

El gen SHOX y el crecimiento corporal: descripción, estructura y nuevas técnicas de diagnóstico

Graciela del Rey

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE CONICET.
División de Endocrinología. Hospital de Niños Ricardo Gutierrez.
Buenos Aires, Argentina.
Gallo 1330, Ciudad de Buenos Aires.*

gracielaodelrey@cedie.org.ar

ABSTRACT

Stature is a complex trait related to growth modulating genes. SHOX is a homeobox gene located in the short arm of the pseudoautosomal region 1 (PAR 1) of the sex chromosomes (Xp22.3 and Yp11.3) and its dosage effect on the stature has been frequently evaluated. SHOX gene is most strongly expressed in bone marrow fibroblasts, implying that SHOX plays a positive role in human skeletogenesis and is known to be an important growth determining factor in human beings. Since X-inactivation is not complete for several loci in Xp22.3, SHOX is expressed on the inactive as well as the active X and Y chromosomes. Subtle distal deletions in Xpter or Ypter were subsequently demonstrated in patients with idiopathic short stature or in Turner Syndrome (TS). Genes located on PAR1 are presented in two active copies indicating a dosage effect in cases with aberrations of sex chromosomes. SHOX haploinsufficiency is associated to short stature of Turner like phenotype, skeletal dysplasia Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD), and also in idiopathic short stature (ISS). Defects of SHOX gene are considered the common etiology of short stature in these diseases. Cytogenetic studies are performed to establish chromosomal abnormalities implying alterations of PAR1 region. Fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, microsatellite analysis, Southern blotting, and nowadays the Multiplex Ligation Probe amplification (MLPA) are the most common techniques used to identified deletions or microdeletions of SHOX gene. There are a number of benefits which can be realized from early identification of defects in the SHOX gene in patients with short stature.

Key words: SHOX gene, Haploinsufficiency, short stature.

RESUMEN

Para un crecimiento normal, varones y mujeres, necesitan dos copias activas del gen SHOX, localizado en PAR 1 (Xp22.3 e Yp11.3). La pérdida de una copia de SHOX es causa de talla baja en pacientes con Síndrome de Turner, en el 77.8 % de los pacientes con displasia esquelética de discondrosteosis de Léri-Weill y en 3-22% en los de talla baja idiopática. Varias metodologías posibilitan detectar alteraciones del SHOX. Grandes deleciones de los cromosomas X e Y pueden ser puestas en evidencia por citogenética tradicional. La citogenética molecular por FISH con sondas centroméricas de los cromosomas sexuales (DXZ1 y DYZ3) permite evidenciar presencia de mosaicos crípticos. La utilización de cósmidos marcados con biotina en metafases y en células interfásicas en portas fijados permite el análisis directo de deleción del SHOX en pacientes con talla baja. A nivel molecular, para la determinación de microdeleciones del SHOX es útil el análisis de repeticiones CA en la posición 5' de la región intragénica no traducida del exón 1 (SHOX CA) y la de microsatélites localizados en la región pseudoautosómica de los cromosomas X e Y en ligamiento con el gen SHOX, como DXYS233 y DXYS234. La técnica de MLPA es un nuevo método que permite detectar deleciones muy pequeñas. La importancia de un diagnóstico preciso de anomalías de los cromosomas sexuales, deleciones, microdeleciones y mutaciones del SHOX es necesaria a efectos de establecer una estrategia terapéutica adecuada en individuos con alteraciones de la talla por haploinsuficiencia del gen SHOX.

Palabras clave: SHOX gen, Haploinsuficiencia, Talla baja

INTRODUCCIÓN

El crecimiento corporal es un proceso fundamental en el desarrollo de un organismo influenciado por factores hormonales, ambientales y genéticos. En la talla baja el crecimiento lineal está afectado y de los múltiples factores de los cuales éste depende, el factor genético está fuertemente implicado (Rimoin & Graham, 1990). En los últimos años, varios estudios establecieron a las alteraciones del gen SHOX como causa principal y responsable de la baja talla. Otros genes involucrados son factores de transcripción que actúan en la embriogénesis de la glándula pituitaria, genes que actúan en la secreción, liberación y respuesta de la hormona de crecimiento (GH, GHRHR), genes que regulan la secreción y respuesta de otras hormonas como la de la tiroides (TSH), prolactina, ACTH, LH, FSH y genes reguladores de la secreción y respuesta a factores de crecimiento. Mutaciones en alguno de ellos pueden causar deficiencia aislada de GH o deficiencia múltiple de hormonas pituitarias. También se ha podido demostrar que mutaciones en genes implicados en desórdenes esqueléticos cumplen un rol en el fenotipo de la talla baja. Sin embargo, se ha visto que la contribución de los defectos de estos genes en la prevalencia de pacientes con alteraciones de la talla es relativamente bajo quedando un gran número de casos con diagnóstico inexplicable, reconocidos como portadores de talla baja idiopática. Otras alteraciones genéticas son las que implican reordenamientos cromosómicos mayores, aneuploidías involucrando pequeñas o grandes deleciones o pérdida completa de un cromosoma, en particular las que afectan a los cromosomas sexuales humanos X e Y de los que se han definido tres loci responsables de la estatura. Dos loci en PAR 1 correspondiente a Xp22.3 e Yp11.3 donde se localiza el gen SHOX, considerado el gen principal y determinante de la talla (Figura 1) y, el tercero reconocido como locus GCY en Yq11.21, donde se localiza otro gen responsable del control del crecimiento (Ogata, Matsuo, 1993).

Está bien establecido que la ausencia completa o parcial de uno de los cromosomas sexuales está directamente implicada en la talla baja junto a otras anomalías esqueléticas y estigmas somáticos observados en el Síndrome de Turner o Ullrich-Turner síndrome (Jacobs *et al.*, 1961). La correlación genotipo-fenotipo en individuos varones y mujeres y en

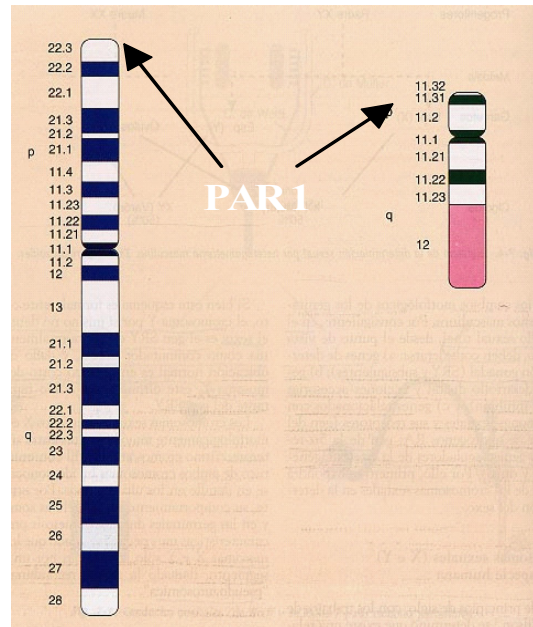


Figura 1. Ideograma de los cromosomas X e Y indicando región PAR1 (Xp22.3; Yp11.3)

pacientes con anomalías de los cromosomas sexuales ha permitido relacionar los defectos de la talla con deleciones terminales Xp e Yp (Ballabio *et al.*, 1989). Evidencias posteriores de estudios citogenéticos en pacientes con deleciones intersticiales y terminales desde Xp22 hasta telómero y en portadores de translocación X/Y permitieron tentativamente asignar un locus responsable de la talla a 2.5 Mb de la región pseudoautosomal mayor (PAR1), distal al gen MIC2 y homóloga para ambos cromosomas sexuales (Ogata *et al.*, 1993; Ogata *et al.*, 2001).

Henke *et al.* (1991) al evaluar la causa de la talla baja en dos individuos con deleción terminal Xp identificaron, por medio de análisis de hibridación, una región 1.5 Mb distal a DXS406 y proximal a DXS415. Posteriormente Ogata (1992) realizó correlación genotipo-fenotipo en dos niñas con talla baja y monosomía parcial de PAR1 y evidenció una región crítica distal a DXYS15. Rao *et al.* (1997a) realizaron análisis de FISH en extendidos en metafase de linfocitos en cuatro pacientes con reordenamientos del cromosoma X, dos de ellos con talla baja y minimizaron la extensión de la región crítica PAR1 de 700 kb a 270 kb. Sugirieron que genes localizados en PAR 1 escapaban de la inactivación del X considerando que un efecto de dosis, se ejercía en su ausencia. Consecuentemente propusieron que la haploinsuficiencia de genes en PAR1 predisponía a la baja talla. Finalmente y en el mismo año, el gen

candidato fue identificado por dos grupos independientes. Rao *et al.* (1997b), al estudiar 36 individuos con talla baja y reordenamientos cromosómicos diferentes implicando monosomía parcial de PAR 1, establecieron por estudios de mapeo un intervalo de 170 kb deletado. El nuevo gen fue denominado SHOX (Short stature homeobox containing gene). Los autores además de caracterizar al gen identificaron una mutación antisentido en un individuo con talla baja idiopática.

El segundo grupo, Ellison *et al.* (1997), aisló un gen desde la misma región denominado PHOG (pseudoautosomal homeobox containing osteogenic gene). Ambos grupos sugirieron que este gen debía estar involucrado en el fenotipo de la baja talla en pacientes con Síndrome de Turner.

ESTRUCTURA, EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL GEN SHOX

El gen SHOX es parte de una gran familia de factores de transcripción conservada durante la evolución e involucrada en la regulación del desarrollo. Se extiende en una región de 40 kb en el DNA genómico de PAR 1 a nivel de Xp22.3 e Yp11.3 y está compuesto por 7 exones. El exón 1, constituido por 262 pb, no codifica y tiene la característica de presentar una región polimórfica, un microsatélite con repeticiones de dinucleótido CA con un grado de heterocigosidad del 93% en la población general (Belin *et al.*, 1998). La alta frecuencia de repeticiones conlleva a predisposición de mutaciones por delección, descrita en portadores de talla baja idiopática y en discondrosteosis de Léri Weill (Binder *et al.*, 2000). El primer exón codificante es el exón 2, el cual contiene al codón de iniciación ATG en el cual reside una isla CpG; posee 708 pb y la porción 5' no está traducida. Los exones 3 y 4 poseen 209 pb y 58 pb respectivamente. El exón 5 está constituido por 89 pb y los exones 6a y 6b poseen 1166 pb y 625 pb respectivamente con la región 3' no traducida. Por splicing alternativo de los exones 6a y 6b el gen resulta en dos transcritos: SHOXa con 1870 pb que codifica para una proteína de 292 aminoácidos y SHOXb con 349 pb que codifica para una proteína de 225 aminoácidos. Estas isoformas tienen la misma secuencia N-terminal pero difieren en C-terminal determinando que SHOXa y SHOXb tengan secuencias idénticas desde los exones 1 al 5

y diferente la del exón 6 por lo que presentan patrones de expresión diferente. Investigaciones bioquímicas y moleculares de Rao *et al.* (2001), sobre la función de la proteína SHOX demostraron alta expresividad en núcleos de líneas celulares osteogénicas. Los exones 3 y 4 codifican la secuencia homeobox de alrededor de 60 aminoácidos; la misma cumple la función de ligar secuencias específicas de DNA lo que le confiere al SHOX la función de actuar como activador transcripcional. Otro dominio de 14 aminoácidos llamado OAR está localizado en la porción C-terminal y es necesario también para mantener su función de transactivador. El transcrita SHOXb no contiene el dominio OAR, por lo que resulta inactivo como activador transcripcional sugiriéndose que podría actuar como modulador de la actividad de SHOXa.

La función exacta del SHOX no es aún bien conocida. Los estudios sugieren que el SHOX actúa como represor de la diferenciación de los condrocitos retardando la fusión de los cartílagos de crecimiento (Blaschke *et al.*, 2003). La haploinsuficiencia del SHOX resultaría así en una diferenciación prematura de los condrocitos acelerando la fusión del cartílago epifisario y desencadenando una detención prematura del crecimiento. Otra función del SHOX es la de cumplir un rol a nivel de la proliferación celular del cartílago de crecimiento (Munns *et al.*, 2004). Recientemente y por homología del gen SHOX humano con el de ratón, se ha identificado un segundo gen denominado SHOX2 o SHOT localizado en el cromosoma tres (Blaschke *et al.*, 1998).

CONSECUENCIAS CLÍNICAS POR ALTERACIONES DEL SHOX

En individuos normales el gen SHOX está presente en dos copias homólogas en ambos cromosomas X e Y. Los genes localizados en PAR1 escapan a la X-inactivación por lo que la expresión de ambas copias es esencial para un nivel normal de actividad del SHOX. Una alteración en copia simple, ya sea por mutación puntual, delección o reordenamiento cromosómico, resulta en haploinsuficiencia, es decir en una disminución de la dosis normal del producto del gen SHOX (Fisher *et al.*, 1990). Contrariamente, el aumento del número de copias del SHOX visto en pacientes 47,XXX, 47,XXY, 47,XYY o en aquéllos con reordenamiento cromosómico y dupli-

cación de PAR1 resultando tres copias del SHOX, dan sobreexpresión y talla más alta de la observada en individuos normales, mujeres 46,XX y varones 46,XY. Esto estaría indicando que la talla tiene una relación di-recta con el número de copias y con la dosis del gen SHOX (Ogata *et al.*, 2001; Rappold *et al.*, 2002; del Rey *et al.*, 2010).

Numerosos estudios en la actualidad han dado evidencia que la haploinsuficiencia del SHOX no sólo está involucrada con la talla baja sino también con anomalías esqueléticas y otras condiciones clínicas que incluyen a) talla baja idiopática (TBI), b) Síndrome de Turner (ST), c) discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) y, d) en displasias esqueléticas graves en las cuales la pérdida completa de dos copias del SHOX es la base de la severa baja talla y características dismórficas presentes en la displasia mesómelia de Langer (Léri, Weill, 1938; del Rey y Coco, 1994; García Rudaz *et al.*, 1995; Kosho *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 2001; Bernasconi *et al.*, 2001; Jorge *et al.*, 2007).

TALLA BAJA IDIOPÁTICA

La talla baja idiopática representa un grupo heterogéneo de pacientes con talla baja significativa (-2SDS), velocidad de crecimiento persistentemente lenta para la edad y ningún parámetro de diagnóstico endocrinológico o deficiencia de hormona de crecimiento que demuestren evidencias del retardo de crecimiento. Los pacientes son generalmente física y mentalmente normales. Estudios iniciales y subsiguientes detectaron mutaciones del SHOX con una frecuencia del 1.1 a 3.2 %. Recientemente estudios moleculares realizados por Jorge *et al.* (2007) en una población muy seleccionada de niños con TBI, establecida acorde a determinados criterios en la medición de sus tallas, observaron un aumento en la frecuencia de alteraciones del SHOX llegando éstas hasta un 22%.

SÍNDROME DE TURNER

Se caracteriza por monosomía completa o parcial de uno de los cromosomas sexuales, principalmente del X (Turner, 1938). Presenta una alta letalidad embrionaria sin embargo 1:2500 de mujeres nacidas vivas son diagnosticadas con este desorden genético. El 99 % de las concepciones con cariotipo 45,X se pierden como abortos espontáneos y el 1% de las que llegan a término presentan grados

variables de expresión, desde haploinsuficiencia resultado de la presencia de una línea monosómica completa o parcial hasta formas más leves por mosaico con línea normal. Anomalías estructurales de brazos cortos o largos de los cromosomas sexuales tales como isocromosomas, anillos, deleciones e isodicéntricos son también responsables de la expresión fenotípica del ST (del Rey y Coco, 1994). El fenotipo clásico está dado por talla baja (debajo del percentilo 3), insuficiencia ovárica y malformaciones somáticas. En los primeros años de vida, la talla de las niñas con ST desciende progresivamente por debajo del patrón normal que se acentúa a partir de los 5-6 años de edad cronológica, alcanzando una talla final en población argentina alrededor de 138 cm (García Rudaz *et al.*, 1995). El síndrome también se caracteriza por una variedad de malformaciones esqueléticas mayores y menores de las cuales 35-60% corresponden al cuarto metacarpiano corto, cúbito valgo, genu valgum, paladar alto, escoliosis y micrognatia. La deformidad de Madelung y el significativo acortamiento mesomélico de miembros característico de la DLW ocurre menos frecuentemente en el ST. Anomalías cardíacas, renales, neurológicas, linfáticas y endocrinológicas pueden estar presentes en grados variables.

Posteriormente a la identificación del gen SHOX se estableció a la haploinsuficiencia del gen como la etiología de la talla baja y de las anomalías esqueléticas, paladar ojival, cuarto metacarpiano corto, cúbito valgo y deformidad de Madelung, presentes en pacientes con ST.

DISCONDROSTEOSIS DE LÉRI-WEILL

El síndrome observado por primera vez por Léri y Weill (1929) se caracteriza por desproporcionada talla baja con acortamiento de los segmentos medios de los huesos largos de brazos y piernas, reconocido como talla baja mesomélica. Como en otros desórdenes del SHOX, la talla baja es variable, desde individuos con talla adulta desde 135 cm hasta talla normal para su género. La anomalía esquelética primaria es la deformidad de Madelung como signo clínico que permite el diagnóstico de DLW (Herdman *et al.*, 1966). Esta es una deformación característica del antebrazo consistente en disminución del ángulo de los huesos del carpo, radio corto en relación al cúbito, encurvamiento distal de radio y del cúbito. La triangularización e hipertranspa-

rencia de la epífisis distal del radio y subluxación dorsal del cúbito observada radiológicamente, provoca limitación en el movimiento de la muñeca. Se observa en el 74% de las portadoras de DLW, en el 7.5 % de las mujeres portadoras de ST y como signo clínico aislado en pacientes con baja talla. Belin *et al.* y Shears *et al.* (1998) describieron las primeras mutaciones antisentido del SHOX. Posteriormente se detectaron deleciones de todo el gen, mutaciones missense, nonsense o deleciones intragénicas (Huber *et al.*, 2001).

Otra característica en DLW es la alta preponderancia de mujeres afectadas siendo alrededor de cuatro veces más las identificadas en relación a los varones. Sin embargo y en la actualidad, la descripción de varones también afectados permite clasificarla como un desorden pseudoautosomal dominante.

SÍNDROME DE LANGER

Brailsford (1935) lo describe por primera vez en individuos afectados cuyos padres presentaban también baja talla. Es una forma más rara, grave de displasia ósea mesomélica y homocigota de la DLW con deficiencia completa del gen SHOX.

ESTUDIOS GENÉTICOS EN PACIENTES CON BAJA TALLA DETECCIÓN DE LAS ALTERACIONES DEL GEN SHOX

Varias metodologías permiten detectar alteraciones del SHOX. Grandes deleciones pueden ser puestas en evidencia por estudios de citogenética tradicional.

TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA

La realización del estudio citogenético en cultivo de linfocitos de sangre periférica con metodología estándar y de alta resolución es importante en pacientes con talla baja sin una causa determinada y en los que presenten signos clínicos característicos de los síndromes anteriormente mencionados (Morhead *et al.*, 1960; Yunis, 1976).

El análisis del cariotipo con técnicas de bandeado GTG (Comings, 1978) permite identificar deleciones cromosómicas como las que se presentan en monosomías totales o parciales de los cromosomas sexuales, características del ST. Otras técnicas de

diferenciación cromosómica CBG y RBG permiten poner en evidencia polimorfismos, regiones de heterocromatina y regiones de replicación tardía respectivamente. Con técnica de alta resolución y en cromosomas en prometafase es posible evidenciar casos de deleción Xp22.3.

Evidencia de mosaicos crípticos con baja frecuencia de línea 45,X y cariotipo normal con técnicas convencionales de laboratorio, será necesario evaluar un número importante de células, de 50 a 100, en niñas con talla baja y dismorfias propias del ST.

En algunos casos el diagnóstico sólo podrá ser elucidado por el análisis de citogenética molecular en células de otros tejidos o por técnicas de biología molecular (Pinkel *et al.*, 1986; Gicquel, 1998; Azcona *et al.*, 1999; Stuppia *et al.*, 2003; ISCN 2009).

TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR

La técnica de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) utiliza sondas de DNA marcadas con haptenos que identifican segmentos cromosómicos de copia única, segmentos con secuencias repetitivas como los de las regiones centroméricas (DXZ1 y DYZ3) o de todo el cromosoma (whole chromosome painting- wcp) de los cromosomas X e Y. Esta técnica permite detectar anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas en metafase y núcleos en interfase. Puede ser aplicada en células en interfase aún sin necesidad de realizar cultivo, en mucosa yugal y en preparados citológicos (Pinkel *et al.*, 1986; Musebeck *et al.*, 2001).

En pacientes con talla baja y cariotipo normal, el análisis con sondas centroméricas X e Y en sangre o en células epiteliales de mucosa yugal resulta útil en la identificación de mosaicos crípticos (Schad, 1996).

Estudios directos del SHOX se realizan mediante aplicación de cósmidos marcados con biotina en extendidos de metafases en portas fijados para estudio citogenético y en células interfásicas, pudiéndose establecer por FISH la deleción del SHOX en pacientes con talla baja (Rao *et al.*, 1997b; Belin *et al.*, 1998; Musebeck *et al.*, 2001; Rappold *et al.*, 2002). Las sondas Kal (Xp22.3), tel Xp/Yp y wcpY son útiles para casos en los cuales las deleciones son más grandes y hasta visibles citogenéticamente. También resultan muy efectivas en evidenciar ano-

malías cromosómicas que dan lugar a triplicación del SHOX en aquellos pacientes con talla alta por sobreexpresión del gen (del Rey *et al.*, 2010).

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Rao *et al.*, (1997b) aplicaron el método de SSCP (Single-Strand Conformation Polimorfism Analysis) en la investigación de dos casos con TBI. La misma fue utilizada por varios autores, sin embargo y con el tiempo, fue considerada poco sensible para la detección de mutaciones en todos los exones de gen SHOX (Binder *et al.*, 2000).

Para el análisis de microdeleciones a lo largo de todo el gen se propuso la utilización de microsatélites localizados en la región PAR1 y de secuenciamiento para deleciones puntuales (Belin *et al.*, 1998; Shears *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2000; Stuppia *et al.*, 2003; Benito-Sanz *et al.*, 2006).

En la pesquisa de microdeleciones del SHOX resulta útil el análisis de repeticiones CA en la posición 5' de la región intragénica no traducida del exón 1 (SHOX CA repeat) y la de microsatélites localizados en la región pseudoautosómica de los cromosomas X e Y en ligamiento con el gen SHOX como los DXYS233 y DXYS234, usados como marcadores intragénicos, entre otros (Belin *et al.*, 1998; Shears *et al.*, 1998; Binder *et al.*, 2000; del Rey *et al.*, 2007). Actualmente y en casos de microdeleciones del SHOX no encontradas con las técnicas previamente mencionadas, la de MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification) ha demostrado ser muy efectiva en la detección de pequeñas deleciones del SHOX (Chen *et al.*, 2009).

IMPORTANCIA DE ESTUDIAR EL GEN SHOX

La importancia de un diagnóstico preciso de las anomalías de los cromosomas sexuales, deleciones, microdeleciones y mutaciones del gen SHOX permite establecer una estrategia terapéutica adecuada en pacientes con talla baja (Huber *et al.*, 2006; Rappold *et al.*, 2007; Shanske *et al.*, 2007).

El análisis molecular del SHOX resulta una herramienta efectiva e importante en la diferenciación de discondrosteosis y otras displasias esqueléticas, asociadas a desproporcionada baja estatura inclu-

yendo hipocondroplasia. Adquiere valor en los casos menos severos o en la infancia temprana cuando los signos clínicos pueden ser no tan evidentes. El tratamiento con rhGH ha demostrado ser efectivo en pacientes con ST y se ha observado que pacientes con mutaciones del SHOX tienen una respuesta favorable y similar a la observada en pacientes con ST (Binder *et al.*, 2000; Blum *et al.*, 2007).

La importancia de estudiar anomalías del gen SHOX en la población argentina con talla baja asociada o no a anomalías esqueléticas implicará la integración de un equipo multidisciplinario de profesionales de la salud. El abordaje de la puesta a punto requerirá el desarrollo de un programa colaborativo a nivel de diagnóstico clínico en conjunto con el de laboratorios con infraestructura adecuada para estudios citogenéticos, citogenética molecular y de análisis molecular.

AGRADECIMIENTOS

A la Lic. Susana Mancini, por cooperar en la búsqueda de material bibliográfico, y al personal del Laboratorio de Citogenética Humana de la División de Endocrinología del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", por su colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

- Azcona, C., Bareille, P., Stanhope, R. (1999): Turner's syndrome mosaicism in patients with a normal blood lymphocyte karyotype. *British Med J*; 318: 856-57.
- Ballabio, A., Bardoni, B., Carozzo, R., Andria, G., Bick D, Campbell, L., Hamel, B., Ferguson Smith, M.A., Gimelli, G., Fraccaro, M., Maraschio, P., Zuffardi, O., Guioli, S., Camerino, G. (1989): Contiguos gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Nat Acad Sci*; 86: 10001-5.
- Belin, V., Cusin, V., Viot, G., Girlich, D., Toutain, A., Moncla, A., Vekemans, M., Le Merrer, M., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (1998): SHOX mutations in dyschondrosteosis (Léri-Weill syndrome). *Nat Genet*; 19: 67-9.
- Benito-Sanz, S., del Blanco, D., Huber, C., Thomas, N.S., Aza-Carmona, M., Bunyan, D., Maloney, V., Argente, J., Cormier-Daire, V., Campos-Barros, A., Heath, K.E. (2006): Characterization of SHOX

- deletions in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet*; 79: 409-414.
- Bernasconi, S., Mariani, S., Falcinelli, C., Miliolo, S., Lughetti, L., Forabosco, A. (2001): SHOX gene in Léri-Weill syndrome and in idiopathic short stature. *J Endocrinol Invest*; 24: 737-41.
- Binder, G., Schwarze, C.P., Ranke, M.B. (2000): Identification of short stature caused by SHOX defects and therapeutic effect of recombinant human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab*; 85: 245-9.
- Blasche, R.J., Topfer, C., Marchini, A., Steinbeisser, H., Janssens, J.W., Rappold, G.A. (2003): Transcriptional and translational regulation of the Léri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J Biol Chem*; 278: 47820-6.
- Blaschke, R.J., Monaghan, A.P., Schiller, S., Schechinger, B., Rao, E., Padilla-Nash, H., Ried, T., Rappold, G. (1998): SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart and limb development. *Proc Natl Acad Sci*; 95: 2406-11.
- Blum, W.F., Crowe, B.J., Quigley, C.A.; Jung, H., Cao, D., Ross, J.L., Braun, L., Rappold, G. (2007): 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*; 92(1): 219-28.
- Brailsford, J.F. (1935): Dystrophies of the skeleton. *Br J Radiol*; 8: 533.
- Chen, J., Wildhardt, G., Zhong, Z., Roth, R., Weiss, B., Steinberger, D., Decker, J., Blum, W.F., Rappold, G. (2009): 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*; 46(12): 834-39.
- Comings, D.E. (1978): Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann Rev Genet*; 12: 25-46.
- Del Rey, G., Jasper, H., Bengolea, S.V., Boywitt, A., De Bellis, R., Heinrich, J.J.: Trisomy of the short stature homeobox-containing gene (SHOX) due to duplication-deletion of the X chromosome. Clinical implications on the stature. *Horm Res, en prensa*.
- Del Rey, G. y Coco, R. (1994): Hallazgos cromosómicos en pacientes con Síndrome de Turner. *Rvta del Hospital de Niños de Buenos Aires*; 157: 80-85.
- Dutrillaux, B., Lejeune, J. (1971): Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C R Acad Sci (D) (Paris)*; 272: 2638-40.
- Ellison, J.W., Wardak, Z., Young, M.F., Robey, P.G., Webster, M., Chiong, W. (1997): PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet*; 6: 1341-7.
- Fisher, E.M., Beer-Romero, P., Brown, L.G., Ridley, A., McNeil, J.A., Lawrence, J.B., Wilard, H.F., Bieber, F.R., Page, D.C. (1990): Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell*; 63(6):1205-18.
- García Rudaz, C., Martínez, A.S., Heinrich, J.J., Legarraga, H., Keselman, A., Laspiur, M., Bergadá, C. (1995): Growth of Argentinian girls with Turner syndrome. *Annals Hum Biol*; 22: 533-44.
- Gicquel, C. (1998): Assessment of Turner's syndrome by molecular analysis of the X chromosome in growth-retarded girls. *J Clin Endocrinol Metab*; 83(5): 1472-76.
- Henke, A., Wapenaar, M., Van Ommen, G.J., Maraschio, P., Camerino, G., Rappold, G. (1991): Deletions within the pseudoautosomal region help map three new markers and indicate a possible role of this region in linear growth. *Am J Hum Genet*; 49: 811-19.
- Herdman, R.C., Langer, L.O. Jr, Good, R.A. (1966): Dyschondrosteosis, the most common cause of Madelung's deformity. *J Pediatr*; 68: 432-41.
- Huber, C., Cusin, V., Le Merrer, M., Mathieu, M., Sulmont, V., Dagoneau, N., Munnich A, Cormier-Daire V. (2001): SHOX point mutations in dyschondrosteosis. *J Med Genet*; 38: 323.
- Huber, C., Rosilio, M., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (2006): High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet*; 43: 735-9.
- ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman Felix (editor), S. Karger Publisher Inc.
- Jacobs, P.A., Harnden, D.G., Buckton, K.E., Court

- Brown, W.M., King, M.J., McBride, J.A., MacGregor, T.N., MacLean, N. (1961): Cytogenetic studies in primary amenorrhea. *Lancet*; 1: 1183-9.
- Jorge, A.A., Souza, S.C., Nishi, M.Y., Billerbeck, A.E., Liborio, D.C., Kim, C.A., Arnhold, I.J., Mendonca, B.B. (2007): SHOX mutations in idiopathic short stature and Léri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 66:130-5.
- Kosho, T., Muroya, K., Nagai, T., Fujimoto, M., Yokoyama, S., Sakamoto, H., Hirano, T., Terasaki, H., Ohashi, H., Nishimura, G., Sato, S., Matsuo, N., Ogata, T. (1999): Skeletal features and growth patterns in 14 patients with haploinsufficiency of SHOX: implications for the development of Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*; 84: 4613-21.
- Léri, A., Weill, J. (1929): Une affection congenitale et symétrique du développement osseux : la dyschondrosteose. *Bull Mem Hosp (Paris)*; 35: 1491-94.
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A. (1960): Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*; 20: 613-16.
- Munns, C.J., Haase, H.R., Crowther, L.M., Hayes, M.T., Blaschke, R., Rappold, G., Glass, I.A., Batch, J.A. (2004): Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab*; 89: 4130-5.
- Musebeck, J., Mohnike, K., Beye, P. (2001): Short stature homeobox-containing gene deletion screening by fluorescence in situ hybridization in patients with short stature. *Eur J Pediatr*; 160: 561-5.
- Ogata, T., Goodfellow, P., Petit, C., Aya, M., Matsuo, N. (1992): Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to DXYS15: localization of growth gene(s) in the pseudoautosomal region. *J Med Genet*; 29: 455-9.
- Ogata, T., Matsuo, N., Nishimura, G. (2001): Shox haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status. *J Med Genet*; 38: 1-6.
- Ogata, T., Matsuo, N.: Sex chromosomes aberrations and stature; deduction of the principal factors involved in the determination of adult height. *Hum Genet* 1993; 91: 551-62.
- Ogata, T., Muroya, K., Matsuo, N., Shinohara, O., Yorifuji, T., Nishi, Y., Hasegawa, Y., Horidawa, R., Tachibana, K. (2001): Turner syndrome and Xp deletions: clinical and molecular studies in 47 patients. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 5498-508.
- Ogata, T., Tyler-Smith, C., Purvis-Smith, Turner, G. (1993): Chromosomal localization of a gene(s) for Turner stigmata on Yp. *J Med Genet*; 30: 918-22.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83: 2934-38.
- Rao, E., Blaschke, R.J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M., Rappold, G.A. (2001): The Léri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet*; 10: 3083-91.
- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Mertz, A., Meder, J., Ogata, T., Heinrich, U., Garcia-Heras, J., Schiebel, K., Rappold, G.A. (1997a): FISH-deletion mapping defines a 270-kb short stature critical interval in the pseudoautosomal region PAR1 on human sex chromosomes. *Hum Genet*; 100: 236-9.
- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelmann, M., Nordsiek, G., Heinrich, U., Breuning, M., Ranke, M., Rosenthal, A., Ogata, T., Rappold, G.A. (1997b): Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet*; 16: 54-63.
- Rappold, G., Blum, W.F., Shavrikova, P., Crowe, B.J., Roeth, R., Quigley, C.A., Ross, J.L., Niesler, B. (2007): Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet*; 44(5): 306-13.
- Rappold, G.A., Fukami, M., Niesler, B., Schiller, S., Umkeller, W., Bettendorf, M., Heinrich, U., Viachopapadoupoulou, E., Reinehr, T., Onigata, K., Ogata, T. (2002): Deletions of the homeobox gene SHOX are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 184-8.
- Rimoin, D.L., Connor, J.M., Pyeritz, R.E., Korj, B.R. (2007): Short Stature. In Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Churchill

Livingstone; 1: 948-956.

- Received **21/05/2010**

- Accepted **12/07/2010**

Robertson, S.P., Shers, D.J., Oei, P., Winter, R.M., Scamber, P.J., Aftimos, S., Savarirayn, R. (2000): Homozygous deletion of SHOX in a mentally retarded male with Langer mesomelic dysplasia. *J Med Genet*; 37: 959-64.

Ross, J.L., Scott, C. Jr., Marttila, P., Kowal, K., Nass, A., Papenhausen, P., Abboudi, J., Osterman, L., Kushner, H., Carter, P., Ezaki, M., Elder, F., Wei, F., Chen, H., Zinn, A.R.. (2001): Phenotypes associated with SHOX deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 5674-80.

Schad, C.R. (1996): Application of fluorescent in situ hybridization with X and Y chromosome specific probes to buccar smear analysis. *Am J Med Genet*; 66: 187-92.

Shanske, A., Puri, M., Marshall, B., Saenger, P. (2007): Unique deletion in exon 5 of SHOX gene in a patient with idiopathic short stature. *Horm Res*; 67: 61-66.

Shears, D.J., Vassal, H.J., Goodman, F.R., Palmer, R.W., Reardon, W., Superti-Furga, A., Scambler, P.J., Winter, R.M. (1998): Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Léri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet.*; 19: 70-3.

Stuppia, L., Calabrese, G., Gatta, V., Pintor, S., Morizio, E., Fantasia, D., Gvanciali Franchi, P., Rinaldi, M.M., Scarano, G., Concolino, D., Giannotti, A., Petreschi, F. (2003): SHOX mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature. *J Med Genet.*; 40: E11.

Sumner, A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*; 75: 304-6.

Turner, H.H. (1938): A syndrome of infantilism, congenital webber neck, and cubitus valgus. *Endocrinology*; 23: 566.

Yunis, J.J. (1976): High resolution of human chromosomes. *Science*; 191: 1268-70.