su padre, ambos portadores de la delección, no presentan el fenotipo clásico de braquidactilia A1 (MIM: 112500), ni tampoco un fenotipo más grave que el resto de la serie. De hecho, tanto los pacientes con variantes con cambio de sentido como aquellos con variantes sin sentido son indistinguibles desde el punto de vista clínico y radiológico de estos dos individuos con la delección.

Algo similar sucede en la serie de pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN*. No obstante, en este trabajo observamos que los pacientes con variantes sin sentido sí presentan una talla más baja y una mayor proporción de sujetos con maduración esquelética adelantada que en los probandos con variantes con cambio de sentido. Sin embargo, otros rasgos como la dismorfia facial, las anomalías esqueléticas, la artropatía precoz o la discopatía degenerativa aparecen de forma similar en ambos grupos.

Como hallazgo inesperado cabe mencionar una de las pacientes de la cohorte de *ACAN*, que presentaba deformidad de Madelung. Dicha anomalía es característica de la DLW por deficiencia de *SHOX*, aunque no exclusiva. Está descrita en otras displasias esqueléticas (enfermedad de Ollier, exostosis hereditaria múltiple, pseudohipoparatiroidismo, etc) y también puede ser de origen postraumático <sup>[250] [251] [252]</sup>. Al no haber sido reportada previamente en otros pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN*, no sabemos si se trata de un hallazgo fortuito. La descripción futura de cohortes más amplias resolverá este interrogante. La presencia de deformidad de Madelung en la paciente de la serie *ACAN* quizás pueda explicarse por la relación



entre SHOX y SOX trío (SOX5, SOX6, SOX9) que conduce a la activación de un *enhancer* de agregano. La participación de ambos genes en vías de regulación comunes podría tener como consecuencia la coincidencia de fenotipos <sup>[100]</sup>.

Son necesarios estudios familiares adicionales y análisis de cohortes más extensas para definir de forma sólida el fenotipo de estas entidades. La generación de modelos animales y, por supuesto los análisis funcionales, determinarán el papel de las variantes y contribuirán a establecer relaciones fenotipo-genotipo.

Como antecedente cabe mencionar toda la investigación llevada a cabo en torno a la deficiencia de *SHOX* <sup>[84]</sup>. Después de más de dos décadas de estudio se ha podido establecer que SHOX es un factor de transcripción que integra diversos aspectos del desarrollo esquelético, la biología del cartílago de crecimiento y la apoptosis. En este caso se han desarrollado modelos animales en gallina, pez cebra, ratones transgénicas así como cultivo de micromasas de embriones de gallina y líneas celulares primarias para llegar a conocer en profundidad las funciones de SHOX, sus interacciones, genes diana y reguladores <sup>[83] [98] [100] [102] [103] [104] [253] [254] [255]</sup>. El espectro clínico de la deficiencia de *SHOX* es igualmente heterogéneo. Así, alteraciones/variantes idénticas pueden ocasionar DLW y TBI, lo que sugiere una influencia del bagaje genético de cada individuo. Se han establecido diferencias en el fenotipo entre sexos, siendo la prevalencia de rasgos típicos de DLW en mujeres cuatro veces superior a la que aparece en varones <sup>[86]</sup>. En este caso se postula el efecto de los estrógenos en el cierre precoz de las epífisis. A pesar de todos los esfuerzos no se ha establecido correlación entre la severidad del fenotipo y el genotipo.

La talla es un rasgo poligénico como demuestran los estudios de asociación del genoma (GWAS) <sup>[256] [257]</sup>, y la contribución a la talla de cada uno de los genes que intervienen está aún por dilucidar. Considerando que la estatura de un individuo está determinada por multitud de factores, tanto genéticos como epigenéticos y ambientales, es evidente que queda mucho camino por recorrer. Uno de los retos al que nos enfrentamos es desentrañar la relación entre dichos factores, así como encontrar marcadores biológicos predictores del pronóstico y de evolución clínica a largo plazo, así como identificar posibles dianas terapéuticas.

#### 4.4. ¿Cuál es la técnica de diagnóstico ideal? ¿Paneles de genes o exomas?

Otra de las cuestiones sobre las que merece la pena reflexionar, y que se trata en el artículo central de la tesis, es la idoneidad de los paneles de genes para el diagnóstico de la talla baja con anomalías esqueléticas. El artículo contiene una tabla-resumen con los resultados de distintos tipos de abordaje diagnóstico en pacientes con talla baja <sup>[212] [213] [214] [215] [216] [258] [259] [260]</sup>

[261] [262]. Los trabajos recogidos son heterogéneos en cuanto a selección de pacientes (incluyen talla baja sindrómica y TBI), aproximación clínica inicial, estudios adicionales y tipo de NGS empleada (paneles de genes o WES). En cambio, los resultados son homogéneos y consistentes. Los paneles obtienen una tasa de hallazgos moleculares inferior a la obtenida en la aproximación mediante WES, y las cohortes de pacientes con talla baja sindrómica obtienen mayor proporción de diagnósticos que aquellas con pacientes con talla baja idiopática.

Nuestra cohorte de pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves se podría asemejar, por los criterios de inclusión, con aquellas que recogen pacientes con TBI. Las anomalías esqueléticas pueden pasar desapercibidas y sólo a través de la exploración física y radiológica minuciosa se pueden detallar e incluso, no detectarse. La tasa de éxito encontrada en nuestro trabajo (19.4%) es superior a los estudios que incluyen pacientes con TBI [211] [212] [213] [214] [215] [263], donde los hallazgos positivos oscilan entre el 8.7% y el 16.5%. Esta diferencia se puede atribuir en parte a la inclusión de VUS en nuestros resultados; excluyendo las VUS la tasa diagnóstica es de 11% (12 variantes en una cohorte de 108 pacientes). No obstante, consideramos que el fenotipado realizado en la selección de la cohorte es la clave del elevado rendimiento. Los trabajos publicados en la literatura que se limitan a pacientes con TBI encuentran tasas de éxito menores a pesar de secuenciar bien el exoma completo o un mayor número de genes. Fan y cols. obtienen una tasa diagnóstica en TBI del 11.3%; en sus resultados los genes relacionados con la condrogénesis ocupan el primer lugar pero también encuentran genes implicados en el eje somatotropo [211]. El trabajo de Freire y cols. incluye pacientes con antecedente de PEG y no excluye desproporción corporal ni malformaciones menores. El rendimiento es inferior al de nuestra serie, pues obtienen 14.5% de diagnósticos a pesar de realizar secuenciación completa del exoma en parte de su cohorte [213]. A nuestro criterio, los resultados obtenidos son muy buenos y corroboran la pertinencia de cribar genes de displasias esqueléticas en pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves tras una selección adecuada.

Como hallazgo inesperado encontramos una variante patogénica conocida en *PTPN11* en una de las pacientes de la cohorte. La paciente presentaba talla baja con una ligera desproporción corporal. Este gen está incluido en el panel al ser responsable de una displasia esquelética, la metacondromatosis (MIM: 156250), aunque también está implicado en los síndromes de Noonan (MIM: 163950) y Leopard (MIM: 151100). Gracias a la identificación de una variante de novo en este gen, la paciente ha sido diagnosticada de síndrome de Noonan oligosintomático, contribuyendo a aumentar el número de pacientes con fenotipos atípicos, leves e inespecíficos [264]. Este hallazgo casual apoya el cribado del mayor número de genes posible en los estudios que se realicen.

En vista de la disminución de los costes y el tiempo de análisis hoy elegiríamos realizar WES a los pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas o, al menos, un panel que incluyera otros genes implicados en talla baja y no sólo aquellos implicados en la condrogénesis. Sin duda los genes implicados en displasias esqueléticas volverían a ocupar un lugar predominante, pero dada la elevada frecuencia de hallazgos imprevistos (tanto en nuestra serie como en otras de la literatura) optaríamos por secuenciar un mayor número de genes.

## 5. Limitaciones de la investigación

Una de las limitaciones de nuestro estudio ha sido la imposibilidad de reunir grupos homogéneos de pacientes. Tanto en la cohorte de 108 pacientes como en las series de *ACAN* e *IHH* se han incluido en su mayor parte de niños y niñas con talla baja en fase de crecimiento, junto a adolescentes que habían alcanzado su talla final. Por tanto, los grupos estudiados son heterogéneos en términos de estructura y afectación ósea, así como magnitud de talla alcanzada. Los huesos en crecimiento sufren modificaciones continuas a nivel de epífisis y metáfisis siendo en ocasiones difícil su interpretación <sup>[72]</sup>. Respecto a comparar tallas en edad infantil con tallas finales, es necesario recalcar que esta puede estar artefactada por una pubertad precoz o adelantada, o por una aceleración de la maduración esquelética prepuberal; en estos casos encontramos menor afectación. Por el contrario, puede estar más afectada en las etapas de crecimiento lento, debido a carencias nutricionales o fenómenos concurrentes como el RCCD. Idealmente habría que realizar el estudio distinguiendo niños prepuberales, puberales y postpuberales.

Todos los pacientes incluidos en los tres artículos proceden de distintos centros. La colaboración de compañeros especialistas de otros puntos geográficos ha sido clave; no obstante, han existido con seguridad inexactitud en las mediciones y falta de datos, así como diferencias de criterio en la interpretación de los rasgos externos. En el reclutamiento ideal, todos los pacientes serían valorados por el mismo investigador, garantizando así la homogeneidad y minimizando la pérdida de datos. Sin embargo, para contrastar estas deficiencias todos los datos clínicos han sido evaluados por un solo clínico.

La dificultad de definir los rasgos esqueléticos leves, tanto en el examen físico como radiológico es un hecho comentado anteriormente. Es difícil distinguir signos esqueléticos leves/menores de las variantes de la normalidad. Hemos intentado paliar esta dificultad a través del examen de radiografías por un solo clínico y un radiólogo.

No obstante, se podría discutir la idoneidad de cribar genes relacionados con displasias esqueléticas en pacientes con TBI examinados bajo criterios rigurosos. Tras descartar

cualquiera de los criterios de inclusión de nuestro estudio, y analizar nuestros datos con respecto a este hipotético grupo control podríamos llegar a conclusiones más robustas. Nuestra hipótesis es que el grupo control presentaría menos pacientes con variantes en genes implicados en condrogénesis que el grupo con anomalías esqueléticas.

La limitación principal de este trabajo es no contar con estudios funcionales para determinar la patogenicidad de las VUS detectadas tanto en *ACAN* como en *IHH*. En nuestra investigación quisimos comunicarlas por los motivos que se detallan más arriba, teniendo en cuenta que no podemos asegurar en estos casos el diagnóstico ni se deberían tomar decisiones terapéuticas en base a su hallazgo. Actualmente, miembros del laboratorio están realizando estudios funcionales de variantes de *IHH* para determinar su patogenicidad. Estos resultados, en combinación con nuestra serie de pacientes bien caracterizados clínica y radiológicamente, permitirán mejorar nuestro conocimiento de la fisiopatología de variantes en *IHH* en un futuro cercano.

La clasificación de las variantes no es un hecho trivial y en muchas enfermedades puede ser una barrera para el uso óptimo de la información genética. Un trabajo reciente centrado en el análisis funcional de variantes en el gen *FH* (implicado en síndrome hemolítico urémico atípico) encuentra que sólo 36.7% de las 105 variantes con cambio de sentido encontradas alteran la expresión in vitro de *FH* o su función <sup>[265]</sup>. El trabajo describe la discrepancia entre los resultados obtenidos en los estudios funcionales y los algoritmos de predicción de patogenicidad, utilizando distintos puntos de corte. De forma global la predicción fue errónea en 17.1% de los casos, concluyendo que tanto la frecuencia alélica como los algoritmos *in silico* deben usarse con cautela a pesar de su utilidad.

Dado que la talla es un rasgo poligénico y que los estudios de cosegregación apoyan la causalidad sí parece oportuno hablar en nuestro caso de una potencial contribución. No obstante, la realización de estudios funcionales es obligada y parece un buen punto de partida de investigación a medio plazo.

Otro de los retos para el futuro más cercano lo constituyen los pacientes sin diagnóstico de la cohorte de 108 probandos con talla baja y anomalías esqueléticas leves. Como en todo paciente sin diagnóstico etiológico, el seguimiento clínico es prioritario. A lo largo de su evolución pueden aparecer rasgos fenotípicos que orienten hacia otra etiología que indique la realización de otras pruebas diagnósticas, o incluso pueden alcanzar una talla final dentro de la normalidad (como sucedería en el caso del RCCD).

El potencial rendimiento de otras técnicas de diagnóstico genético sería la siguiente cuestión importante. Como se ha comentado más arriba la realización de paneles que incluyan más genes (como aquellos implicados en regulación hormonal) o incluso la realización de WES

o WGS sería sin duda beneficiosa para ellos. La existencia en todas las series de hallazgos genéticos inesperados (en relación con fenotipos leves, atenuados e inespecíficos) apoya esta línea de trabajo.

Cambiando de orientación podemos mencionar la importancia de variantes potencialmente patogénicas que pueden escapar durante el filtrado de la NGS. A pesar de la implementación de distintas herramientas de detección, la sensibilidad para la detección de CNV está aún lejos de ser óptima, sobre todo en la detección de deleciones de exones individuales y duplicaciones. Ante una sospecha clínica elevada se debería completar el estudio con MLPA.

Resulta de especial interés un trabajo publicado recientemente por Gergics y cols.<sup>[266]</sup> en el que se describe el hallazgo de variantes con cambio de sentido y variantes sinónimas en heterocigosis en *POU1F1* que afectan al corte y empalme, y cuyo efecto neto es la pérdida de función, en pacientes con hipopituitarismo. Este estudio subraya la importancia de evaluar el impacto de las variantes que afectan al corte y empalme entre las cuales están las variantes sinónimas, a las cuales no se les concede máxima prioridad en el análisis de la NGS, dada su falta de impacto en la secuencia codificante. Este tipo de variantes suponen una proporción pequeña de las anomalías genéticas en las enfermedades humanas en general. Las variantes cercanas a los lugares canónicos de corte y empalme son rápidamente reconocidas como patogénicas y pueden identificarse con elevada precisión. Sin embargo, aquellas que están alejadas de la unión exón-intrón, y que no se capturan necesariamente en los paneles de NGS ni en WES pueden suponer una pérdida. Se desconoce la importancia de este tipo de variantes en genes como *ACAN* e *IHH*. Hasta la fecha se ha reportado únicamente una variante intrónica que afecta el corte y empalme localizada en el sitio canónico donador del exón 10 en *ACAN*, c.2026+1G>A<sup>[151]</sup>. El análisis genético mediante WGS ayudará a estudiar estas variantes.

Se desconoce asimismo el rendimiento que pueden tener los estudios de metilación en pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves. Un trabajo reciente describe la realización de análisis de metilación de 10 regiones en una cohorte pequeña de 58 pacientes con TBI. Al no encontrar ninguna alteración los autores sugieren que los trastornos de la impronta se relacionan más probablemente con PEG y/o fenotipo específico<sup>[267]</sup>.

Definir qué pacientes de nuestra cohorte son candidatos a este tipo de revisiones o nuevos estudios puede ser una decisión difícil, recordando que estamos ante entidades leves, heterogéneas e inespecíficas. Basándonos en la experiencia de los pacientes con displasias esqueléticas parecerían buenos candidatos aquellos cuyo fenotipo sea más acusado y cuyos rasgos esqueléticos recuerden de forma específica alguna entidad. Los pacientes con Ts/T elevada y/o un progenitor con talla baja y anomalías esqueléticas podrían ser buenos candidatos. Estas dos características destacan entre el resto como predictores de encontrar un

hallazgo molecular en nuestro trabajo. Además, seleccionaríamos a las familias que cuenten con más miembros afectados y así poder enriquecer la caracterización. De los 87 pacientes sin hallazgo molecular unos 30 reunirían estas características; en ellos se prevé la realización de WES en un futuro cercano.

## 6. “Displasias esqueléticas leves”: nueva categoría diagnóstica

Nuestra investigación demuestra que el binomio talla baja-anomalías esqueléticas leves tiene repercusión y merece ocupar un lugar en la clasificación de la talla baja. Poder denominar a este grupo de entidades de alguna manera es una tarea pendiente. El término displasia esquelética leve (o bien displasia esquelética menor o subclínica) parece bastante apropiado, ya que los genes causales están en el grupo de las displasias esqueléticas <sup>[39]</sup> <sup>[50]</sup> <sup>[268]</sup>. No obstante, este término no está aceptado de manera explícita por las sociedades médicas ni grupos de expertos, y en el momento actual se carece de criterios claros para su definición.

La NGS ha permitido describir un grupo cada vez más numeroso de pacientes con anomalías en genes relacionados con la condrogénesis que comparten una serie de características que los diferencian del resto de las displasias esqueléticas. Clínicamente se trata de pacientes con fenotipos leves que suelen presentar afectación ligera o moderada de la talla, desproporción corporal no llamativa, ausencia de dolor y deformidad esquelética significativa y ausencia de consecuencias en la calidad de vida. Desde el punto de vista radiológico presentan rasgos esqueléticos poco llamativos y en ocasiones sutiles. Como ya se ha detallado los fenotipos encontrados suelen ser heterogéneos y poco específicos.

La DLW, la hipocondroplasia y las braquidactilias sin manifestaciones extraesqueléticas pertenecerían a este subgrupo al que se podrían sumar los pacientes con variantes en heterocigosis en *ACAN*, *NPR2*, *IHH* y *NPPC*.

Es importante destacar que las displasias esqueléticas leves formarían un grupo numeroso dentro de las causas primarias de talla baja.

## 7. Importancia del fenotipado esquelético sistemático

Una cuestión sobre la que reflexionar es si los pacientes incluidos en nuestra cohorte se ajustan al concepto de TBI. La definición actual comporta una estatura inferior a -2 DE respecto a la estatura media correspondiente para una edad, sexo y población determinados, en un niño con un tamaño normal al nacer, proporciones corporales normales y sin evidencia de ningún trastorno sistémico, endocrino, nutricional o anomalía cromosómica <sup>[63]</sup> <sup>[64]</sup>. Esta definición incluye a los pacientes con talla baja familiar (TBF) y retraso constitucional del crecimiento y

desarrollo (RCCD), pero excluye a todos aquellos niños en principio sanos con rasgos dismórficos, pequeños para la edad gestacional (PEG) o con desproporción corporal.

Según esta definición algunos de los pacientes incluidos en esta investigación podrían ajustarse a esta categoría y otros no, al tener desproporción corporal leve o haber nacido pequeños para la edad gestacional. Al igual que en nuestra cohorte de 108 pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves, los trabajos que realizan estudios moleculares en pacientes con TBI <sup>[212]</sup> <sup>[213]</sup> <sup>[214]</sup> <sup>[215]</sup>, encuentran que los genes relacionados con la condrogénesis son los más frecuentes, con resultados superponibles a los nuestros. Teniendo en cuenta los fenotipos relacionados hasta ahora con *ACAN* e *IHH*, nuestra hipótesis es que probablemente en las cohortes de TBI publicadas en la literatura haya pacientes con rasgos esqueléticos adicionales no evaluados y/o reportados, así como niños sin expresión fenotípica debido a su corta edad.

A la luz de estos trabajos sabemos que existen causas primarias conocidas de talla baja entre pacientes con TBI y pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves. Esta afirmación nos conduce al siguiente interrogante: ¿cuándo se debe indicar un estudio genético?. Hasta hace unos años la selección de candidatos a estudio genético se realizaba en aquellos casos donde las probabilidades de encontrar un defecto genético fueran elevadas. Así pues, era clara la indicación de estudio ante deficiencia severa de GH, insensibilidad a la GH inequívoca, deficiencia combinada hormonas hipofisarias, asociación con malformaciones congénitas y/o dismorfia, PEG sin recuperación del crecimiento, coexistencia de microcefalia, talla < - 3DE, asociación con retraso desarrollo y displasia esquelética <sup>[205]</sup>. Gracias a la NGS este enfoque se ha modificado. Dada la elevada proporción de pacientes con talla baja que se ajustan a la categoría de TBI (60-80%), probablemente no nos encontremos en disposición de realizar paneles de genes o secuenciación completa del exoma a todos ellos, no sólo por motivos económicos y de recursos humanos, sino también de rentabilidad diagnóstica. Como ya señalan otros autores, la clave en la selección de los pacientes se encuentra en el fenotipado sistemático <sup>[215]</sup> <sup>[269]</sup>, idea que refuerza nuestra investigación.

En nuestra cohorte de 108 pacientes hemos podido demostrar que tanto la desproporción corporal a expensas de miembros inferiores, como la existencia de un progenitor con anomalías esqueléticas son predictores de hallazgos moleculares. En nuestras series de pacientes con variantes en *ACAN* e *IHH* la práctica totalidad de los probandos presentaba alguna anomalía esquelética. Por tanto, fenotipar en detalle supone poder encontrar rasgos característicos y/o sugerentes de alguna entidad conocida como paso previo a solicitar estudios genéticos.

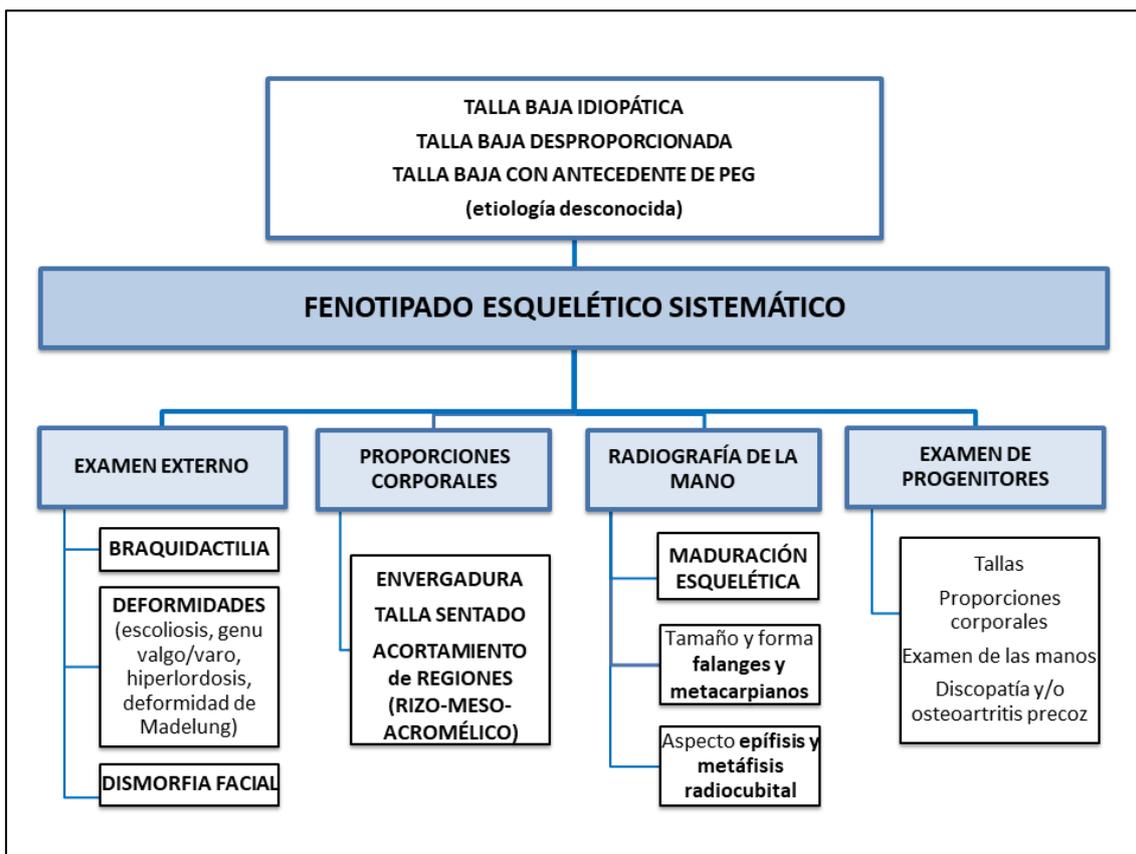
Los algoritmos disponibles para el enfoque del paciente con talla baja ayudan a clasificar a los pacientes de manera bastante precisa. Las guías más recientes <sup>[44]</sup> <sup>[47]</sup> incluyen en la

valoración inicial un listado de “claves para sospechar causas primarias”, entre otras novedades. Para sospechar una entidad genética con relación a defectos en la condrogénesis estas guías recomiendan recoger: antecedentes familiares de talla baja de carácter autosómico dominante (así como desproporción, artritis y/o discopatía precoz), desproporción corporal, hipertrofia muscular y déficit de talla en DE similar a la de uno de los padres. En caso de existir alguno de los anteriores aconsejan realizar un rastreo de genes candidatos (*SHOX*, *ACAN*, *NPR2*, *IHH*, *NPPC*, *FGFR3*) mediante NGS y/o técnicas tradicionales (MLPA, Sanger) como es el caso de *SHOX*. Los autores inciden en que la búsqueda sistemática de “signos y síntomas clave” de enfermedades o grupos de enfermedades es de suma importancia. Asimismo, sugieren que su aplicación debe extenderse a otros grupos de entidades (por ejemplo, anomalías del eje somatotropo, trastornos de la metilación, etc).

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo proponemos un esquema de fenotipado esquelético que de alguna manera completa “las claves” formuladas por los anteriores autores <sup>[44]</sup> <sup>[47]</sup>. En la figura 14 se representa de forma esquemática. Las principales novedades son el examen externo de las manos en busca de braquidactilia (en pacientes y progenitores) y la evaluación completa de la radiografía de la mano en el probando.

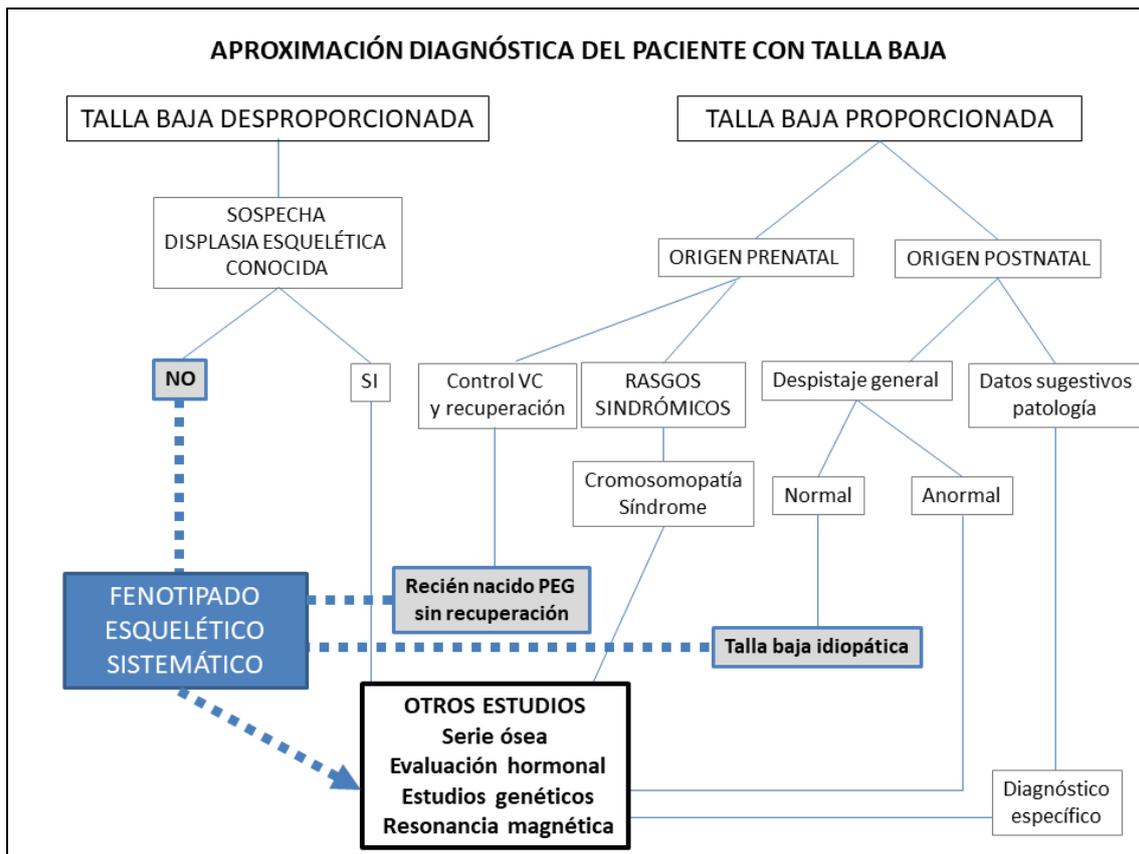
Basándonos en los hallazgos de las series publicadas y siguiendo la clasificación más reciente de las causas de talla baja propuesta por la ICPED <sup>[20]</sup>, los candidatos a este fenotipado serían pacientes en los que se sospecha una causa primaria (entre los que se incluyen los PEG sin recuperación del crecimiento) y los pacientes con TBI.





**Figura 14:** Propuesta de fenotipado esquelético sistemático destinado a pacientes con talla baja de etiología desconocida en los que se han descartado causas primarias y secundarias conocidas (TBI, talla baja desproporcionada y talla baja con antecedente de PEG sin recuperación).

Uno de los algoritmos diagnósticos más utilizados en talla baja es el propuesto por Argente y cols. <sup>[43]</sup>. En él se divide a los pacientes inicialmente en talla baja proporcionada y desproporcionada. Aquellos pacientes con talla baja desproporcionada en los que no se sospeche *a priori* una displasia esquelética conocida, se pueden beneficiar también del fenotipado esquelético sistemático. Un paciente con micromelia leve que no presente dolor, deformidad ni impotencia funcional probablemente no se considere que padezca una displasia esquelética y sí puede tener una displasia leve. En la figura 15 se propone el momento en que debe realizarse el fenotipado dentro del algoritmo.



**Figura 15:** Propuesta de localización del fenotipado esquelético sistemático dentro del algoritmo diagnóstico de talla baja. Modificado de Argente y cols.<sup>[43]</sup>.

El examen cuidadoso de los pacientes debe preceder a los estudios genéticos<sup>[215]</sup>. Dado que no es fácil determinar si un paciente tiene algún rasgo adicional, al seguir los puntos propuestos en el fenotipado sistemático se persigue la detección de marcadores específicos, inespecíficos (los más frecuentes) o datos “clave” que pueden orientar la etiología y abrir la puerta al genotipado.

Ante un paciente con talla baja, desproporción y/o braquidactilia sin otros hallazgos más específicos (como la maduración esquelética adelantada prepuberal propia de *ACAN* o un acortamiento mesofalángico de los dedos de las manos característico de *IHH*) y/o un progenitor con rasgos similares podemos afirmar que existe la posibilidad de encontrar tanto *ACAN* como *IHH*. En nuestra serie no hemos encontrado variantes en *NPR2*, *FGFR3* ni *NPPC* a pesar de lo cual parece existir un solapamiento clínico de todas estas entidades a las que debemos sumar *SHOX*.

La valoración conjunta contando con profesionales de distintas áreas puede ser necesaria en ocasiones, y siempre será muy valiosa<sup>[270]</sup>. En el terreno de las displasias esqueléticas los equipos multidisciplinares (constituidos por endocrinólogos, genetistas clínicos, radiólogos y genetistas moleculares) aportan un gran valor en el enfoque diagnóstico de los

pacientes y por tanto pueden ser idóneos en el abordaje de pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas.

## 8. Consideraciones finales y futuras líneas de investigación

Este trabajo, junto con otros publicados en la literatura en los últimos años, amplían de alguna manera el paradigma de las causas primarias de talla baja, donde las displasias esqueléticas leves ocupan un lugar notable gracias a la contribución de la genética.

Discernir qué pacientes son candidatos a estudiar estas patologías comprende conocer sus rasgos característicos. Para ello puede ser de gran interés elaborar registros nacionales e internacionales de pacientes afectados de estas entidades, recogiendo detalles del fenotipo y genotipo, con el fin de encontrar marcadores que permitan orientar el diagnóstico de forma cada vez más precisa.

La designación de braquidactilia en el examen externo de un paciente es uno de los puntos de conflicto en la exploración física. El estudio de la validez de las tablas de referencia disponibles podría ser una línea de investigación que permitiera disponer de valores de referencia sencillos y aplicables en la clínica. En un futuro, la medida de la mano puede formar parte de la antropometría.

Los pacientes sin diagnóstico son otro de los retos más cercanos. El desarrollo de proyectos que incluyan paneles con mayor número de genes, exomas o genomas seguramente contribuya a describir nuevas entidades, así como a establecer relaciones genotipo-fenotipo.

Con respecto al tratamiento es necesario promover la puesta en marcha de ensayos clínicos aleatorizados con terapias promotoras del crecimiento, incluyendo nuevas dianas terapéuticas, en cohortes de pacientes con displasias esqueléticas leves para determinar su indicación.

## Conclusiones

1. El panel de displasias esqueléticas ha demostrado su eficacia en el estudio de 108 pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves al encontrar variantes implicadas en la etiopatogenia de la talla baja en un 19,4% de los casos.
2. Las variantes en heterocigosis en *ACAN* e *IHH* están presentes en 80% de los pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves con hallazgo molecular positivo. Deben ser los primeros candidatos a estudio en pacientes de estas características tras descartar la deficiencia de *SHOX* y siempre que no haya datos específicos de otra entidad.
3. Los fenotipos encontrados en los pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas con hallazgos moleculares son inespecíficos. Existe además una gran heterogeneidad clínica tanto en los probandos con variantes en *ACAN* como aquellos con variantes en *IHH*.
4. La presencia de maduración esquelética adelantada no es un criterio imprescindible para sospechar la existencia de variantes en heterocigosis en *ACAN*, en pacientes con talla baja, ya que el 40% de los probandos con variantes patogénicas de nuestra serie presenta una maduración esquelética normal o retrasada.
5. Los pacientes con variantes en heterocigosis en *IHH* de nuestra serie presentan talla baja leve-moderada, acortamiento de la falange media del 5º dedo y micromelia leve como hallazgos más comunes.
6. Se ha detectado la primera delección completa de *IHH* en un probando y su progenitor. El fenotipo que presentan es igual que el de otros pacientes con variantes sin sentido o con cambio de sentido.
7. La braquidactilia es el hallazgo radiológico más común en los pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves que presentan hallazgos moleculares.
8. El fenotipado esquelético sistemático enriquece el abordaje de pacientes con talla baja de etiología desconocida. La presencia de desproporción corporal, alteraciones esqueléticas externas, anomalías radiológicas y progenitores con talla baja desproporcionada y/o rasgos esqueléticos orientan a sospechar entidades con relación a genes que intervienen en la condrogénesis.
9. La presencia de desproporción a expensas de miembros inferiores y al menos un progenitor con talla baja y anomalías esqueléticas predicen un resultado positivo en el estudio molecular dirigido de pacientes con talla baja y anomalías esqueléticas leves.
10. La caracterización completa de la radiografía de mano y muñeca debe formar parte del fenotipado esquelético. El análisis de la maduración ósea, el tamaño y la forma de falanges y metacarpianos y la morfología radio-cubital distal puede aportar claves diagnósticas.

## Referencias

1. Feigelman S. Teorías del desarrollo y la conducta. En: Kliegman RM, Blum NJ, Shah SS, St Geme JW, Tasker RC, Wilson KM, Behrman RE. Nelson Tratado de Pediatría. 21ªed. Barcelona: Elsevier España; 2020. p. 117-123
2. Park-Gorstein S. Salud infantil a nivel mundial. En: Kliegman RM, Blum NJ, Shah SS, St Geme JW, Tasker RC, Wilson KM, Behrman RE. Nelson Tratado de Pediatría. 21ªed. Barcelona: Elsevier España; 2020. p. 21-30
3. R. Tojo, R. Leis. Crecimiento normal. En: Cruz Tratado de Pediatría. 11ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2014. p. 885-896.
4. Bamba V, Kelly A. Valoración del crecimiento. En: Kliegman RM, Blum NJ, Shah SS, St Geme JW, Tasker RC, Wilson KM, Behrman RE. Nelson Tratado de Pediatría. 21ªed. Barcelona: 2020 Elsevier España.
5. Pozo Román J. Crecimiento normal y talla baja. *Pediatr Integral*. 2015; 19(6): 411.e1-411.e23.
6. Jee YH, Baron J. The Biology of Stature. *J Pediatr*. 2016;173:32-38.
7. Tanner JM. Fetus into man: physical growth from conception to maturity. 1ª ed. Londres: Open Books, 1978.
8. Karlberg J. A biologically-oriented mathematical model (ICP) for human growth. *Acta Paediatr Scand*. 1989; Supl 350:70-94.
9. Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine regulation of feto-placental growth. *Horm Res*. 2009;72(5):257-265.
10. Karlberg J, Luo ZC. Foetal size to final height. *Acta Paediatr* 2000; 89: 632-6.
11. Boersma B, Wit JM. Catch-up growth. *Endocr Rev*. 1997;18(5):646-661.
12. Lui JC, Nilsson O, Baron J. Recent research on the growth plate: Recent insights into the regulation of the growth plate. *J Mol Endocrinol*. 2014;53(1):T1-9.
13. Maes C, Kronenberg HM. Postnatal Bone Growth: Growth Plate Biology, Bone Formation, and Remodeling. En: Glorieux F, Pettifor J, Jüppner H. *Pediatric Bone*, 2ª ed. USA: Elsevier; 2003. p. 55-82 .
14. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003;423(6937):332-6.
15. Baron J, Säwendahl L, De Luca F, Dauber A, Phillip M, Wit JM, et al. Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(12):735-746.

16. Lui JC, Jee YH, Garrison P, Iben JR, Yue S, Ad M, et al. Differential aging of growth plate cartilage underlies differences in bone length and thus helps determine skeletal proportions. *PLOS Biol.* 2018;16(7):[e2005263](#).
17. Lui JC, Nilsson O, Chan Y, Palmer CD, Andrade AC, Hirschhorn JN, et al. Synthesizing genome-wide association studies and expression microarray reveals novel genes that act in the human growth plate to modulate height. *Hum Mol Genet.* 2012;21(23):5193-201.
18. Faienza MF, Chiarito M, Brunetti G, D'Amato G. Growth plate gene involvement and isolated short stature. *Endocrine.* 2021;71(1):28-34
19. Van der Eerden BCJ, Karperien M, Wit JM. Systemic and Local Regulation of the Growth Plate. *Endocr Rev* 2003;24(6):782-801.
20. Jorge AAL, Grimberg A, Dattano MT, Baron J. Disorders of childhood growth. En: Sperling M, Majzoub JA, Menon R, Stratakis CA. *Sperling Pediatric Endocrinology*. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2020. p.299-356.
21. Gat-Yablonski G, De Luca F. Effect of Nutrition on Statural Growth. *Horm Res Paediatr.* 2017;88(1):46-62.
22. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res.* 2005;64(4):157-65.
23. Nass R, Toogood AA, Hellmann P, Bissonette E, Gaylinn B, Clark R, et al. Intracerebroventricular administration of the rat growth hormone (GH) receptor antagonist G118R stimulates GH secretion: evidence for the existence of short loop negative feedback of GH. *J Neuroendocrinol.* 2000;12(12):1194-9.
24. Argente J, Pérez-Jurado LA. Genetic causes of proportionate short stature. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(4):499-522.
25. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev.* 2001;22(1):53-74.
26. Backeljauw P, Bang P, Dunger DB, Juul A, Le Bouc Y, Rosenfeld R. Insulin-like growth factor-I in growth and metabolism. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2010;23(1-2):3-16.
27. Backeljauw PF, Chernausk S. The insulin-like growth factors and growth disorders of childhood. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012;41(2):265-82, v.
28. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999;20(6):761-87.
29. Domené HM, Bengolea SV, Martínez AS, Ropelato MG, Pennisi P, Scaglia P, et al. Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene. *N Engl J Med.* 2004;350(6):570-7.

30. Overgaard MT, Haaning J, Boldt HB, Olsen IM, Laursen LS, Christiansen M, et al. Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31128-33.
31. Argente J, Chowen JA, Pérez-Jurado LA, Frystyk J, Oxvig C. One level up: abnormal proteolytic regulation of IGF activity plays a role in human pathophysiology. *EMBO Mol Med.* 2017;9(10):1338-45.
32. Sederquist B, Fernandez-Vojvodich P, Zaman F, Säwendahl L. Recent research on the growth plate: Impact of inflammatory cytokines on longitudinal bone growth. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(1):T35-44.
33. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development.* 2015;142(5):817-31.
34. Yakar S, Werner H, Rosen CJ. Insulin-like growth factors: actions on the skeleton. *J Mol Endocrinol.* 2018;61(1):T115-37.
35. Kronenberg HM. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:1-13.
36. Lowery JW, Rosen V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol Rev* 2018;98(4):2431-52.
37. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, et al. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* 2010;467(7317):832-8.
38. Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, Lo KS, Wood AR, Kjaer TR, Fine RS, Lu Y, Schurmann C, Highland HM, Rieger S, Thorleifsson G, Justice AE, Lamparter D, Stirrups KE, Turcot V, Young KL, Winkler TW, Esko T, Karaderi T, Locke AE, Masca NG, Ng MC, Mudgal P, Rivas MA, Vedantam S, Mahajan A, Guo X, Abecasis G, Aben KK, Adair LS, Alam DS, Albrecht E, Allin KH, Allison M, Amouyel P, Appel EV, Arveiler D, Asselbergs FW, Auer PL, Balkau B, Banas B, Bang LE, Benn M, Bergmann S, Bielak LF, Blüher M, Boeing H, Boerwinkle E, Böger CA, Bonycastle LL, Bork-Jensen J, Bots ML, Bottinger EP, Bowden DW, Brandslund I, Breen G, Brilliant MH, Broer L, Burt AA, Butterworth AS, Carey DJ, Caulfield MJ, Chambers JC, Chasman DI, Chen YI, Chowdhury R, Christensen C, Chu AY, Cocca M, Collins FS, Cook JP, Corley J, Galbany JC, Cox AJ, Cuellar-Partida G, Danesh J, Davies G, de Bakker PI, de Borst GJ, de Denus S, de Groot MC, de Mutsert R, Deary IJ, Dedoussis G, Demerath EW, den Hollander AI, Dennis JG, Di Angelantonio E, Drenos F, Du M, Dunning AM, Easton DF, Ebeling T, Edwards TL, Ellinor PT, Elliott P, Evangelou E, Farmaki AE, Faul JD, Feitosa MF, Feng S, Ferrannini E, Ferrario MM, Ferrieres J, Florez JC, Ford I, Fornage M, Franks PW, Frikke-Schmidt R, Galesloot TE, Gan W,

Gandin I, Gasparini P, Giedraitis V, Giri A, Girotto G, Gordon SD, Gordon-Larsen P, Gorski M, Grarup N, Grove ML, Gudnason V, Gustafsson S, Hansen T, Harris KM, Harris TB, Hattersley AT, Hayward C, He L, Heid IM, Heikkilä K, Helgeland Ø, Hernesniemi J, Hewitt AW, Hocking LJ, Hollensted M, Holmen OL, Hovingh GK, Howson JM, Hoyng CB, Huang PL, Hveem K, Ikram MA, Ingelsson E, Jackson AU, Jansson JH, Jarvik GP, Jensen GB, Jhun MA, Jia Y, Jiang X, Johansson S, Jørgensen ME, Jørgensen T, Jousilahti P, Jukema JW, Kahali B, Kahn RS, Kähönen M, Kamstrup PR, Kanoni S, Kaprio J, Karaleftheri M, Kardina SL, Karpe F, Kee F, Keeman R, Kiemenev LA, Kitajima H, Kluijvers KB, Kocher T, Komulainen P, Kontto J, Kooner JS, Kooperberg C, Kovacs P, Kriebel J, Kuivaniemi H, Küry S, Kuusisto J, La Bianca M, Laakso M, Lakka TA, Lange EM, Lange LA, Langefeld CD, Langenberg C, Larson EB, Lee IT, Lehtimäki T, Lewis CE, Li H, Li J, Li-Gao R, Lin H, Lin LA, Lin X, Lind L, Lindström J, Linneberg A, Liu Y, Liu Y, Lophatananon A, Luan J, Lubitz SA, Lyytikäinen LP, Mackey DA, Madden PA, Manning AK, Männistö S, Marenne G, Marten J, Martin NG, Mazul AL, Meidtner K, Metspalu A, Mitchell P, Mohlke KL, Mook-Kanamori DO, Morgan A, Morris AD, Morris AP, Müller-Nurasyid M, Munroe PB, Nalls MA, Nauck M, Nelson CP, Neville M, Nielsen SF, Nikus K, Njølstad PR, Nordestgaard BG, Ntalla I, O'Connell JR, Oksa H, Loohuis LM, Ophoff RA, Owen KR, Packard CJ, Padmanabhan S, Palmer CN, Pasterkamp G, Patel AP, Pattie A, Pedersen O, Peissig PL, Peloso GM, Pennell CE, Perola M, Perry JA, Perry JR, Person TN, Pirie A, Polasek O, Posthuma D, Raitakari OT, Rasheed A, Rauramaa R, Reilly DF, Reiner AP, Renström F, Ridker PM, Rioux JD, Robertson N, Robino A, Rolandsson O, Rudan I, Ruth KS, Saleheen D, Salomaa V, Samani NJ, Sandow K, Sapkota Y, Sattar N, Schmidt MK, Schreiner PJ, Schulze MB, Scott RA, Segura-Lepe MP, Shah S, Sim X, Sivapalaratnam S, Small KS, Smith AV, Smith JA, Southam L, Spector TD, Speliotes EK, Starr JM, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Stumvoll M, Surendran P, 't Hart LM, Tansey KE, Tardif JC, Taylor KD, Teumer A, Thompson DJ, Thorsteinsdottir U, Thuesen BH, Tönjes A, Tromp G, Trompet S, Tsafantakis E, Tuomilehto J, Tybjaerg-Hansen A, Tyrer JP, Uher R, Uitterlinden AG, Ulivi S, van der Laan SW, Van Der Leij AR, van Duijn CM, van Schoor NM, van Setten J, Varbo A, Varga TV, Varma R, Edwards DR, Vermeulen SH, Vestergaard H, Vitart V, Vogt TF, Vozzi D, Walker M, Wang F, Wang CA, Wang S, Wang Y, Wareham NJ, Warren HR, Wessel J, Willems SM, Wilson JG, Witte DR, Woods MO, Wu Y, Yaghoobkar H, Yao J, Yao P, Yerges-Armstrong LM, Young R, Zeggini E, Zhan X, Zhang W, Zhao JH, Zhao W, Zhao W, Zheng H, Zhou W; EPIC-InterAct Consortium; CHD Exome+ Consortium; ExomeBP Consortium; T2D-Genes Consortium; GoT2D Genes Consortium; Global Lipids Genetics Consortium; ReproGen Consortium; MAGIC Investigators, Rotter JI, Boehnke M, Kathiresan S, McCarthy MI, Willer CJ, Stefansson K, Borecki IB, Liu DJ, North KE, Heard-Costa NL, Pers TH, Lindgren CM, Oxvig C, Kutalik Z, Rivadeneira F, Loos RJ,



Frayling TM, Hirschhorn JN, Deloukas P, Lettre G. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature*. 2017;542(7640):186-90.

39. Argente J. Avances clínico-moleculares en el diagnóstico de la talla baja. *Rev Esp Endocrinol Pediátrica* [Internet]. 2020 [cited 2021 ene 28];(11 Suppl). Available from: <https://doi.org/10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2020.Aug.591>
40. Tanner JM, Davies PS. Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children. *J Pediatr*. 1985;107(3):317-29.
41. Marino R, Hegde A, Barnes KM, Schrier L, Emons JA, Nilsson O, et al. Catch-up growth after hypothyroidism is caused by delayed growth plate senescence. *Endocrinology*. 2008;149(4):1820-8.
42. Lui JC, Nilsson O, Baron J. Growth plate senescence and catch-up growth. *Endocr Dev*. 2011;21:23-9.
43. Argente J. Challenges in the Management of Short Stature. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(1):2-10.
44. Wit JM, Kamp GA, Oostdijk W, on behalf of the Dutch Working Group on Triage and Diagnosis of Growth Disorders in Children . Towards a Rational and Efficient Diagnostic Approach in Children Referred for Growth Failure to the General Paediatrician. *Horm Res Paediatr*. 2019;91(4):223-40.
45. Marcdante KJ, Kliegman RM. Disorders of growth. En: Marcdante KJ, Kliegman RM. *Nelson Essentials of Pediatrics*. 8ª ed. Philadelphia: Elsevier; 2019. Chapter 6, 13-13.
46. Marcdante KJ, Kliegman RM. Short stature. En: Marcdante KJ, Kliegman RM. *Nelson Essentials of Pediatrics*. 8ª ed. Philadelphia: Elsevier; 2019. Chapter 173, 650-656.
47. Collett-Solberg PF, Ambler G, Backeljauw PF, Bidlingmaier M, Biller BMK, Boguszewski MCS, et al. Diagnosis, Genetics, and Therapy of Short Stature in Children: A Growth Hormone Research Society International Perspective. *Horm Res Paediatr*. 2019;92(1):1-14.
48. Savage MO, Storr HL, Backeljauw PF. The continuum between GH deficiency and GH insensitivity in children. *Rev Endocr Metab Disord*. 2021 Mar;22(1):91-99.
49. Burt MG, Ho KKY. Hypopituitarism and Growth Hormone Deficiency [Internet]. En: *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Elsevier; 2016 [citado 2021 feb 2]. p 188-208.e5. Disponible en:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323189071000111>)
50. Argente J, Tatton-Brown K, Lehwalder D, Pfäffle R. Genetics of Growth Disorders—Which Patients Require Genetic Testing? *Front Endocrinol*. 2019;10:602.
51. Mullis P-E. Genetics of GHRH, GHRH-receptor, GH and GH-receptor: its impact on pharmacogenetics. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(1):25-41.

52. Alatzoglou KS, Kular D, Dattani MT. Autosomal Dominant Growth Hormone Deficiency (Type II). *Pediatr Endocrinol Rev.* 2015;12(4):347-55.
53. Alangari A, Abobaker A, Kanegane H, Miyawaki T. X-linked lymphoproliferative disease associated with hypogammaglobulinemia and growth-hormone deficiency. *Eur J Pediatr.* 2006;165(3):165-7.
54. Argente J, Flores R, Gutiérrez-Arumí A, Verma B, Martos-Moreno GÁ, Cuscó I, et al. Defective minor spliceosome mRNA processing results in isolated familial growth hormone deficiency. *EMBO Mol Med.* 2014;6(3):299-306.
55. Kowarski AA, Schneider J, Ben-Galim E, Weldon VV, Daughaday WH. Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978;47(2):461-4.
56. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson ICAF, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev.* 2009;30(7):790-829.
57. Fang Q, George AS, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Gergics P, Cheung LYM, et al. Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era. *Endocr Rev.* 2016;37(6):636-75.
58. Laron Z, Blum W, Chatelain P, Ranke M, Rosenfeld R, Savage M, et al. Classification of growth hormone insensitivity syndrome. *J Pediatr.* 1993;122(2):241.
59. Hwa V, Camacho-Hübner C, Little BM, David A, Metherell LA, El-Khatib N, et al. Growth hormone insensitivity and severe short stature in siblings: a novel mutation at the exon 13-intron 13 junction of the STAT5b gene. *Horm Res.* 2007;68(5):218-24.
60. Walenkamp MJE, Losekoot M, Wit JM. Molecular IGF-1 and IGF-1 receptor defects: from genetics to clinical management. *Endocr Dev.* 2013;24:128-37.
61. Begemann M, Zirn B, Santen G, Wirthgen E, Soellner L, Büttel H-M, et al. Paternally Inherited IGF2 Mutation and Growth Restriction. *N Engl J Med.* 2015;373(4):349-56.
62. Dauber A, Muñoz-Calvo MT, Barrios V, Domené HM, Kloverpris S, Serra-Juhé C, et al. Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF-I availability. *EMBO Mol Med.* 2016;8(4):363-74.
63. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, et al. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4210-7.
64. Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH, Cohen P. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18(2):89-110.

65. Jee YH, Baron J, Nilsson O. New developments in the genetic diagnosis of short stature. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(4):541-7.
66. Wood AR, Esko T, Yang J, Vedantam S, Pers TH, Gustafsson S, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet*. 2014;46(11):1173-86.
67. Cohen LE. Idiopathic short stature: a clinical review. *JAMA*. 2014;311(17):1787-96.
68. Kelnar CJH. Idiopathic short stature: considerations from the clinic--the viewpoint of the paediatric endocrinologist. *Horm Res Paediatr*. 2011;76Suppl 3:35-7.
69. Spranger JW, Brill PW, Nishimura G, Superti-Furga A, Unger S. *Bone dysplasias An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development*. 3<sup>a</sup> ed. New York, USA: Oxford university Press; 2012.
70. Superti-Furga A. Significant clinical benefits of molecular studies in the skeletal dysplasias. *Am J Med Genet A*. 2015;167(3):476-7.
71. Unger S, Superti-Furga A, Rimoin DL. A Diagnostic Approach to Skeletal Dysplasias. En: Glorieux F, Pettifor J, Jüppner H. *Pediatric Bone*, 2<sup>a</sup> ed. USA: Elsevier; 2003. p 375-401.
72. Sentchordi Montané L, Heath K. Displasias esqueléticas. En: Guerrero-Fdez J (Ed), *Endocrinopedía, Manual de Diagnóstico y Terapéutica en Endocrinología Pediátrica*. Madrid: 2016. [acceso 02 de Agosto de 2021]. Disponible en: <http://www.webpediatria.com/endocrinoped/endocrinopedia.php>".
73. Alanay Y, Lachman RS. A review of the principles of radiological assessment of skeletal dysplasias. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2011;3(4):163-78.
74. Rimoin DL, Lachman R, Unger S. Chondrodysplasias. En: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz R. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. 4<sup>a</sup> ed. Edinburgh, Scotland: Churchill-Livingstone; 2002. p 4071-4115.
75. Mortier GR. The diagnosis of skeletal dysplasias: a multidisciplinary approach. *Eur J Radiol*. 2001;40(3):161-7.
76. Savarirayan R, Rimoin DL. The skeletal dysplasias. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002;16(3):547-60.
77. Lachman RS. *Taybi and Lachman's Radiology of Syndromes, Metabolic Disorders and Skeletal Dysplasias*. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier; 2007.
78. Panda A. Skeletal dysplasias: A radiographic approach and review of common non-lethal skeletal dysplasias. *World J Radiol*. 2014;6(10):808.
79. Offiah AC, Hall CM. Radiological diagnosis of the constitutional disorders of bone. As easy as A, B, C? *Pediatr Radiol* 2003;33(3):153-61.

80. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet.* 1997;16(1):54-63.
81. Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, et al. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet.* 1998;19(1):67-9.
82. Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, et al. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet.* 1998;19(1):70-3.
83. Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9(5):695-702.
84. Marchini A, Ogata T, Rappold GA. A Track Record on SHOX: From Basic Research to Complex Models and Therapy. *Endocr Rev.* 2016;37(4):417-48.
85. Binder G, Rappold GA. SHOX Deficiency Disorders. 2005 Dec 12 [Updated 2018 Jun 28]. en: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*<sup>®</sup> [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1215/>
86. Binder G. Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Horm Res Paediatr.* 2011;75(2):81-9.
87. Ross JL, Scott C, Marttila P, Kowal K, Nass A, Papenhausen P, et al. Phenotypes Associated with SHOX Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5674-80.
88. Binder G, Ranke MB, Martin DD. Auxology Is a Valuable Instrument for the Clinical Diagnosis of SHOX Haploinsufficiency in School-Age Children with Unexplained Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4891-6.
89. Malaquias AC, Scalco RC, Fontenele EGP, Costalonga EF, Baldin AD, Braz AF, et al. The sitting height/height ratio for age in healthy and short individuals and its potential role in selecting short children for SHOX analysis. *Horm Res Paediatr.* 2013;80(6):449-56.
90. Madelung, V. Die spontane subluxation der Hand nach Vorne. *Arch Klin Chir.* 1878;23:395-412.
91. Langer LO. Dyschondrosteosis, a hereditary bone dysplasia with characteristic roentgenographic features. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1965;95:178-88.
92. Munns CFJ, Glass IA, Flanagan S, Hayes M, Williams B, Berry M, et al. Familial growth and skeletal features associated with SHOX haploinsufficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003;16(7):987-96.

93. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, et al. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet.* 2007;44(5):306-13.
94. Rosilio M, Huber-Lequesne C, Sapin H, Carel J-C, Blum WF, Cormier-Daire V. Genotypes and Phenotypes of Children with SHOX Deficiency in France. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7):E1257-65.
95. Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, et al. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(35):37103-14.
96. Xie Y, Zhou S, Chen H, Du X, Chen L. Recent research on the growth plate: Advances in fibroblast growth factor signaling in growth plate development and disorders. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(1):T11-34.
97. Decker E, Durand C, Bender S, Rödelsperger C, Glaser A, Hecht J, et al. FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet.* 2011;20(8):1524-35.
98. Durand C, Bangs F, Signolet J, Decker E, Tickle C, Rappold G. Enhancer elements upstream of the SHOX gene are active in the developing limb. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(5):527-32.
99. Marchini A, Häcker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, et al. BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet.* 2007;16(24):3081-7.
100. Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchón A, et al. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet.* 2011;20(8):1547-59.
101. Aza-Carmona M, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchón A, Gorbenko-del Blanco D, Rodriguez JJ, et al. NPPB and ACAN, two novel SHOX2 transcription targets implicated in skeletal development. *PloS One.* 2014;9(1):e83104.
102. Marchini A, Rappold G, Schneider KU. SHOX at a glance: from gene to protein. *Arch Physiol Biochem.* 2007;113(3):116-23.
103. Decker E, Durand C, Bender S, Rödelsperger C, Glaser A, Hecht J, et al. FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet.* 2011;20(8):1524-35.
104. Beiser KU, Glaser A, Kleinschmidt K, Scholl I, Röth R, Li L, et al. Identification of novel SHOX target genes in the developing limb using a transgenic mouse model. *PloS One.* 2014;9(6):e98543.
105. Bobick BE, Cobb J. Shox2 regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb. *J Cell Sci.* 2012;125(24):6071-83.

106. Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchón A, et al. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet.* 2011;20(8):1547-59.
107. Foldynova-Trantirkova S, Wilcox WR, Krejci P. Sixteen years and counting: the current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in skeletal dysplasias. *Hum Mutat.* 2012;33(1):29-41.
108. Blaschke RJ, Töpfer C, Marchini A, Steinbeisser H, Janssen JWG, Rappold GA. Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J Biol Chem.* 2003;278(48):47820-6.
109. Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Rodríguez-Estevéz A, Rica-Etxebarria I, Gracia R, Campos-Barros Á, et al. Identification of the first PAR1 deletion encompassing upstream SHOX enhancers in a family with idiopathic short stature. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(1):125-7.
110. Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Röth R, Weiss B, Steinberger D, et al. Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet.* 2009;46(12):834-9.
111. Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, del Blanco DG, Aza-Carmona M, Crolla JA, et al. A Novel Class of Pseudoautosomal Region 1 Deletions Downstream of SHOX Is Associated with Léri-Weill Dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet.* 2005;77(4):533-44.
112. Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet.* 2006;78(1):167-70.
113. Verdin H, Fernández-Miñán A, Benito-Sanz S, Janssens S, Callewaert B, De Waele K, et al. Profiling of conserved non-coding elements upstream of SHOX and functional characterisation of the SHOX cis-regulatory landscape. *Sci Rep.* 2015;5:17667.
114. Schneider KU, Marchini A, Sabherwal N, Röth R, Niesler B, Marttila T, et al. Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat.* 2005;26(1):44-52.
115. Barca-Tierno V, Aza-Carmona M, Barroso E, Heine-Suner D, Azmanov D, Rosell J, et al. Identification of a Gypsy SHOX mutation (p.A170P) in Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(12):1218-25.
116. Huber C, Cusin V, Le Merrer M, Mathieu M, Sulmont V, Dagoneau N, et al. SHOX point mutations in dyschondrosteosis. *J Med Genet.* 2001;38(5):323.

117. Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, Rosell J, et al. Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):E404-412.
118. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V, French SHOX GeNeSIS Module. High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet.* 2006;43(9):735-9.
119. Blum WF, Crowe BJ, Quigley CA, Jung H, Cao D, Ross JL, et al. Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):219-28.
120. Child CJ, Kalifa G, Jones C, Ross JL, Rappold GA, Quigley CA, et al. Radiological Features in Patients with Short Stature Homeobox-Containing (**SHOX**) Gene Deficiency and Turner Syndrome before and after 2 Years of GH Treatment. *Horm Res Paediatr.* 2015;84(1):14-25.
121. Peymani A, Johnson AR, Dowlatshahi AS, Dobbe JGG, Lin SJ, Upton J, et al. Surgical Management of Madelung Deformity: A Systematic Review. *Hand (N Y).* 2019;14(6):725-34.
122. Vickers D, Nielsen G. Madelung deformity: surgical prophylaxis (physiolysis) during the late growth period by resection of the dyschondrosteosis lesion. *J Hand Surg Br.* 1992;17(4):401-7.
123. Schmidt-Rohlfing B, Schwöbel B, Pauschert R, Niethard FU. Madelung deformity: clinical features, therapy and results. *J Pediatr Orthop B.* 2001;10(4):344-8.
124. Bober MB, Bellus GA, Nikkel SM, et al. Hypochondroplasia. 1999 Jul 15 [Updated 2020 May 7]. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1477/>
125. Kant SG, Cervenkova I, Balek L, Trantirek L, Santen GWE, de Vries MC, et al. A novel variant of FGFR3 causes proportionate short stature. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(6):763-70.
126. Regelman MO, Rapaport R. Growth Hormone Treatment in Patients with Hypochondroplasia. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(6):353-4.
127. Xue Y, Sun A, Mekikian PB, Martin J, Rimoin DL, Lachman RS, et al. FGFR3 mutation frequency in 324 cases from the International Skeletal Dysplasia Registry. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;2(6):497-503.
128. Dennis EP, Greenhalgh-Maychell PL, Briggs MD. Multiple epiphyseal dysplasia and related disorders: Molecular genetics, disease mechanisms, and therapeutic avenues. *Dev Dyn.* 2021;250(3):345-59.

129. Al Kaissi A, Ghachem MB, Nabil NM, Kenis V, Melchenko E, Morenko E, et al. Schmid's Type of Metaphyseal Chondrodysplasia: Diagnosis and Management. *Orthop Surg*. 2018;10(3):241-6.
130. Savarirayan R, Thompson E, Gécz J. Spondyloepiphyseal dysplasia tarda (SEDL, MIM #313400). *Eur J Hum Genet*. 2003;11(9):639-42.
131. Savage MO, Backeljauw PF, Calzada R, Cianfarani S, Dunkel L, Koledova E, et al. Early Detection, Referral, Investigation, and Diagnosis of Children with Growth Disorders. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(5):325-32.
132. Mintz CS, Seaver LH, Irons M, Grimberg A, Lozano R; ACMG Professional Practice and Guidelines Committee. Focused Revision: ACMG practice resource: Genetic evaluation of short stature. *Genet Med*. 2021 May;23(5):813-815.
133. Seaver LH, Irons M; American College of Medical Genetics (ACMG) Professional Practice and Guidelines Committee. ACMG practice guideline: genetic evaluation of short stature. *Genet Med*. 2009;11(6):465-70.
134. Argente J. Challenges in the Management of Short Stature. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(1):2-10.
135. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333-51.
136. Gopal VV, Roop H, Carpenter NJ. Diagnosis of microdeletion syndromes: high-resolution chromosome analysis versus fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Sci*. 1995;309(4):208-12.
137. Malan V, Romana S. Diagnostic des anomalies chromosomiques par CGH array en pathologie constitutionnelle : la fin du caryotype en première intention [Diagnosis of chromosomal abnormalities by array CGH in constitutional pathology: the end of the first-line karyotype]. *Arch Pediatr*. 2012 Apr;19(4):437-42.
138. Eijk-Van Os PGC, Schouten JP. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA<sup>®</sup>) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *Methods Mol Biol*. 2011;688:97-126.
139. Homma TK, Krepischi ACV, Furuya TK, Honjo RS, Malaquias AC, Bertola DR, et al. Recurrent Copy Number Variants Associated with Syndromic Short Stature of Unknown Cause. *Horm Res Paediatr*. 2018;89(1):13-21.
140. Ammerpohl O, Martín-Subero JI, Richter J, Vater I, Siebert R. Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(9):847-62.



141. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, Vijzelaar RNCP, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(14):e128.
142. Mantovani G, Bastepe M, Monk D, de Sanctis L, Thiele S, Usardi A, et al. Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders: first international Consensus Statement. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(8):476-500.
143. Martos-Moreno GÁ, Lecumberri B, Pérez de Nanclares G. Implicaciones en pediatría del primer consenso internacional para el diagnóstico y asistencia a pacientes con pseudohipoparatiroidismo y enfermedades relacionadas [Implication in Paediatrics of the First International Consensus Statement for the Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders]. *An Pediatr (Engl Ed).* 2019;90(2):125.e1-125.e12.
144. Adams DR, Eng CM. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *N Engl J Med.* 2018;379(14):1353-62.
145. Lapunzina P, López RO, Rodríguez-Laguna L, García-Miguel P, Martínez AR, Martínez-Glez V. Impact of NGS in the medical sciences: genetic syndromes with an increased risk of developing cancer as an example of the use of new technologies. *Genet Mol Biol.* 2014;37(1Suppl):241-9.
146. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24.
147. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, Kobayashi Y, Patil N, Thusberg J, Westbrook M; Invitae Clinical Genomics Group, Topper S. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med.* 2017 Oct;19(10):1105-1117.
148. Priest JR. A primer to clinical genome sequencing. *Curr Opin Pediatr.* 2017;29(5):513-9.
149. van El CG, Cornel MC, Borry P, Hastings RJ, Fellmann F, Hodgson SV, Howard HC, Cambon-Thomsen A, Knoppers BM, Meijers-Heijboer H, Scheffer H, Tranebjaerg L, Dondorp W, de Wert GM; ESHG Public and Professional Policy Committee. Whole-genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet.* 2013 Jun;21(6):580-4.

150. Domené S, Scaglia PA, Gutiérrez ML, Domené HM. Applying Bioinformatic Platforms, In Vitro, and In Vivo Functional Assays in the Characterization of Genetic Variants in the GH/IGF Pathway Affecting Growth and Development. *Cells*. 2021;10(8):2063.
151. Nilsson O, Guo MH, Dunbar N, Popovic J, Flynn D, Jacobsen C, et al. Short Stature, Accelerated Bone Maturation, and Early Growth Cessation Due to Heterozygous Aggrecan Mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):E1510-8.
152. Dauber A. Genetic Testing for the Child With Short Stature—Has the Time Come To Change Our Diagnostic Paradigm? *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(7):2766-9.
153. Carcavilla A, Suárez-Ortega L, Rodríguez Sánchez A, Gonzalez-Casado I, Ramón-Krauel M, Labarta JI, Quinteiro Gonzalez S, Riaño Galán I, Ezquieta Zubicaray B, López-Siguero JP. Síndrome de Noonan: actualización genética, clínica y de opciones terapéuticas [Noonan syndrome: genetic and clinical update and treatment options]. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2020 ;93(1):61.e1-61.e14.
154. Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, et al. Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics*. 2010;126(4):746-59.
155. van der Burgt I. Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:4.
156. Malaquias AC, Jorge AAL. Activation of the MAPK pathway (RASopathies) and partial growth hormone insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*. 2021;519:111040.
157. Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, O'Connell SM, Salem J, Blik J, et al. Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(2):105-24.
158. Bartels CF, Bükülmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, et al. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet*. 2004;75(1):27-34.
159. Olney RC, Bükülmez H, Bartels CF, Prickett TCR, Espiner EA, Potter LR, et al. Heterozygous Mutations in Natriuretic Peptide Receptor-B ( *NPR2* ) Are Associated with Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1229-32.
160. Vasques GA, Amano N, Docko AJ, Funari MFA, Quedas EPS, Nishi MY, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B ( *NPR2* ) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):E1636-1644.
161. Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, Belinchón A, Barreda-Bonis AC, Vasques GA, et al. Heterozygous *NPR2* Mutations Cause Disproportionate Short Stature, Similar to Léri-Weill Dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(8):E1133-1142.

162. Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, Edmund AB, Robinson JW, Olney RC, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat.* 2015;36(4):474-81.
163. Vasques GA, Arnhold IJP, Jorge AAL. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(4):222-9.
164. Kang MJ. Novel genetic cause of idiopathic short stature. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;22(3):153-7.
165. Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, Petruzalkova L, Zemkova D, Elblova L, et al. NPR2 Variants Are Frequent among Children with Familiar Short Stature and Respond Well to Growth Hormone Therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):e746-52.
166. Miura K, Namba N, Fujiwara M, Ohata Y, Ishida H, Kitaoka T, et al. An Overgrowth Disorder Associated with Excessive Production of cGMP Due to a Gain-of-Function Mutation of the Natriuretic Peptide Receptor 2 Gene. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e42180.
167. Hannema SE, van Duyvenvoorde HA, Prensler T, Yang R-B, Mueller TD, Gassner B, et al. An activating mutation in the kinase homology domain of the natriuretic peptide receptor-2 causes extremely tall stature without skeletal deformities. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(12):E1988-1998.
168. Hisado-Oliva A, Ruzafa-Martin A, Sentchordi L, Funari MFA, Bezanilla-López C, Alonso-Bernáldez M, et al. Mutations in C-natriuretic peptide (NPPC): a novel cause of autosomal dominant short stature. *Genet Med.* 2018;20(1):91-7.
169. Estrada K, Krawczak M, Schreiber S, van Duijn K, Stolk L, van Meurs JBJ, et al. A genome-wide association study of northwestern Europeans involves the C-type natriuretic peptide signaling pathway in the etiology of human height variation. *Hum Mol Genet.* 2009;18(18):3516-24.
170. Tassano E, Buttgerit J, Bader M, Lerone M, Divizia MT, Bocciardi R, et al. Genotype-Phenotype Correlation of 2q37 Deletions Including NPPC Gene Associated with Skeletal Malformations. *PloS One.* 2013;8(6):e66048.
171. Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am J Med Genet A.* 2019;179(12):2393-419.
172. Gleghorn L, Ramesar R, Beighton P, Wallis G. A Mutation in the Variable Repeat Region of the Aggrecan Gene (AGC1) Causes a Form of Spondyloepiphyseal Dysplasia Associated with Severe, Premature Osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2005;77(3):484-90.

173. Tompson SW, Merriman B, Funari VA, Fresquet M, Lachman RS, Rimoin DL, et al. A Recessive Skeletal Dysplasia, SEMD Aggrecan Type, Results from a Missense Mutation Affecting the C-Type Lectin Domain of Aggrecan. *Am J Hum Genet.* 2009;84(1):72-9.
174. Stattin E-L, Wiklund F, Lindblom K, Önnarfjord P, Jonsson B-A, Tegner Y, et al. A Missense Mutation in the Aggrecan C-type Lectin Domain Disrupts Extracellular Matrix Interactions and Causes Dominant Familial Osteochondritis Dissecans. *Am J Hum Genet.* 2010;86(2):126-37.
175. Quintos JB, Guo MH, Dauber A. Idiopathic short stature due to novel heterozygous mutation of the aggrecan gene. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015;28(7-8).
176. Gkourogiani A, Andrew M, Tyzinski L, Crocker M, Douglas J, Dunbar N, et al. Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(2):460-469.
177. Hauer NN, Sticht H, Boppudi S, Büttner C, Kraus C, Trautmann U, et al. Genetic screening confirms heterozygous mutations in ACAN as a major cause of idiopathic short stature. *Sci Rep.* 2017;7(1):12225.
178. Hu X, Gui B, Su J, Li H, Li N, Yu T, et al. Novel pathogenic ACAN variants in non-syndromic short stature patients. *Clin Chim Acta.* 2017;469:126-9.
179. van der Steen M, Pfundt R, Maas SJWH, Bakker-van Waarde WM, Odink RJ, Hokken-Koelega ACS. ACAN Gene Mutations in Short Children Born SGA and Response to Growth Hormone Treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(5):1458-67.
180. Collett-Solberg PF, Jorge AAL, Boguszewski MCS, Miller BS, Choong CSY, Cohen P, et al. Growth hormone therapy in children; research and practice - A review. *Growth Horm IGF Res.* 2019 Feb;44:20-32.
181. Grimberg A, DiVall SA, Polychronakos C, Allen DB, Cohen LE, Quintos JB, et al. Guidelines for Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Treatment in Children and Adolescents: Growth Hormone Deficiency, Idiopathic Short Stature, and Primary Insulin-Like Growth Factor-I Deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2016;86(6):361-97.
182. Säwendahl L, Polak M, Backeljauw P, Blair J, Miller BS, Rohrer TR, et al. Treatment of Children With GH in the United States and Europe: Long-Term Follow-Up From NordiNet® IOS and ANSWER Program. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(10):4730-42.
183. Miller BS, Velazquez E, Yuen KCJ. Long-Acting Growth Hormone Preparations - Current Status and Future Considerations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(6):dgz149.
184. Collett-Solberg PF, Ambler G, Backeljauw PF, Bidlingmaier M, Biller BMK, Boguszewski MCS, et al. Diagnosis, Genetics, and Therapy of Short Stature in Children: A Growth Hormone Research Society International Perspective. *Horm Res Paediatr.* 2019;92(1):1-14.

185. Harada D, Namba N, Hanioka Y, Ueyama K, Sakamoto N, Nakano Y, et al. Final adult height in long-term growth hormone-treated achondroplasia patients. *Eur J Pediatr*. 2017;176(7):873-9.
186. Pinto G, Cormier-Daire V, Le Merrer M, Samara-Boustani D, Baujat G, Fresneau L, et al. Efficacy and Safety of Growth Hormone Treatment in Children with Hypochondroplasia: Comparison with an Historical Cohort. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(6):355-63.
187. Ranke MB, Savage MO, Chatelain PG, Preece MA, Rosenfeld RG, Blum WF, et al. Insulin-like growth factor I improves height in growth hormone insensitivity: two years' results. *Horm Res*. 1995;44(6):253-64.
188. Chernausek SD, Backeljauw PF, Frane J, Kuntze J, Underwood LE, GH Insensitivity Syndrome Collaborative Group. Long-term treatment with recombinant insulin-like growth factor (IGF)-I in children with severe IGF-I deficiency due to growth hormone insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):902-10.
189. Bang P, Woelfle J, Perrot V, Sert C, Polak M. Effectiveness and safety of rhIGF1 therapy in patients with or without Laron syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2021;184(2):267-76.
190. Bang P, Polak M, Woelfle J, Houchard A, EU IGFD Registry Study Group. Effectiveness and Safety of rhIGF-1 Therapy in Children: The European Increlex® Growth Forum Database Experience. *Horm Res Paediatr*. 2015;83(5):345-57.
191. Backeljauw PF, Miller BS, Dutailly P, Houchard A, Lawson E, Hale DE, et al. Recombinant human growth hormone plus recombinant human insulin-like growth factor-1 coadministration therapy in short children with low insulin-like growth factor-1 and growth hormone sufficiency: results from a randomized, multicenter, open-label, parallel-group, active treatment-controlled trial. *Horm Res Paediatr*. 2015;83(4):268-79.
192. Carel J-C, Eugster EA, Rogol A, Ghizzoni L, Palmert MR, ESPE-LWPES GnRH Analogs Consensus Conference Group, et al. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children. *Pediatrics*. 2009;123(4):e752-762.
193. Mericq MV, Eggers M, Avila A, Cutler GB, Cassorla F. Near final height in pubertal growth hormone (GH)-deficient patients treated with GH alone or in combination with luteinizing hormone-releasing hormone analog: results of a prospective, randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(2):569-73.
194. Wickman S, Sipilä I, Ankarberg-Lindgren C, Norjavaara E, Dunkel L. A specific aromatase inhibitor and potential increase in adult height in boys with delayed puberty: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001 Jun 2;357(9270):1743-8.
195. Hosny GA. Limb lengthening history, evolution, complications and current concepts. *J Orthop Traumatol*. 2020;21(1):3.

196. Donaldson J, Aftab S, Bradish C. Achondroplasia and limb lengthening: Results in a UK cohort and review of the literature. *J Orthop*. 2015;12(1):31-4.
197. Paley D. Extensive Limb Lengthening for Achondroplasia and Hypochondroplasia. *Children*. 2021; 8(7):540.
198. Sabir AH, Cole T. The evolving therapeutic landscape of genetic skeletal disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):300.
199. Marzin P, Cormier-Daire V. New perspectives on the treatment of skeletal dysplasia. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2020;11:2042018820904016.
200. Semler O, Rehberg M, Mehdiani N, Jackels M, Hoyer-Kuhn H. Current and Emerging Therapeutic Options for the Management of Rare Skeletal Diseases. *Paediatr Drugs*. 2019;21(2):95-106.
201. Pauli RM. Achondroplasia: a comprehensive clinical review. *Orphanet J Rare Dis* 2019;14(1):1.
202. Legeai-Mallet L, Savarirayan R. Novel therapeutic approaches for the treatment of achondroplasia. *Bone*. 2020;141:115579.
203. Savarirayan R, Irving M, Bacino CA, Bostwick B, Charrow J, Cormier-Daire V, et al. C-Type Natriuretic Peptide Analogue Therapy in Children with Achondroplasia. *N Engl J Med*. 2019;381(1):25-35.
204. Hoyer-Kuhn H, Schönau E. Pharmacotherapy in Rare Skeletal Diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2020;261:87-104.
205. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3080-92.
206. Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M, van Duyvenvoorde HA, Ruivenkamp CAL, Kant SG. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(4):R145-173.
207. Liang H, Miao H, Pan H, Yang H, Gong F, Duan L, et al. Growth-Promoting Therapies May Be Useful In Short Stature Patients With Nonspecific Skeletal Abnormalities Caused By Acan Heterozygous Mutations: Six Chinese Cases And Literature Review. *Endocr Pract*. 2020;26(11):1255-68.
208. Lin L, Li M, Luo J, Li P, Zhou S, Yang Y, et al. A high proportion of novel ACAN mutations and their prevalence in a large cohort of Chinese short stature children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(7):e2711-e2719
209. Tatsi C, Gkourogianni A, Mohnike K, DeArment D, Witchel S, Andrade AC, et al. Aggrecan Mutations in Nonfamilial Short Stature and Short Stature Without Accelerated Skeletal Maturation. *J Endocr Soc*. 2017;1(8):1006-1011.

210. Gregersen PA, Savarirayan R. Type II Collagen Disorders Overview [Internet]. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Mirzaa G, et al., editores. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 2021 jun 7]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540447/>
211. Fan X, Zhao S, Yu C, Wu D, Yan Z, Fan L, Song Y, Wang Y, Li C, Ming Y, Gui B, Niu Y, Li X, Yang X, Luo S, Zhang Q, Zhao X, Pan H, Li M, Xia W, Qiu G, Liu P, Zhang S, Zhang J, Wu Z; Deciphering Disorders Involving Scoliosis and COmorbidities (DISCO) study, Lupski JR, Posey JE, Chen S, Gong C, Wu N. Exome sequencing reveals genetic architecture in patients with isolated or syndromic short stature. *J Genet Genomics*. 2021;48(5):396-402.
212. Perchard R, Murray PG, Payton A, Highton GL, Whatmore A, Clayton PE. Novel Mutations and Genes That Impact on Growth in Short Stature of Undefined Aetiology: The EPIGROW Study. *J Endocr Soc*. 2020;4(10):bvaa105.
213. Freire BL, Homma TK, Funari MFA, Lerario AM, Vasques GA, Malaquias AC, et al. Multigene Sequencing Analysis of Children Born Small for Gestational Age With Isolated Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(6):2023-30.
214. Hattori A, Katoh-Fukui Y, Nakamura A, Matsubara K, Kamimaki T, Tanaka H, et al. Next generation sequencing-based mutation screening of 86 patients with idiopathic short stature. *Endocr J*. 2017;64(10):947-54.
215. Hauer NN, Popp B, Schoeller E, Schuhmann S, Heath KE, Hisado-Oliva A, et al. Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genet Med* 2018;20(6):630-8.
216. Yang L, Zhang C, Wang W, Wang J, Xiao Y, Lu W, et al. Pathogenic gene screening in 91 Chinese patients with short stature of unknown etiology with a targeted next-generation sequencing panel. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):212.
217. Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, et al. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet*. 2001;28(4):386-8.
218. Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, Aza-Carmona M, Sentchordi-Montané L, Barraza-García J, et al. IHH Gene Mutations Causing Short Stature With Nonspecific Skeletal Abnormalities and Response to Growth Hormone Therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(2):604-14.
219. Gerver WJM, Gkourogianni A, Dauber A, Nilsson O, Wit JM. Arm Span and Its Relation to Height in a 2- to 17-Year-Old Reference Population and Heterozygous Carriers of ACAN Variants. *Horm Res Paediatr*. 2020;93(3):164-72.

220. Fredriks AM. Nationwide age references for sitting height, leg length, and sitting height/height ratio, and their diagnostic value for disproportionate growth disorders. *Arch Dis Child*. 2005;90(8):807-12.
221. Gerver WJ, de Bruin R. *Paediatric morphometrics: a reference manual*. 2<sup>a</sup> ed. Maastricht: University Press Maastricht; 2001.
222. Legeai-Mallet L, Munnich A, Maroteaux P, Le Merrer M. Incomplete penetrance and expressivity skewing in hereditary multiple exostoses. *Clin Genet*. 1997;52(1):12-6.
223. Temtamy SA, Aglan MS. Brachydactyly. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3(1):15.
224. Lapunzina P, Aiello H. *Manual de Antropometría Normal y Patológica: fetal, neonatal, niños y adultos*. 1<sup>a</sup> ed. Barcelona: Masson; 2002.
225. Greulich WW, Pyle S I. *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. Stanford: Stanford University Press; 1959.
226. Chavhan GB, Miller E, Mann EH, Miller SF. Twenty classic hand radiographs that lead to diagnosis. *Pediatr Radiol*. 2010;40(5):747-61.
227. Jackson GC, Mittaz-Crettol L, Taylor JA, Mortier GR, Spranger J, Zabel B, et al. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: A 7-year comprehensive analysis of the known disease genes identify novel and recurrent mutations and provides an accurate assessment of their relative contribution. *Hum Mutat*. 2012;33(1):144-57.
228. Mantovani G, Bastepe M, Monk D, de Sanctis L, Thiele S, Usardi A, et al. Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders: first international Consensus Statement. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(8):476-500.
229. Pereda A, Garin I; Spanish Network for Imprinting Disorders, Perez de Nanclares G. What to consider when pseudohypoparathyroidism is ruled out: iPPSD and differential diagnosis. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):32.
230. Capelli S, Donghi V, Maruca K, Vezzoli G, Corbetta S, Brandi ML, et al. Clinical and molecular heterogeneity in a large series of patients with hypophosphatemic rickets. *Bone*. 2015;79:143-9.
231. Elliott AM, Field FM, Rimoin DL, Lachman RS. Hand involvement in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Am J Med Genet A*. 2005;132A(2):191-3.
232. Uchida N, Shibata H, Nishimura G, Hasegawa T. A novel mutation in the ACAN gene in a family with autosomal dominant short stature and intervertebral disc disease. *Hum Genome Var*. 2020;7(1):44.
233. Wei M, Ying Y, Li Z, Weng Y, Luo X. Identification of novel ACAN mutations in two Chinese families and genotype-phenotype correlation in patients with 74 pathogenic ACAN variations. *Mol Genet Genomic Med*. 2021;9(11):e1823.



234. Stavber L, Hovnik T, Kotnik P, Lovrečić L, Kovač J, Tesovnik T, et al. High frequency of pathogenic ACAN variants including an intragenic deletion in selected individuals with short stature. *Eur J Endocrinol*. 2020;182(3):243-53.
235. Dateki S, Nakatomi A, Watanabe S, Shimizu H, Inoue Y, Baba H, Yoshiura KI, Moriuchi H. Identification of a novel heterozygous mutation of the Aggrecan gene in a family with idiopathic short stature and multiple intervertebral disc herniation. *J Hum Genet*. 2017;62(7):717-721.
236. Liang H, Miao H, Pan H, Yang H, Gong F, Duan L, Chen S, Wang L, Zhu H. Growth-Promoting Therapies May Be Useful In Short Stature Patients With Nonspecific Skeletal Abnormalities Caused By Acan Heterozygous Mutations: Six Chinese Cases And Literature Review. *Endocr Pract*. 2020;26(11):1255-1268.
237. Savarirayan R, Bompadre V, Bober MB, Cho T-J, Goldberg MJ, Hoover-Fong J, et al. Best practice guidelines regarding diagnosis and management of patients with type II collagen disorders. *Genet Med*. 2019;21(9):2070-80.
238. Stevens CA. Rubinstein-Taybi Syndrome [Internet]. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Mirzaa G, et al., editores. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 2021 jun 7]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1526/>
239. Pacifici M. Hereditary Multiple Exostoses: New Insights into Pathogenesis, Clinical Complications, and Potential Treatments. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(3):142-52.
240. Säwendahl L, Polak M, Backeljauw P, Blair J, Miller BS, Rohrer TR, et al. Treatment of Children With GH in the United States and Europe: Long-Term Follow-Up From NordiNet® IOS and ANSWER Program. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(10):4730-42.
241. Soriano-Guillén L, Argente J. Talla baja idiopática y tratamiento con hormona de crecimiento biosintética: reflexiones clínicas y éticas ante un diagnóstico arbitrario [Idiopathic short stature and treatment with biosynthetic growth hormone: clinical and ethical reflections on an arbitrary diagnosis]. *An Pediatr (Barc)*. 2012 Feb;76(2):53-7.
242. Rosenfeld RG. How aggressively should we treat short stature? *Horm Res Paediatr*. 2015;83(4):280-1.
243. Wit JM, Oostdijk W. Novel approaches to short stature therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(3):353-66.
244. Sabir AH, Cole T. The evolving therapeutic landscape of genetic skeletal disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):300.

245. Ma G, Yu J, Xiao Y, Chan D, Gao B, Hu J, et al. Indian hedgehog mutations causing brachydactyly type A1 impair Hedgehog signal transduction at multiple levels. *Cell Res*. 2011;21(9):1343-57.
246. Gao B, Hu J, Stricker S, Cheung M, Ma G, Law KF, et al. A mutation in *Ihh* that causes digit abnormalities alters its signalling capacity and range. *Nature*. 2009;458(7242):1196-200.
247. Will AJ, Cova G, Osterwalder M, Chan W-L, Wittler L, Brieske N, et al. Composition and dosage of a multipartite enhancer cluster control developmental expression of *Ihh* (Indian hedgehog). *Nat Genet*. 2017;49(10):1539-45.
248. Shen L, Ma G, Shi Y, Ruan Y, Yang X, Wu X, et al. p.E95K mutation in Indian hedgehog causing brachydactyly type A1 impairs IHH/Gli1 downstream transcriptional regulation. *BMC Genet*. 2019;20(1):10.
249. Mintz CS, Seaver LH, Irons M, Grimberg A, Lozano R; ACMG Professional Practice and Guidelines Committee. Focused Revision: ACMG practice resource: Genetic evaluation of short stature. *Genet Med*. 2021 May;23(5):813-815.
250. Knutsen EJ, Goldfarb CA. Madelung's Deformity. *Hand (N Y)*. 2014 Sep;9(3):289-91.
251. Ali S, Kaplan S, Kaufman T, Fenerty S, Kozin S, Zlotolow DA. Madelung deformity and Madelung-type deformities: a review of the clinical and radiological characteristics. *Pediatr Radiol*. 2015;45(12):1856-63.
252. Sanchez J, Perera E, Jan de Beur S, Ding C, Dang A, Berkovitz GD, et al. Madelung-like deformity in pseudohypoparathyroidism type 1b. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(9):E1507-1511.
253. Schiller S, Spranger S, Schechinger B, Fukami M, Merker S, Drop SL, et al. Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Léri-Weill syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2000;8(1):54-62.
254. Tiecke E, Bangs F, Blaschke R, Farrell ER, Rappold G, Tickle C. Expression of the short stature homeobox gene *Shox* is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol*. 2006;298(2):585-96.
255. Munns CJF, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, Rappold G, et al. Expression of *SHOX* in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):4130-5.
256. Visscher PM. Sizing up human height variation. *Nat Genet*. 2008;40(5):489-90.
257. Yengo L, Sidorenko J, Kemper KE, Zheng Z, Wood AR, Weedon MN, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet*. 2018;27(20):3641-9.

258. Homma TK, Freire BL, Honjo Kawahira RS, Dauber A, Funari MF de A, Lerario AM, et al. Genetic Disorders in Prenatal Onset Syndromic Short Stature Identified by Exome Sequencing. *J Pediatr*. 2019;215:192-8.
259. Huang Z, Sun Y, Fan Y, Wang L, Liu H, Gong Z, et al. Genetic Evaluation of 114 Chinese Short Stature Children in the Next Generation Era: a Single Center Study. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(1):295-305.
260. Kim YM, Lee YJ, Park JH, Lee HD, Cheon CK, Kim SY, Hwang JY, Jang JH, Yoo HW. High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing. *Clin Genet*. 2017;92(6):594-605.
261. Guo MH, Shen Y, Walvoord EC, Miller TC, Moon JE, Hirschhorn JN, et al. Whole Exome Sequencing to Identify Genetic Causes of Short Stature. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(1):44-52.
262. Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, Miller TC, Moon JE, Derr MA, et al. Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(8):E1428-1437.
263. Yang L, Zhang C, Wang W, Wang J, Xiao Y, Lu W, et al. Pathogenic gene screening in 91 Chinese patients with short stature of unknown etiology with a targeted next-generation sequencing panel. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):212.
264. Pannone L, Bocchinfuso G, Flex E, Rossi C, Baldassarre G, Lissewski C, et al. Structural, Functional, and Clinical Characterization of a Novel *PTPN11* Mutation Cluster Underlying Noonan Syndrome. *Hum Mutat*. 2017;38(4):451-9.
265. Martin Merinero H, Zhang Y, Arjona E, Del Angel G, Goodfellow R, Gomez-Rubio E, et al. Functional characterization of 105 Factor H variants associated with atypical HUS: lessons for variant classification. *Blood*. 2021 Dec 2;138(22):2185-2201
266. Gergics P, Smith C, Bando H, Jorge AAL, Rockstroh-Lippold D, Vishnopolska SA, et al. High-throughput splicing assays identify missense and silent splice-disruptive *POU1F1* variants underlying pituitary hormone deficiency. *Am J Hum Genet*. 2021;108(8):1526-39.
267. Kawashima S, Yagi H, Hirano Y, Toki M, Izumi K, Dateki S, et al. Screening for imprinting disorders in 58 patients with clinically diagnosed idiopathic short stature. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2020;33(10):1335-9.
268. Vasques GA, Andrade NLM, Jorge AAL. Genetic causes of isolated short stature. *Arch Endocrinol Metab*. 2019;63(1):70-8.
269. Domené S, Scaglia PA, Gutiérrez ML, Domené HM. Applying Bioinformatic Platforms, In Vitro, and In Vivo Functional Assays in the Characterization of Genetic Variants in the GH/IGF Pathway Affecting Growth and Development. *Cells*. 2021;10(8):2063.

270. Guasto A, Cormier-Daire V. Signaling Pathways in Bone Development and Their Related Skeletal Dysplasia. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4321.