



## I Pigmei, modello paradigmatico di bassa statura idiopatica

Giada Biddeci, Barbara Rundo, Laura Losa, Sara Pagani, Cristina Meazza

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

---

### *I Pigmei, modello paradigmatico di bassa statura idiopatica*

**Obiettivo:** i soggetti Pigmei rappresentano la forma estrema di bassa statura non dovuta ad alcuno stato patologico e la loro crescita ha sempre attirato il mondo occidentale. La comprensione dei meccanismi coinvolti nella crescita dei Pigmei potrebbe aiutare a comprendere meglio anche il meccanismo patogenetico delle forme di bassa statura idiopatica. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se la bassa statura, la ridotta velocità di crescita e la disfunzione dell'asse GH/IGF-I, presente nei Pigmei, avessero una componente genetica.

**Disegno dello studio:** sono stati studiati 35 soggetti adulti pigmei di etnia Baka (13 maschi e 22 femmine con età media di  $36 \pm 15$  anni) e 14 soggetti Bantu (11 maschi e 3 femmine con età media di  $37 \pm 10$  anni), popolazione Africana con statura normale, scelta come controllo. Abbiamo valutato i livelli sierici di GH, GHBP e IGF-I in entrambe le popolazioni e confrontato il profilo di espressione quantitativa dei geni GH e GHR, principali rappresentanti dell'asse GH-IGF-I.

**Metodi:** i campioni di sangue prelevati da ciascun soggetto sono stati raccolti in provette con gel separatore di siero e in provette Tempus Blood™ RNA per la preservazione dell'RNA. I livelli circolanti di GH e di IGF-I sono stati determinati mediante metodo IMMULITE. Il dosaggio della GHBP è stato effettuato con un kit ELISA. Per valutare l'espressione del gene del GH e del GHR è stato estratto l'RNA totale, amplificato con la *Real Time* PCR e retrotrascritto in DNA a singolo filamento. Infine, i polimorfismi nel gene del GHR sono stati valutati tramite sequenziamento in elettroforesi capillare.

**Risultati:** dal nostro studio è emerso che i valori sierici di GH basale non sono significativamente differenti tra le due popolazioni. Al contrario, i livelli circolanti di IGF-I e GHBP sono significativamente più bassi nel gruppo dei Pigmei, rispetto ai Bantu. Per quanto riguarda l'espressione quantitativa dei geni GH e GHR nei campioni di sangue periferico delle due popolazioni, questa è risultata significativamente ridotta nel gruppo dei Pigmei rispetto a quello dei Bantu. Infine, non sono state trovate differenze statisticamente significative tra la distribuzione dei polimorfismi del gene GHR nei due gruppi studiati.

**Conclusione:** i nostri dati mostrano nei Pigmei ridotti livelli di IGF-I e GHBP associati ad una marcata riduzione dell'espressione genica del GHR. Questi risultati rappresentano un punto di partenza per future ricerche atte ad individuare effetti epigenetici ed epistatici.

### *Pygmies, a model of paradigmatic short stature*

**Objective:** African Pygmies are one of the shortest population in the world and understanding the biological bases of their small size could help us to better comprehend the cause of idiopathic short stature in Caucasian children. The aim of this study was to investigate if the short stature, the reduced growth velocity and the dysfunction of GH/IGF-I axis of Pygmies are due to genetic mechanisms.

**Design:** 35 Baka Pygmy adults (22 females and 13 males; age  $36\pm 15$  years) and 14 Bantu adults (3 females and 11 males; age  $37\pm 10$  years). We evaluated serum levels of GH, GHBP and IGF-I and the quantitative expression of GH and GHR genes in both populations.

**Methods:** blood samples were collected in Tempus Blood™ RNA tubes. Serum GH and IGF-I were measured with a fully automated immunochemistry analyzer, Immulite 2000. Serum GHBP were detected with ELISA assay. In order to evaluate gene-expression of GH and GHR genes, the total RNA was extracted and amplified through Real Time PCR and then turned in single-strand DNA. Polymorphisms of GHR gene were investigated through capillary electrophoresis.

**Results:** serum GH levels were not different between the two populations, whereas IGF-I and GHBP levels were significantly lower in Pygmies than in Bantu. GH and GHR quantitative gene-expression resulted lower in Pygmies than in Bantu. Finally, no polymorphisms in GHR gene were found. Our data show that Pygmies have lower serum IGF-I and GHBP levels than Bantu and a reduction in quantitative expression of GH and GHR genes. These results could be a starting point for further studies aimed at finding epistatic and epigenetic effects. The evaluation of GH secretion with the Immulite assay using the 98/574 recombinant human GH as a calibrator revealed blunted GH secretion in 15 out of 18 subjects, confirming the clinical diagnosis of GHD. Subsequently, we measured GH levels in the same samples using IS 80/505 pituitary derived GH as a calibrator, and found reduced GH levels only in 11 children.

**Conclusions:** these data confirm that GH values may depend on different calibrators used in the GH assay, and these calibrators affect the formulation of GHD diagnosis and the consequent decision to start GH substitutive treatment.

---

## Introduzione

La popolazione pigmea è caratterizzata da una statura media di 143 cm per l'uomo e 136 cm per la donna, e rappresenta un modello paradigmatico di bassa statura idiopatica. Nel corso degli anni sono state formulate varie ipotesi per spiegare la bassa statura dei Pigmei. Inizialmente, l'ipotesi più accreditata era quella che spiegava la bassa statura della popolazione pigmea in termini di adattamento all'ambiente circostante; la piccola dimensione corporea favorirebbe, infatti, la vita nelle fitte foreste, la capacità di sopravvivere con scarse riserve di cibo e una migliore termoregolazione [1-3]. I recenti studi condotti da Migliano propongono un nuovo modello per spiegare la bassa statura dei Pigmei, ponendo in secondo piano le ipotesi tradizionali [4]. Gli autori di queste ricerche hanno mostrato che i Pigmei terminano la loro crescita ad un'età più precoce rispetto alle popolazioni di statura normale; la piccola statura adulta deriverebbe perciò, più da una differenza nella durata, che nella velocità della crescita. Una caratteristica importante è l'alta mortalità giovanile e adulta, per cui la durata della vita avrebbe importanti ripercussioni anche sulla riproduzione. La piccola dimensione corporea sarebbe perciò un compromesso tra una crescita protratta più a lungo da un lato e la riproduzione più precoce dall'altro, tale da far pendere l'ago della bilancia verso un picco di fertilità più anticipato.

Nel tentativo di comprendere le basi biologiche della bassa statura, i ricercatori si sono focalizzati sulla valutazione dell'asse GH-IGF-I. In una serie di studi, compiuti nel corso di 20 anni di ricerche, è stata dimostrata una normale secrezione di GH, sia a livello basale che dopo stimolo ( $>10$  ng/ml) [5-6]. Inoltre, numerosi studi a partire dagli anni sessanta, hanno dimostrato bassi livelli di IGF-I plasmatico nei Pigmei, che non aumentano dopo somministrazione di GH esogeno, rispetto alle popolazioni africane di statura normale (Bantu) [7-8] e bassa concentrazione di GHBP [9].

Negli ultimi anni, sono stati effettuati i primi studi di biologia molecolare, anche grazie allo sviluppo di nuove tecniche, allo scopo di risalire alla causa genetica alla base della bassa statura pigmea. È stato sequenziato il gene per il GHR nei Pigmei, senza ritrovamento di alcuna alterazione, se non un polimorfismo (Bst N1) con frequenza maggiore nella popolazione pigmea rispetto a quella africana non pigmea. Tale polimorfismo, cadendo all'interno di un introne, sembra essere privo di significato ed è stato, quindi, ipotizzato un meccanismo di *linkage disequilibrium* con una reale mutazione nel gene del recettore o, come più probabilmente si pensa, nella regione regolatrice [10].

## Scopo del lavoro

Lo scopo di questo studio è stato quello di evidenziare se la bassa statura, la ridotta velocità di crescita e la disfunzione dell'asse GH/IGF-I presente nei Pigmei avessero una componente genetica. Dopo aver valutato i livelli sierici di GH, GHBP e IGF-I nei Pigmei e nei Bantu, popolazione africana con statura normale, abbiamo, quindi, confrontato il profilo di espressione quantitativa dei geni GH e GHR, principali rappresentanti dell'asse GH-IGF-I. Esistendo tratti pigmei anche tra i soggetti caucasici con ritardo di crescita, clinicamente indistinguibili dall'ipopituitarismo, l'approfondita conoscenza dei meccanismi coinvolti nella crescita dei Pigmei potrebbe aiutare a comprendere meglio anche il meccanismo patogenetico alla base di queste condizioni.

## Materiali e metodi

### *Soggetti*

Sono stati arruolati 35 soggetti adulti di etnia Baka (13 maschi e 22 femmine con età media di  $36 \pm 15$  anni) e 14 soggetti Bantu (11 maschi e 3 femmine con età media di  $37 \pm 10$  anni). I Bantu sono stati scelti come popolazione di controllo poiché essi vivono nelle stesse condizioni ambientali e hanno una dieta ed uno stato nutrizionale simili. Sono stati esclusi dallo studio i soggetti affetti da patologie clinicamente evidenti. Il nostro studio era stato precedentemente approvato dal Comitato Etico dell'Università di Pavia. I Pigmei sono stati informati sui metodi e le finalità dello studio con l'aiuto di infermieri locali come interpreti (i Pigmei sono analfabeti e parlano dialetti diversi) e i soggetti che hanno partecipato allo studio hanno espresso un consenso orale.

L'età è stata ottenuta, con l'aiuto del capo villaggio come interprete, mettendo in relazione la nascita dei soggetti con alcuni eventi importanti per la comunità e con le attività riguardanti l'agricoltura e la caccia. Per nessuno dei soggetti inclusi nello studio è stato possibile determinare la data di nascita precisa.

Per ogni soggetto sono stati misurati l'altezza ed il peso corporeo ed è stato prelevato un campione di sangue. L'altezza è stata ottenuta ponendo i soggetti scalzi nella posizione di Frankfurt su una superficie perpendicolare ad un muro verticale, approssimando agli 0.5 cm più vicini; il peso corporeo è stato misurato utilizzando delle bilance elettroniche portatili. Attraverso questi due parametri si è poi calcolato il *body mass index* (BMI), cioè peso (espresso in kg) diviso il quadrato dell'altezza (espressa in m<sup>2</sup>), un buon indice dello stato nutrizionale dei soggetti in esame. La statura e il BMI sono stati espressi in termini di deviazione standard rispetto ai normali valori riportati dagli standard internazionali anglosassoni di Tanner e Whitehouse, in quanto non esistono grafiche specifiche per le due popolazioni in studio (Tabella 1).

### **Metodi**

I campioni di sangue prelevati da ciascun soggetto, ottenuti grazie all'aiuto di infermieri locali, sono stati raccolti in provette con gel separatore e in provette Tempus Blood™ RNA per la conservazione dell'RNA.

I livelli circolanti di GH e di IGF-I sono stati determinati, presso i laboratori della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, mediante metodo IMMULITE, un dosaggio immunometrico in chemiluminescenza in fase solida. La concentrazione di GH viene fornita in ng/ml. Lo stesso metodo viene utilizzato per il dosaggio dell'IGF-I, mediante l'impiego di anticorpi anti-IGF-I. Per il dosaggio dell'IGF-I sono stati usati come valori di riferimento quelli riportati da Elmlinger *et al.* [11].

Il dosaggio della GHBP è stato effettuato, presso i laboratori del Centro di Auxologia della stessa Fondazione, mediante saggio ELISA, con un kit già disponibile in commercio.

Per valutare l'espressione del gene del GH e del GHR è stato estratto l'RNA totale, amplificato con la *Real Time* PCR e retrotrascritto in DNA a singolo filamento. Ogni campione è stato analizzato in duplicato e il valore dell'espressione di ogni gene è stato normalizzato verso il gene di riferimento HPRT. Il DNA genomico, utilizzato per l'analisi degli introni e degli esoni del gene GHR, è stato estratto dal sangue periferico di 13 soggetti Pigmei e di 8 soggetti Bantu. Il sequenziamento è stato eseguito, in elettroforesi capillare con lo strumento ABI PRISM 310 (Applied Biosystems Perkin-Elmer-Foster City CA).

### **Metodi statistici**

La distribuzione normale delle variabili è stata valutata mediante il test di Shapiro e i dati sono stati presentati in termini di media e di deviazione standard. È stato utilizzato il test di Mann-Whitney per confrontare i gruppi circa l'età, l'altezza (*Standard Deviation Score*, SDS), il BMI (SDS), l'espressione quantitativa dei geni GH e GHR, la concentrazione sierica di GH, GHBP e IGF-I. La frequenza dei polimorfismi per il gene GHR è stata espressa come percentuale in entrambi i gruppi e confrontata con il test del Chi-quadro. È stato considerato statisticamente significativo un valore di  $p < 0.05$ . Tutti i test utilizzati sono a due code. Le analisi sono state condotte con il programma Statistica per Windows (StatSoft, Inc.2004, Tulsa OK, USA).

## **Risultati**

I due gruppi di soggetti studiati sono stati confrontati per età, BMI, altezza, valori sierici di GH, IGF-I, GHBP ed espressione quantitativa dei geni GH e GHR, principali mediatori dell'asse GH-IGF-I.

Per quanto riguarda età e BMI, espressi in termini di SDS, non sono state trovate differenze, escludendo così il ruolo della malnutrizione nell'influenzare i dati (Tabella 1); al contrario, i valori delle altezze espresse in SDS sono significativamente ridotti nei soggetti Pigmei rispetto ai Bantu ( $p < 0.01$ ).

Come si può vedere dalla tabella 2, i valori sierici di GH basale non sono risultati significativamente differenti tra le due popolazioni. Al contrario, i livelli circolanti di IGF-I e GHBP sono significativamente più bassi nel gruppo dei Pigmei, rispetto ai Bantu. Questi dati sono in accordo con studi precedenti che mostrano nei Pigmei valori basali di GH perfettamente nella norma [9], associati a bassi livelli di GHBP [9] e IGF-I [7, 8], suggerendo una insensibilità periferica al GH.

Per studiare la causa alla base di tale discrepanza, cioè bassi livelli circolanti di GHBP e di IGF-I con normali livelli di GH, è stata valutata l'espressione quantitativa dei geni GH e GHR nei campioni di sangue periferico dei Pigmei Baka e dei Bantu. Come mostrato dalla figura 1, sia l'espressione quantitativa del gene GH sia quella di GHR è risultata significativamente ridotta nel gruppo dei Pigmei rispetto a quello dei Bantu; in particolare l'espressione del gene GHR ha mostrato valori 8 volte inferiori nel gruppo dei Baka, mentre il gene GH solo 1.8 volte inferiore rispetto ai Bantu (Tabella 3).

Nel gruppo dei Pigmei, il rapporto tra i livelli di GH e l'espressione quantitativa del gene GH e quello tra il valore di GHBP e l'espressione genica di GHR, si sono mostrati ampiamente sbilanciati rispetto ai controlli, con un lieve aumento del primo rapporto e un incremento netto, di circa tre volte, del secondo (Tabella 3). L'aumentato valore del secondo rapporto concorda con una diminuzione nell'espressione quantitativa del gene GHR e anche con una riduzione dei livelli circolanti di GHBP. Per spiegare tale alterazione sono state ricercate variazioni nella sequenza codificante per il gene GHR, che è noto essere paucimorfico. Non sono state trovate differenze statisticamente significative tra la distribuzione dei polimorfismi del gene GHR dei Pigmei e quella dei Bantu; lo stesso risultato si ottiene andando ad analizzare, la combinazione degli stessi polimorfismi (Tabella 4). Inoltre, come è mostrato nella tabella 5, non sono state riscontrate differenze significative ( $p=0.23$ ) nella prevalenza della delezione dell'esone 3 del GHR tra Pigmei e Bantu.

## Discussione

I nostri dati mostrano che i livelli basali di GH sono entro i range di normalità e non significativamente diversi tra Pigmei e Bantu, mentre i livelli circolanti di GHBP e IGF-I sono significativamente ridotti nei Pigmei, in accordo con i risultati di studi precedenti e confermando la presenza di anomalie nell'asse GH/IGF-I. La ridotta secrezione di IGF-I, anche in seguito a somministrazione esogena di GH, ha fatto ipotizzare la presenza di anomalie a livello del recettore del GH [8], come osservato nella sindrome di Laron [12], escludendo una condizione di bassa statura dovuta ad una ridotta attività biologica del GH [13].

L'espressione genica del GHR è risultata essere significativamente e marcatamente ridotta (8 volte più bassa) nei Pigmei rispetto ai Bantu, così come l'espressione genica del GH, anche se in misura minore (1.8 volte più bassa). I ridotti livelli di espressione non sono però associati ad alcuna variante del gene che codifica per il GHR, in quanto non sono state trovate né mutazioni né polimorfismi rilevanti dopo sequenziamento diretto di questo gene. Al contrario, in studi precedenti era stato trovato un polimorfismo, potenzialmente rilevante, nella regione promotrice del gene GHR in due gruppi di popolazione pigmea. Era pertanto stato ipotizzato un possibile meccanismo di *linkage disequilibrium* con una alterazione significativa. Comunque, a favore dei nostri dati, in un recente studio di Lettre *et al.* non sono state trovate associazioni tra la statura e i comuni polimorfismi, nemmeno il polimorfismo dell'esone 3 del GHR [14]. Questi risultati sono biologicamente accettabili in quanto i bambini Pigmei hanno un normale profilo endocrino e suggeriscono che possano esservi effetti epigenetici o epistatici per spiegare la ridotta espressione del GHR. Infatti, il ritmo di crescita, i livelli di IGF-I e GHBP non sono significativamente ridotti nella prima infanzia e i livelli di IGF-II sono normali. Alla pubertà, i livelli di IGF-II sono ancora normali ma i Pigmei non presentano l'aumento fisiologico di IGF-I e GHBP e nemmeno lo spurt di crescita normalmente osservato negli adolescenti caucasici e Bantu [15]. Fattori epigenetici che potrebbero modificare l'espressione genica del GHR includono, per esempio, gli effetti della dieta; infatti, è stato dimostrato che la presenza di acidi grassi saturi riduce l'espressione del GHR tramite un rimodellamento della cromatina [16]. Interazioni epistatiche tra geni in due o più loci possono anche portare a modificazioni fenotipiche che possono rendere un tratto più o meno dominante.

I nostri dati suggeriscono che fattori ancora non identificati, al di fuori dei geni dell'asse GH/IGF-I, potrebbero influenzare i livelli di espressione dei geni GH e GHR. Recenti studi sulla statura umana mostrano che il numero di geni potenzialmente coinvolti in questo processo fisiologico è estremamente alto. Da recenti studi è inoltre emerso che i Pigmei, a differenza della popolazione Bantu, non mostrano l'aumento secolare della statura (1910-2010), nonostante il miglioramento delle loro condizioni igieniche e sanitarie [17]. Questi dati rappresentano un'ulteriore conferma all'ipotesi che meccanismi

genetici non ancora conosciuti siano alla base della bassa statura Pigmea e che tali mutazioni risiedano probabilmente nell'asse GH-IGF-I. In conclusione, i nostri dati che mostrano nei Pigmei ridotti livelli di IGF-I e GHBP associati ad una marcata riduzione dell'espressione genica del GHR, rappresentano un punto di partenza per future ricerche atte ad individuare effetti epigenetici ed epistatici.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. Statura e BMI espressi in termini di SDS nei soggetti Pigmei e Bantu.**

	Altezza	BMI
<b>Bantu</b>	-0.61±0.85	0.26±1.03
<b>Pigmei</b>	2.44±1.00	-0.35±0.60

**Tabella 2. Risultati di laboratorio nei soggetti Bantu e Pigmei. I valori sono espressi come media±deviazione standard (Abbreviazioni: \*p<0.05 verso i Bantu).**

	GH (ng/ml)	GHBP (pmol/l)	IGF-I (ng/ml)
<b>Bantu</b>	1.639±2.169	806±654	176±97
<b>Pigmei</b>	2.486±2.646	325±173*	121±47*

**Tabella 3. Espressione dei geni GH e GHR (incremento rispetto all'espressione del gene HPRT) e rapporti tra i livelli plasmatici di GH e GHBP e tale espressione. I risultati sono espressi come media±deviazione standard. (Abbreviazioni: \*p < 0.001 verso i Pigmei).**

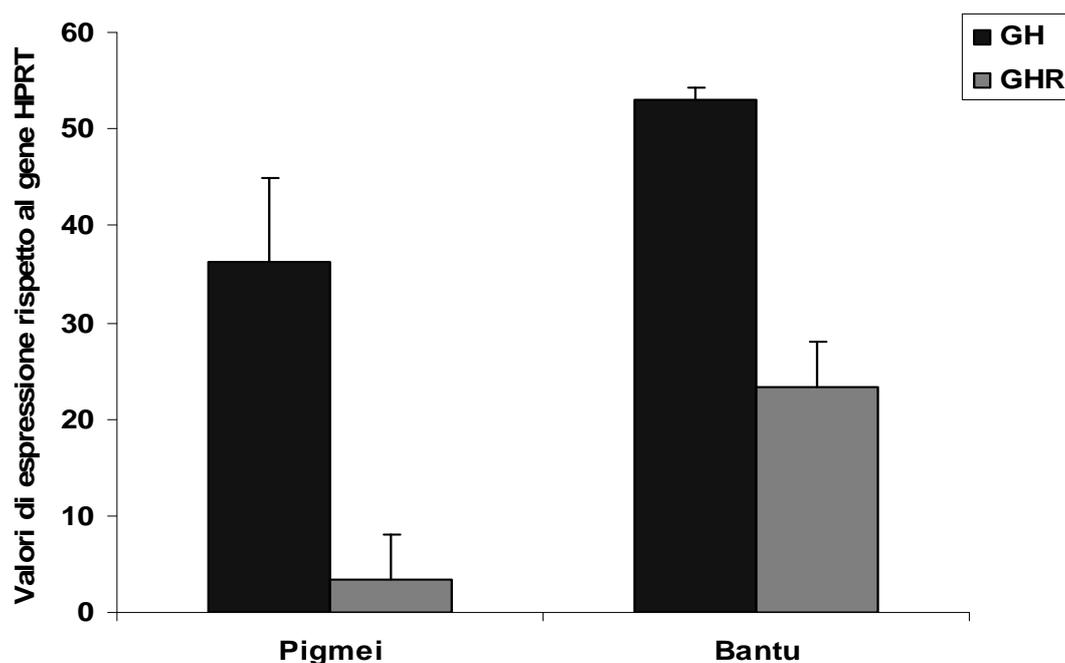
	GH	GHR	Livelli di GH/ espressione del gene GH	Livelli di GHBP/ espressione del gene GHR
<b>Bantu</b>	52.975±4.734	23.32±4.698	0.031	34.562
<b>Pigmei</b>	36.301±8.59*	3.298±1.421*	0.068	98.544

**Tabella 4. Prevalenza della frequenza allelica dei polimorfismi del gene GHR nei Bantu (n=14), nei Pigmei (n=35) e in controlli caucasici (n=300).**

Controlli	Polimorfismo	Esone	Bantu	Pigmei
A 0.886	IVS1 -121 A > G	5'UTR*	A 0.482	A 0.363
G 0.115			G 0.518	G 0.637
C 0.982	IVS5 +9 C > T	Esone 5	C 1.00	C 0.92
T 0.18			T 0.00	T 0.8
A 0.614	p.[Gly186Gly]	Esone 6	A 0.687	A 0.846
G 0.386			G 0.313	G 0.154
T 0.987	IVS6 +13 T > C	Esone 6	T 0.937	T 1.00
C 0.13			C 0.63	C 0.00
G 0.961	IVS7 -9 G > A	Esone 8	G 0.937	G 0.923
A 0.39			A 0.63	A 0.77
A 0.645	p.[Ile544Leu]	Esone 10	A 0.937	A 0.885
C 0.355			C 0.63	C 0.115

**Tabella 5. Prevalenza dell'allele con delezione dell'esone 3 del gene GHR nella popolazione Africana (dati ricavati dallo studio di Millard *et al.* del 2008 [18]), nei Pigmei e nei Bantu.**

	$\Delta 3$	Wt
<b>Africani (17)</b>	0.47	0.53
<b>Pigmei (35)</b>	0.44	0.56
<b>Bantu (14)</b>	0.40	0.60



**Figura 1. Valori di espressione dei geni GH (nero) e GHR (bianco) (normalizzati rispetto al gene HPRT ed espressi in unità arbitrarie) nei Pigmei e nei Bantu.**

### Bibliografia

1. Diamond JM. Why are pygmies small? *Nature* 1991;354:111-112.
2. Cavalli Sforza LL. African Pygmies: An Evaluation of the State of Research.. *African Pygmies. Orlando: Academic Press* 1986:361-395.
3. Bailey RC. The comparative growth of Efe pygmies and African farmers from birth to age 5 years. *Ann Hum Biol* 1991;18:113-120.
4. Migliano AB, Vinicius L, Lahr MM. Life history trade-offs explain the evolution of Pygmies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20216-20219.
5. Merimee TJ, Rimoin DL, Cavalli Sforza LL et al. Metabolic effects of human growth hormone in African Pygmy. *Lancet* 1968;2:194-195.
6. Merimee TJ, Rimoin DL, Cavalli Sforza LL. Metabolic studies in African Pygmy. *J Clin Invest* 1972;51:395-401.
7. Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER. Dwarfism in the Pygmy: an isolated deficiency of IGF-1. *New Engl J Med* 1981;305:965.
8. Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors (IGFs) in Pygmies and subjects with the pygmy trait: characterization of the metabolic actions of IGF-I and IGF-II in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55:1081-1088.

9. Baumann G, Shaw MA, Merimee TJ. Low levels of high-affinity growth hormone-binding protein in African Pygmies. *New Engl J Med* 1989;320:1705-1709.
10. Merimee TJ, Hewlett B, Wood W et al. The GH receptor gene in african pygmy. *Trans Ass Am Phys* 1989;120:163-169.
11. Elmlinger M, Khunel W, Weber M et al. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clin Chem Lab Med* 2004;42:654-664.
12. Laron Z, Pertzalan A, Mannheimer S. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone- a new inborn error of metabolism. *Isr J Med Sci* 1966;2:152-155.
13. Kowarski A, Schneider J, Ben-Galim E et al. Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. *J. Clin Endocrinol Metab* 1978;47:461-464.
14. Lettre G, Butler JL, Ardlie KG et al. Common genetic variation in eight genes of the GH/IGF1 axis does not contribute to adult height variation. *Hum Genet* 2007;122:129-139.
15. Merimee TJ, Zaff J, Hewlett B et al. Insulin-like growth factors in Pygmies. The role of puberty in determining final stature. *N Engl J Med* 1987;316:906-911.
16. Thimmarayappa J, Sun J, Schultz LE et al. Inhibition of growth hormone receptor gene expression by saturated fatty acids: role of Kruppel-like zinc finger factor, ZBP-89. *Mol Endocrinol* 2006;20:2747-2760.
17. Travaglino P, Meazza C, Biddeci G et al. Secular trends in growth of African Pygmies and Bantu. *Hormones (Athens)* 2011;10:144-148.
18. Millard DS, Lewis MD, Horan M et al. Growth hormone (GH1) gene variation and the growth hormone receptor (GHR) exon 3 deletion polymorphism in a West-Africa population. *Mol Cell Endocrinol* 2008;296:18-25.