

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**ALBERTINA GOMES RODRIGUES**

**A PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO ESTATURAL NA INFÂNCIA  
ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES**

**São Paulo**

**2020**

**ALBERTINA GOMES RODRIGUES**

**A PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO ESTATURAL NA INFÂNCIA  
ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES**

**Tese Apresentada à  
Universidade Nove de Julho Para Obtenção  
Do Título de Doutor em Ciências da Saúde**

**Orientador: Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho**

**São Paulo**

**2020**

2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Albertina Gomes

A predição do crescimento estatural na infância através de marcadores moleculares . / Albertina Gomes Rodrigues. 2020.

134 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho

1. Velocidade de crescimento. 2. Crescimento. 3. Crianças. 4. Adolescentes. 5. Genes. 6. RNA

I. Camacho, Cléber Pinto. II. Título

CDU 616



São Paulo 14 de dezembro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: ALBERTINA GOMES RODRIGUES

Título da tese: A PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO ESTATURAL NA INFÂNCIA ATRAVÉS DE MARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES

Presidente: PROF. DR. CLEBER PINTO CAMACHO

Membro: PROFA. DRA. MARCIA SILVA QUEIROZ

Membro: PROF. DR. ADRIANO NAMO CURY

Membro: PROF. DR. GIL GUERRA JÚNIOR

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Nove de Julho, pela oportunidade de desenvolver meu trabalho como professora, bem como pela realização do meu Doutorado.

Ao Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho, por ter aceitado ser meu orientador, pelos ensinamentos que todo o dia me traz, pela paciência comigo e pelo exemplo de trabalho e entusiasmo para com a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Humberto Dellê pela participação, junto ao Prof. Dr. Cleber Pinto Camacho, na condução da pesquisa.

Ao meu sempre querido professor Prof. Dr. Carlos Alberto Longui, com quem tive a honra de aprender Endocrinologia Pediátrica, pela incansável dedicação ao conhecimento, aos alunos e aos pacientes, minha eterna gratidão e carinho.

Aos meus queridos professores Prof. Dr. Osmar Monte e Prof. Luis Eduardo Procópio Calliari, que me ensinaram muito, desde minha fase de residência até os dias de hoje.

Ao Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional (LEMT) da Disciplina de Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina, Departamento de Endocrinologia, ao Prof. Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel, à Profa. Dra. Maria Izabel Chiamolera, pelo suporte vital neste estudo.

Ao Conjunto Hospitalar do Mandaqui, com um agradecimento especial à enfermeira responsável técnica pelo Laboratório Central, Maria Aparecida de Alexandria Akasaka, pela gentileza e carinho com o qual recebeu a mim e aos participantes deste estudo no laboratório.

.

Aos colegas Andréa Harumy de Lima Hirata, Robson José de Almeida, Valdelena Alessandra da Silva e Luiz Antônio de Jesus Rocha, que muito me ajudaram e ensinaram em toda a pesquisa.

Aos colegas Marcia Maria Giacon Giusti, Mariana de Almeida Camargo Lautenschlager, Yone de Oliveira Di Sarli, Miriam Duarte de Arruda Motta pela parceria em estudos e motivações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio ao programa de pós graduação *Strito Sensu*, em Medicina da Universidade Nove de Julho.

Este projeto teve o fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob número 2014/04193-0 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob número 422445/2016-9 e a Capes ao Programa de Pós Graduação *strictu sensu* de Medicina da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

## RESUMO

O crescimento estatural de uma criança é determinado por uma herança genética poligênica. Durante a infância, vários fatores podem modificar o curso esperado deste desenvolvimento, tais como padrão nutricional, estilo de vida, estados de doença. Em inúmeras situações, frente a um paciente pediátrico, a expectativa de como será sua velocidade de crescimento em estatura é extremamente relevante: quer seja na introdução de uma nova terapia, quer seja em que momento efetuar a retirada desta. Ainda, em algumas situações, a identificação de como será o ritmo de crescimento longitudinal nos próximos meses pode contribuir no diagnóstico e tomada de decisão frente a este diagnóstico. A identificação de um marcador que apresentasse um caráter preditivo quanto ao crescimento seria extremamente relevante. A partir de um transcriptoma de indivíduos adultos com estado de doença (TSH alterado), muito relevante quanto ao crescimento estatural na infância, o objetivo deste estudo foi: selecionar genes que pudessem se correlacionar com o crescimento na infância e associar os genes selecionados com parâmetros de crescimento em crianças e adolescentes. A medida da expressão relativa de 2 dos 5 genes selecionados neste estudo (*ADAMTS10* e *IGF1-R*), ajustados (regressão logística) por idade e a medida do IGF-1 plasmático, conseguiu diferenciar, quanto ao desfecho crescimento, crianças e adolescentes normais. Ainda, foi identificada correlação entre todos os transcritos selecionados e o HDL-C, fato que pode estar associado ao papel do HDL-C como transportador de microRNA ou outros interferentes com ação sobre o RNAm.

**Palavras-chave:** velocidade de crescimento, crescimento, crianças, adolescentes, genes, RNA

## ABSTRACT

A child's stature growth is determined by a polygenic genetic inheritance. During childhood, several factors can modify the expected course of this development, such as a nutritional pattern, lifestyle, disease states. In countless situations, in front of a pediatric patient, the expectation of how the height velocity will be in height is extremely relevant: either in the introduction of a new therapy, or at what time to withdraw it. Still, in some situations, the identification of how the rhythm of longitudinal growth will be in the coming months can contribute to the diagnosis and decision making regarding this diagnosis. The identification of a marker that had a predictive character regarding growth would be extremely relevant. Based on a transcriptome of adult individuals with a disease state (altered TSH), which is very relevant in terms of height growth in childhood, the objectives of this study were: to select genes that could correlate with childhood growth and to associate the selected genes with growth in children included in this analysis. The measurement of the relative expression of 2 of the 5 genes selected by us (*ADAMTS10* and *IGF1\_R*), adjusted (logistic regression) by age and the measurement of plasma IGF-1, managed to differentiate, in terms of the growth outcome, healthy children and adolescents. Furthermore, correlation was identified between all selected transcripts and HDL-C, a fact that may be associated with the role of HDL-C as a microRNA transporter or other interfering agents with action on mRNA.

**Keywords: height velocity, growth, children, adolescents, genes, RNA**



# ÍNDICE

RESUMO.....	05
ABSTRACT .....	06
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	17
LISTA DE SÍMBOLOS .....	20
1.0 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Crescimento e desenvolvimento durante a infância .....	21
1.2 Crescimento ósseo .....	22
1.2.1 Regulação local da placa de crescimento .....	23
1.2.2 Regulação sistêmica da placa de crescimento.....	24
1.2.3 Regulação genética do crescimento ósseo .....	26
1.2.4 Diagnóstico por biologia molecular.....	27
1.2.5 Diagnóstico por biologia molecular no crescimento.....	28
2.0 OBJETIVOS.....	29
3.0 METODOLOGIA .....	30
3.1 Seleção de indivíduos saudáveis e pacientes .....	30
3.2 Seleção de genes .....	33
3.3 Análise da interação de genes .....	34
3.4 Análise estatística .....	35
4.0 RESULTADOS .....	36
4.1 Genes selecionados .....	36
4.2 Participantes selecionados - população total .....	39
4.2.1 Características clínicas dos participantes .....	39
4.2.2 Medidas laboratoriais encontradas na população estudada.....	40
4.2.3 Correlação entre parâmetros clínico-laboratoriais da população estudada.....	41

4.2.4 Medidas da expressão dos genes selecionados .....	45
4.2.5 Correlação entre transcritos .....	46
4.2.6 Correlação entre as medidas dos genes e parâmetros clínicos.....	47
4.2.7 Correlação dos transcritos e medidas laboratoriais .....	47
4.2.8 Correlação dos transcritos e lípides - pacientes sem excesso de peso.....	49
4.2.9 Impacto da puberdade sobre a medida dos transcritos e do HDL-C.....	49
4.2.10 Correlação entre os transcritos, ajustados pelo HDL e variáveis clínicas.....	50
4.2.11 Correlação entre os transcritos, ajustados por idade , e variáveis clínicas.....	51
4.2.12 Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e HDL e variáveis clínicas.....	51
4.2.13 Correlação entre os transcritos, ajustados por IGF-1 e variáveis clínicas.....	52
4.2.14 Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e IGF-1 e variáveis clínicas.....	53
4.2.15 Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1, com Z-score da velocidade de crescimento (Zvc).....	54
4.2.16 Diferença na medida da expressão dos genes, ajustados por idade e medida do IGF-1, entre a população estudeado crescendo de forma adequada (Zvc > 0) e aquela crescendo inadequadamente.....	57
4.3 Participantes selecionados - população normal .....	60
4.3.1 Características clínicas dos participantes .....	60
4.3.2 Medidas laboratoriais encontradas .....	62
4.3.3 Correlação entre parâmetros clínico-laboratoriais .....	63
4.3.4 Medidas da expressão dos genes selecionados .....	67
4.3.5 Correlação entre transcritos .....	67
4.3.6 Correlação entre as medidas dos genes e parâmetros clínicos.....	68

4.3.7	Correlação dos transcritos e medidas laboratoriais .....	68
4.3.8	Correlação dos transcritos e lípides - pacientes sem excesso de peso.....	70
4.3.9	Correlação entre os transcritos, ajustados pelo HDL, e variáveis clínicas e .....	70
4.3.10	Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e variáveis clínicas.....	72
4.3.11	Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e HDL, e variáveis clínicas.....	73
4.3.12	Correlação entre os transcritos, ajustados por IGF-1, e variáveis clínicas.....	74
4.3.13	Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e IGF-1, e variáveis clínicas.....	74
4.3.14	Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1, com Z-score da velocidade de crescimento(Zvc).....	76
4.3.15	Diferença na medida da expressão dos genes, ajustados por idade e medida do IGF-1, entre a população estudada crescendo de forma adequada (Zvc > 0) e aquela crescendo inadequadamente(Zvc < 0).....	78
4.3.16	Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1, com Z-score da velocidade de crescimento corrigida pela idade óssea(Zvc_IO).....	81
4.3.17	Diferença na medida da expressão dos genes, ajustados por idade e medida do IGF-1, entre a população estudada crescendo de forma adequada (Zvc_IO > 0) e aquela crescendo inadequadamente (Zvc_IO < 0).....	84
4.4	Participantes selecionados - população com TSH alterado.....	87
4.4.1	Características clínicas dos participantes.....	87
4.4.2	Medidas laboratoriais encontradas .....	88
4.4.3	Correlação entre parâmetros clínico-laboratoriais .....	89
4.4.4	Medidas da expressão dos genes selecionados .....	92
4.4.5	Correlação entre transcritos.....	93

4.4.6	Correlação entre as medidas dos genes e parâmetros clínicos.....	93
4.4.7	Correlação dos transcritos e medidas laboratoriais.....	94
4.4.8	Correlação entre os transcritos, ajustados pelo HDL e variáveis clínicas.....	96
4.4.9	Correlação entre os transcritos, ajustados por idade, e variáveis clínicas.....	97
4.4.10	Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e HDL, por IGF-1, por IGF-1 e idade ; com variáveis clínicas.....	97
4.5	Associação entre os genes selecionados neste estudo e os principais genes relacionados à condrogênese.....	101
4.6	Associação entre os genes selecionados neste estudo e os principais genes relacionados ao HDL.....	103
4.7	Associação entre os genes selecionados neste estudo e os principais genes relacionados ao HDL colesterol e à condrogênese.....	104
4.8	microRNAs mais abundantemente encontrados em HDL-C em indivíduos normais - interação entre os alvos .....	105
5.0	DISCUSSÃO.....	110
6.0	CONCLUSÃO .....	115
ANEXO 1	.....	116
ANEXO 2	.....	119
ANEXO 3	.....	121
ANEXO 4	.....	122
ANEXO 5	.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.....	130

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de genes selecionados para determinação da expressão relativa e associação com os parâmetros de crescimento da população estudada. Na lista apresentamos o nome dos genes, a localização citogenética, as coordenadas genômicas e o código deste gene no site do Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, [HTTPS://www.omim.org/](https://www.omim.org/))

Tabela 2 - Características Clínicas da População Estudada

Tabela 3 - Medidas Laboratoriais da População Estudada

Tabela 4 – Correlação entre os Parâmetros Clínicos da População Estudada

Tabela 5- Correlação entre os Parâmetros Clínicos e Medidas Laboratoriais

Tabela 6- Correlação entre medidas hormonais e demais medidas

Tabela 7- Correlação entre lípides com demais medidas laboratoriais

Tabela 8- Medida da expressão relativa dos genes avaliados no estudo

Tabela 9 – Correlação entre os Transcritos

Tabela 10 – Correlação entre a medida dos genes e parâmetros clínicos

Tabela 11- Correlação da expressão relativa dos transcritos circulantes com medidas laboratoriais

Tabela 12 – Correlação da expressão relativa dos Transcritos e Lípides – População Sem Excesso de Peso

Tabela 13- Impacto da Puberdade Sobre a Medida dos transcritos e do HDL-C

Tabela 14 – Correlação dos transcritos, ajustados pelo HDL, e variáveis clínicas

Tabela 15 – Correlação dos transcritos, ajustados por idade e variáveis clínicas

Tabela 16 – Correlação dos transcritos, ajustados por idade e HDL-C e variáveis clínicas

Tabela 17 – Correlação dos transcritos, ajustados pelo IGF-1 e variáveis clínicas

Tabela 18 – Correlação dos transcritos, ajustados por idade e pelo IGF-1 e variáveis clínicas

Tabela 19 – Área sobre a Curva – genes transcritos e velocidade de crescimento (Zvc)

Tabela 20 - Características Clínicas da População Normal

Tabela 21 - Medidas Laboratoriais da População Normal

Tabela 22- Correlação entre os Parâmetros Clínicos da População Normal

Tabela 23 - Correlação entre os Parâmetros Clínicos e Medidas Laboratoriais- População Normal

Tabela 24 - Correlação entre medidas hormonais e demais medidas – População Normal

Tabela 25 - Correlação entre lípidos com demais medidas laboratoriais – População Normal

Tabela 26 - Medida da expressão relativa dos genes avaliados – População Normal

Tabela 27 - Correlação entre os Transcritos – População Normal

Tabela 28 - Correlação dos Transcritos e Variáveis clínicas – População Normal

Tabela 29 - Correlação da expressão relativa dos transcritos com Medidas Laboratoriais – População Normal

Tabela 30 - Correlação da expressão relativa dos Transcritos e Lípidos – População Normal Sem Excesso de Peso

Tabela 31 - Correlação dos transcritos, ajustados pelo HDL, e variáveis clínicas – População Normal

Tabela 32 - Correlação dos transcritos, ajustados por idade e variáveis clínicas – População Normal

Tabela 33 - Correlação dos transcritos, ajustados por idade e HDL-C e variáveis clínicas – População Normal

Tabela 34 - Correlação dos transcritos, ajustados pelo IGF-1 e variáveis clínicas – População Normal

Tabela 35 - Correlação dos transcritos, ajustados por idade e pelo IGF-1 e variáveis clínicas – População Normal

Tabela 36 - Área sobre a Curva – genes transcritos e velocidade de crescimento (Zvc) – População Normal

Tabela 37 - Área sobre a Curva – genes transcritos e velocidade de crescimento corrigida pela idade óssea (Zvc\_IO) – População Normal

Tabela 38 - Características Clínicas da População Estudada - Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 39 - Medidas Laboratoriais da População Estudada – Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 40 – Correlação entre os Parâmetros Clínicos da População Estudada- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 41 - Correlação entre os Parâmetros Clínicos e Medidas Laboratoriais- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 42- Correlação entre medidas hormonais e demais medidas- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 43 - Correlação entre lípidos com demais medidas laboratoriais- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 44- Medida da expressão relativa dos genes avaliados no estudo- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 45 – Correlação entre os Transcritos- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 46 – Correlação entre a medida dos genes e parâmetros clínicos- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 47- Correlação da expressão relativa dos transcritos circulantes com medidas laboratoriais- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 48 – Correlação dos transcritos, ajustados pelo HDL, e variáveis clínicas- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 49 – Correlação dos transcritos, ajustados por idade e variáveis clínicas- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 50 – Correlação dos transcritos, ajustados por idade e HDL-C e variáveis clínicas- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 51 – Correlação dos transcritos, ajustados pelo IGF-1 e variáveis clínicas- Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Tabela 52 – Correlação dos transcritos, ajustados por idade e pelo IGF-1 e variáveis clínicas- Crianças e Adolescentes com TSH alterado



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1 com  $Z_{vc}$  categorizada: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1-R* (C), *LMNA* (D) e *TRPS1* (E) – Curvas ROC população total:

Figura 2 – Medida dos genes ajustados por idade e IGF-1 na população crescendo adequadamente ( $Z_{vc} > 0$ ) e na crescendo inadequadamente ( $Z_{vc} < 0$ ). Respectivamente seguem abaixo: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1-R* (C), *LMNA* (D) e *TRPS1* (E)

Figura 3 – Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1 com  $Z_{vc}$  categorizada: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B) e *IGF1-R* (C) – Curvas ROC – população normal

Figura 4 - Medida dos genes ajustados por idade e IGF-1 na população crescendo adequadamente ( $Z_{vc} > 0$ ) e na crescendo inadequadamente ( $Z_{vc} < 0$ ). Respectivamente seguem abaixo: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1-R* (C)

Figura 5 - Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1 com  $Z_{vc\_IO}$  categorizada: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1-R* (C) e *TRPS1* – Curvas ROC – população normal

Figura 6 - Medida dos genes ajustados por idade e IGF-1 na população crescendo adequadamente ( $Z_{vc\_IO} > 0$ ) e na crescendo inadequadamente ( $Z_{vc\_IO} < 0$ ). Respectivamente seguem abaixo: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1-R* (C) e *TRPS1* (D)

Figura 7– Venn entre genes selecionados e genes relacionados à condrogênese

Figura 8 – Network entre genes selecionados e genes relacionados à condrogênese

Figura 9 – Network entre genes selecionados no estudo e genes relacionados ao HDL

Figura 10 – Network entre genes selecionados e genes relacionados à condrogênes e ao HDL

Figura 11 – Interação proteína-proteína entre miR-135a\* e seus genes alvo

Figura 12 – Interação proteína-proteína: genes de nosso estudo e genes alvo do miR-135a\*

Figura 13 – Interação proteína-proteína: genes de nosso estudo e genes alvo do miR-135a\*

Figura 14 – Interação proteína-proteína entre miR-188-5p e seus genes alvo

Figura 15 – Interação proteína-proteína: genes de nosso estudo e genes alvo do miR-188-5p

Figura 16 – Interação proteína-proteína: genes de nosso estudo e genes alvo do miR-188-5p

Figura 17 – Interação proteína-proteína entre miR- 877 e seus genes alvo

Figura 18 – Interação proteína-proteína: genes de nosso estudo e genes alvo do miR-877

Figura 19 – Interação proteína-proteína: genes de nosso estudo e genes alvo do miR-877

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcTPO - Anticorpo Anti-Tireoperoxidase

AcTg - Anticorpo Anti-Tiroglobulina

ALT – Aminotransferase de Alanina

Apo A-I – Apolipoproteína 1A

AST – Aminotransferase de Aspartato

BMP- Proteína Morfogênica Óssea

BMP4 - Proteína Morfogênica Óssea do Tipo 4

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC – Center for Disease Control

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CNP – Peptídeo Natriurético tipo C

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Delta Ze – Diferença entre Ze e Zth

DHT – Di-hidrotestosterona

DIO2 – Desiodinase do tipo II

DIO3 – Desiodinase do tipo III

DP – desvio-padrão

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FGF – Fator de Crescimento do Fibroblasto

FGFR3 – Receptor 3 do Fator de Crescimento do Fibroblasto

GH - Hormônio do Crescimento

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IGF-1 - Fator de Crescimento Insulina-like tipo 1

IGF-2 - Fator de Crescimento Insulina-like tipo 2

IGFBP3 – Proteína Transportadora do IGF do Tipo 3

IGFBP5 – Proteína Transportadora do IGF do Tipo 5

IHH – Proteína Indian Hedgehog

LEMT - Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – Micro RNA

NCHS – National Center for Health Statistics

NGS – Sequenciamento de última geração

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR-RT - Reação de cadeia da polimerase em tempo real

PPR – Proteína Relacionada ao Paratormônio

PTH – Paratormônio

RE – Expressão Relativa

RNA- Ácido Ribonucleico

TA – Termo de Assentimento

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF $\beta$  – Fator de Crescimento Transformador $\beta$

TGO – Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP – Transaminase Glutâmico-Pirúvica

TH – Estatura Alvo Familiar

TSH - Hormônio estimulador da tireoide

T3 – tri-iodotironina

T4I – Tetraiodotironina Livre

VC – Velocidade de Crescimento

VCM – Volume Corpuscular Médio

CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

Ze – Z score da estatura

Zvc – Z score da velocidade de crescimento

Zvc\_IO – Z-score da velocidade de crescimento corrigida pela idade óssea

Zvc\_categorizada – Z-score da velocidade de crescimento categorizada

Zth – Z score da estatura alvo familiar

1 $\alpha$ 25(OH)2D3 – 1 alfa 25 di-hidroxitamina D3

24,25(OH)2D3 – 24,25 di-hidroxitamina D3

## LISTA DE SÍMBOLOS

fl = fentolitro

g/dL – grama por decilitro

mU/L – Mili unidades por litro

mcg – Micrograma

mg/dL – miligrama por decilitro

ng/dL – nanograma por decilitro

$\mu$ UI/mL – Micro unidades internacionais por mililitros

UI/L – Unidades internacionales por litro

UI/mL – Unidades internacionales por mililitros

## **1.Introdução**

### **1.1. Crescimento e Desenvolvimento Durante a Infância**

O crescimento estatural de uma criança é determinado por uma herança familiar poligênica, bem como pelo ambiente disponível a ela (padrão nutricional, emocional, estilo de vida, estados de doença). A manutenção do bom funcionamento tecidual é fundamental para o crescimento e desenvolvimento. A exposição às doenças crônicas ou de repetição é a principal causa de déficit de crescimento (1). Porém, dentre as causas endócrinas, o hipotireoidismo é a principal causa de baixa estatura e baixa velocidade de crescimento (2).

Para avaliar o crescimento de uma criança, mensuramos sua estatura, através de metodologia já estabelecida internacionalmente e a comparamos com padrão de referência (3). Para tal, existem curvas de referência que foram elaboradas de forma transversal, como foram criadas as do National Center for Health Statistics-NCHS, Center for Disease Control – CDC e as de Marques & Marcondes (1, 4, 5). No entanto, a partir de 2006 as curvas de referência da OMS (Organização Mundial da Saúde) são as recomendadas (6). Isto se deve ao fato destas curvas terem sido elaboradas com a inclusão de crianças e lactentes oriundos de 4 continentes, apenas crianças saudáveis, que haviam recebido aleitamento materno enquanto lactentes, bem como com condições de vida similares. Além, houve uniformidade metodológica na coleta dos dados.

Muito mais importante do que a medida de estatura para avaliar o crescimento de uma criança é, com certeza, a medida da velocidade de crescimento. Ela representa como, naquele momento, os fatores interferentes sobre o crescimento ósseo estão atuando. Esta medida, no entanto, é um dado dinâmico e que necessita de uma avaliação seriada de estatura com um intervalo superior a 3 meses. Como curva de referência para avaliar velocidade de crescimento, o ideal é a utilização de curvas elaboradas de forma longitudinal. Até o momento, utilizada ainda de forma universal, existe apenas a curva de Tanner (7, 8).

Em inúmeras situações, frente a um paciente pediátrico, a expectativa de como será sua velocidade de crescimento em estatura é extremamente relevante: quer seja na introdução de uma nova terapia, quer seja em que momento efetuar a retirada desta. Ainda, em algumas situações, a identificação de como será o ritmo de crescimento longitudinal nos próximos meses pode contribuir tanto para o diagnóstico, quanto para a tomada de decisão frente a este diagnóstico.

## **1.2. Crescimento Ósseo**

O crescimento estatural ocorre, principalmente, pelo desenvolvimento longitudinal ósseo, através da diferenciação e proliferação das células localizadas na cartilagem da placa de crescimento epifisário.

A placa de crescimento, localizada na porção distal dos ossos longos, é composta por três regiões bem definidas. A mais próxima à epífise é a zona germinativa (ou de repouso), constituída de células relativamente pequenas e em estado quiescente. A seguir, tem-se a zona proliferativa, constituída por condrócitos achatados, dispostos de forma longitudinal ao osso, formando colunas. Estas células são produtoras de colágeno dos tipos II e XI. Por fim, a zona hipertrófica, mais distal em relação à epífise, constituída por condrócitos hipertróficos que perderam a capacidade de se dividir.

A transformação morfológica na placa de crescimento é determinada pela expressão de genes específicos; regulada por hormônios e fatores de crescimento, tanto em nível local, quanto sistêmico.



### 1.2.1. Regulação Local da Placa de Crescimento

Os principais determinantes da formação óssea são:

Proteínas Morfogênicas Ósseas (BMPs): estas proteínas são fatores de diferenciação e crescimento. Participam de todos os estágios da formação óssea endocondral. Agem tanto na diferenciação das células da zona germinativa para a zona proliferativa, quanto na diferenciação das células da zona proliferativa para a zona hipertrófica. Encontram-se em maior concentração na zona hipertrófica e em menor concentração na zona germinativa (9).

Fatores de Crescimento dos Fibroblastos (FGFs): os FGFs modulam a condrogênese e participam de todos os estágios de formação óssea endocondral. Eles atuam através do receptor 3 do fator de crescimento dos fibroblastos (FGFR3). A mutação ativadora no gene desse receptor leva à acondroplasia. Tanto os fatores de crescimento dos fibroblastos, quanto seus receptores contribuem para a senescência da placa de crescimento e, portanto, ajudam a determinar o tamanho do esqueleto na vida adulta (10).

Proteínas Indian hedgehog (Ihh): são responsáveis pela diferenciação e proliferação dos condrócitos, bem como pela diferenciação dos osteoblastos. A proteína Ihh é secretada pelos condrócitos hipertróficos simultaneamente com o aumento da expressão do gene do receptor da proteína relacionada ao PTH (PPR). A proteína Ihh vai até a zona germinativa e conduz a um aumento da expressão da proteína relacionada ao PTH. Esta proteína produzida na zona germinativa tem o papel de lentificar a diferenciação dos condrócitos em hipertróficos (11). Assim, forma-se um *feedback* entre essas proteínas.

Peptídeo Natriurético tipo C (CNP): atua como modulador do crescimento do osso endocondral. Ele promove condrogênese por estimular a expressão de moléculas envolvidas na adesão celular e na síntese de glicosaminoglicanos (12).

Fatores Vasculares: apesar da placa de crescimento ser uma estrutura avascular, a vascularização é importante para a substituição do tecido de cartilagem por tecido ósseo, durante a ossificação endocondral (13).

Vitamina D: a vitamina  $1\alpha 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  regula localmente a cartilagem da placa de crescimento. Os condrócitos menos diferenciados respondem à  $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ , enquanto que os mais diferenciados (zona proliferativa e hipertrófica), respondem primariamente a  $1\alpha 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ . A deficiência de vitamina D leva ao raquitismo, caracterizado por placa de crescimento desorganizada, mineralização inadequada e alargamento da placa epifisária (14).

Fator de Crescimento Transformador beta ( $\text{TGF}\beta$ ): este fator está envolvido na biomineralização, através da ankyrina, um importante transportador (15).

Panexina: fator de transcrição, que induz à passagem dos condrócitos proliferativos para hipertróficos (16).

Cílica e glicosilfosfatidilinositol (GPI): ambos participam no alinhamento dos condrócitos na zona proliferativa (17).

### **1.2.2. Regulação Sistêmica da Placa de Crescimento:**

#### **Eixo GH/IGF-1**

O hormônio do crescimento (GH) é sintetizado a partir do segundo trimestre da gestação. Durante o desenvolvimento fetal, o fator de crescimento insulina-like 1 (IGF-1) e, principalmente, o fator de crescimento insulina-like 2 (IGF-2) tem papel determinante no crescimento fetal. Após o nascimento, o GH é determinante para o crescimento longitudinal ósseo, exercendo efeitos anabólicos, tanto no osso trabecular, quanto cortical. O GH pode agir diretamente no osso, induzindo à produção de IGF-1 local. No entanto, sua via de ação mais impactante é através do fígado. Neste, sob a ação do GH, ocorre produção de IGF-1, bem como proteínas transportadoras do IGF-1, dos tipos 3 e 5 (IGFBP3, IGFBP5), bem como a subunidade ácido lábil, que auxilia na manutenção do complexo IGF – proteína transportadora. Tanto o IGF-1 oriundo do fígado, quanto o de produção óssea vão determinar seus efeitos no osso. O GH também tem uma ação direta sobre a placa de crescimento. Portanto, tanto GH quanto o IGF-1 (local ou de síntese hepática) terão ação sobre os condrócitos. No entanto, a resposta destes ocorrerá de forma diferente (as células da zona proliferativa e da zona hipertrófica sofrem maior impacto do

que as de repouso). Ainda, o resultado da ação do GH e do IGF-1 sobre os condrócitos não é idêntico: eles causam impacto diferente quanto à intensidade de proliferação e ao aspecto estrutural gerado nos diferentes tipos de condrócitos). Além disso, a ação de ambos sobre a placa de crescimento variará ao longo da infância. Por fim, a interação entre o eixo GH/IGF-1 com outros hormônios, como esteroides sexuais, paratohormônio, insulina, e osteocalcina proporciona ainda regulação maior no metabolismo ósseo (18).

#### Corticóides:

Tanto a cartilagem epifisária, quanto as células ósseas expressam receptores para o glicocorticoide. Nestes locais, os glicocorticoides levam à diminuição da proliferação e hipertrofia dos condrócitos (19). No entanto, seu efeito de interferência no crescimento ósseo melhor documentado é o distúrbio no eixo GH/IGF-1. Ocorre redução da secreção do GH, bem como redução de IGF-1 local na presença de corticoide.

#### Hormônios tireoideanos:

A disponibilidade da tri-iodotironina (T3) em tecido ósseo é modulada pela iodotironina desidiodinase do tipo II (DIO2), bem como pela desidiodinase do tipo III (DIO3). O T3 estimula a diferenciação dos condrócitos hipertróficos e pré hipertróficos e modula a proliferação dos mesmos. Já o TSH (hormônio estimulador da tireoide) tem também ação direta na condrogênese, levando a uma inibição da proliferação dos condrócitos. O T3 ainda promove a diferenciação e proliferação de condrócitos, através da ativação de IGF-1 local. Ainda, estimula a sinalização da BMP4, promovendo a síntese de colágeno. Além disso, estimula a expressão de genes envolvidos na mineralização da matriz da cartilagem do crescimento. A criança muito comprometida pelo hipotireoidismo infantil pode apresentar uma ossificação endocondral inadequada, além de disgenesia epifisária, levando a uma queda no ritmo de crescimento estatural, bem como baixa estatura. (20).

Andrógenos:

Os andrógenos têm, de forma geral, capacidade de estimular o crescimento ósseo. Esta ação pode ser mediada de forma sistêmica (através de estímulo ao eixo GH-IGF-1) ou local. Com relação à sua atividade na placa de crescimento, o tipo de andrógeno é relevante: andrógenos que não sofrem aromatização, como a di-hidrotestosterona (DHT) estimulam o crescimento ósseo (21). Já testosterona local aromatizada pode até interferir negativamente no crescimento, por sua conversão local a estrógeno (22).

Estrógenos:

A expressão de receptores ao estrógeno na placa de crescimento sugere ação direta deste hormônio. No entanto, parte da ação estrogênica no crescimento se dá por estímulo no eixo GH/IGF-1 (13, 23).

Leptina:

A Leptina está associada a um aumento na velocidade de crescimento ósseo. Esta ação parece estar relacionada a um efeito local da mesma (aumento na proliferação de condrócitos) (24).

### 1.2.3. Regulação Genética do Crescimento Ósseo

Centenas de variantes genéticas, em pelo menos 180 *loci* influenciam a estatura do adulto. Estes *loci*, por sua vez, contêm genes que estão conectados por vias metabólicas e que apresentam relação com o crescimento ósseo (25). Muitos desses genes interferem no crescimento ósseo por influenciarem a condrogênese, na placa de crescimento (26).

Os genes associados ao crescimento ósseo podem ser agrupados de acordo com o local no qual eles têm ação. Os genes *ACAN*, *ADAMTS17*, *ADAMTS10*, *COL9A2*, *COL11A1*, *COL27A1*, *FBN1*, *FBN2*, *LTBP2* e *MATN3* são associados à regulação da matriz extracelular. A matriz extracelular consiste de colágeno, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Mutações nesses genes são associadas à baixa estatura, displasia óssea. Este fato sugere que a matriz extracelular exerce um papel importante na regulação da placa de crescimento. Já os genes *CREBBP*, *GNAS*, *PDE3A* e *SOX9* agem em vias de sinalização intracelular. Muitas dessas vias, quando comprometidas, são

associadas a desfecho negativo quanto ao crescimento linear. Os genes *GDF5*, *IGF2*, *IHH*, *NPPC*, *NPR2*, *PTH1R*, *PTHLH* e *WNT5A* estão envolvidos nas vias de sinalização parácrinas. Essa via tem papel significativo na proliferação, hipertrofia e diferenciação dos condrócitos. Os genes *CYP19A1*, *ESR1*, *IGF1R* e *PIK3R1*, por sua vez, estão envolvidos com a sinalização endócrina. Por fim, os genes associados à modulação epigenética são: *DNMT3A* (*quando sofre mutação pode levar à metilação do DNA durante a embriogênese*), *EZH2*, *HIST1H1E*, *NSD1* e *SETD2*. Estes quatro últimos genes, quando sofrem mutação, podem levar à metilação das histonas (27).

Os microRNAs são reguladores epigenéticos da expressão gênica que atuam em nível de pós transcrição. No crescimento, eles têm papel fisiológico tanto na placa de crescimento, quanto no eixo GH-IGF-1. Na placa de crescimento, tem papel modulador, tanto em diferentes estágios de desenvolvimento ósseo, quanto em diferentes tipos de células ósseas (28).

#### **1.2.4. Diagnóstico por Biologia Molecular**

A comunicação intercelular não é realizada apenas pelas citocinas, fatores de crescimento, neurotransmissores ou hormônios em geral, mas também através da troca de pequenas moléculas de RNA. Este pode circular em células, plaquetas, exossomos, livre e ainda dentro de lipoproteínas. O RNA mensageiro (mRNA) e o microRNA (miRNA) são parte de um processo de regulação, onde os mRNAs são fundamentais na síntese proteica, enquanto os miRNA são responsáveis pela destruição do mRNA, interrompendo o processo de síntese, em células próximas ou em tecidos à distância. Transcriptoma é o nome dado a um conjunto de transcritos, isto é; mRNA, miRNA, RNA ribossômicos, RNA transportadores; de um dado organismo, órgão, tecido ou célula. Ele é, portanto, a consequência da expressão dos genes. Para a análise do transcriptoma vem-se utilizando atualmente plataformas de sequenciamento de última geração (NGS), metodologia que vem tornando acessível, em termos de custo, essa quantificação (29). Uma estratégia para avaliar a ação do RNA em tempo real seria a biópsia nos tecidos alvo nos quais ele causa interferência (30). No entanto, este procedimento pode ser substituído através da medida do RNA mensageiro, procedimento já bem estabelecido e bem menos invasivo (31-34). Desta forma, como mRNAs e miRNAs participam de

uma ampla variedade de processos biológicos, uma análise quantitativa destes pode revelar com precisão e em tempo real o funcionamento dos tecidos (35,36).

#### **1.2.5. Diagnóstico por Biologia Molecular no crescimento**

É de consenso geral que avaliações genéticas e epigenéticas não devem ser mandatórias na investigação de crianças com baixa estatura. Podem, no entanto, ser utilizadas em grupos específicos de crianças, tais como as formas graves de deficiência do GH, múltiplas deficiências hormonais hipofisárias, muito baixa estatura ( $< - 3$  desvios padrão em relação à média), crianças com aspectos clínicos compatíveis com síndromes, restrição do crescimento intra uterino e crianças fruto de tecnologias de reprodução assistida. A seleção do teste genético pode ser determinada de acordo com a suspeita diagnóstica envolvida. Podemos, por exemplo, utilizar o cariótipo em sangue periférico para diagnóstico na suspeita de Síndrome de Turner numa menina. Já estudos de metilação podem ser relevantes em crianças nascidas pequenas para a idade gestacional ou por tecnologias de reprodução assistida, pois estes dois perfis de crianças são mais sujeitos à efeitos epigenéticos. Em determinados casos, pode ser necessário o sequenciamento completo do exoma, técnica na qual todos os aproximadamente 20.000 genes codificadores de proteínas são sequenciados. Este estudo representa aproximadamente 2% de todo o genoma, mas acredita-se incluir a maioria das mutações causadoras de doenças (37).

Embora tenhamos alguns métodos por biologia molecular para diagnóstico de causas de baixa estatura, não é descrito na literatura método genético que detecte como se encontra o crescimento estatural da criança num dado momento, ou seja, não existe até agora um marcador preditivo, por biologia molecular, da velocidade de crescimento.

## **2. Objetivos**

2.1. Selecionar genes que pudessem se correlacionar com o crescimento na infância

2.2. Associar os genes selecionados com parâmetros de crescimento em crianças e adolescentes

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Seleção de Indivíduos Saudáveis e Pacientes**

As crianças e adolescentes participantes deste estudo eram oriundas do ambulatório didático de pediatria e de hipotireoidismo infantil da Universidade Nove de Julho, bem como do ambulatório de endocrinologia infantil do Conjunto Hospitalar do Mandaqui, respectivamente sob os números de aprovação do comitê de ética em pesquisa 2.136.486 (CAAE: 6743151700005511) e 2229867 (CAAE: 67431517030015551).

Os participantes fazem parte da população de indivíduos que habitualmente são encaminhados ao serviço de endocrinologia pediátrica do Conjunto Hospitalar do Mandaqui e ao ambulatório didático de pediatria e de hipotireoidismo infantil da Universidade Nove de Julho.

Os familiares responsáveis pelos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1) e os participantes alfabetizados assinaram o Termo de Assentimento (TA) (anexo 2).

Foram incluídos no estudo participantes com faixa etária superior a 2 anos e inferior a 18 anos de idade, ou seja, crianças e adolescentes.

Um primeiro perfil de participantes era composto de indivíduos saudáveis, com estatura e histórico de velocidade de crescimento dentro da normalidade para a população. Também foram incluídos participantes que chegavam ao Serviço com TSH alterado. Este segundo perfil de pacientes poderia apresentar uma maior variabilidade quanto ao crescimento, levando-se em consideração de que um dos sinais clínicos no hipotireoidismo é a redução na velocidade de crescimento e baixa estatura, como já descrito anteriormente. Ainda, foram incluídos participantes com diagnóstico de hipotireoidismo, sob reposição de levotiroxina, dentro do preconizado para faixa etária e peso (38,39). Foram excluídos pacientes em uso de qualquer outro medicamento ou que fossem portadores de outras doenças crônicas ou afecções sistêmicas, que pudessem funcionar como fator de confusão para a medida do RNA. Ainda, foram excluídos pacientes que apresentassem dieta excessiva ou restrita de iodo.



Os participantes foram avaliados clinicamente e, a partir da primeira consulta, foram acompanhados a cada 3 meses para avaliação clínica. Suas medidas antropométricas (peso, estatura), bem como exame clínico completo foram realizados durante seu seguimento, até o momento. Para as crianças e adolescentes, a medida de estatura foi obtida através do estadiômetro de parede (Tonelli®), o peso foi obtido através de balança digital (Filizola®).

A estatura foi corrigida como Z score da estatura ( $Z_e$ ), tomando como referência a estatura média esperada para a faixa etária e sexo, bem como o desvio padrão (dp) para estatura para a faixa etária e sexo, utilizando o aplicativo Anthro Plus desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (40).

A velocidade de crescimento foi avaliada através do Z score da velocidade de crescimento ( $Z_{vc}$ ), de acordo com idade e sexo. O cálculo do  $Z_{vc}$  usou como referência o estudo de Tanner (7, 8). A fórmula para calcular o  $Z_{vc}$  foi :  $(x - m) / dp$ , sendo que x era o valor observado da velocidade de crescimento, m e dp eram, respectivamente, a média e o valor do desvio padrão (dp) da distribuição correspondente à população de referência, de acordo com a idade e sexo.

A velocidade de crescimento também foi analisada, de acordo com o Z-score da velocidade de crescimento, de acordo com sexo e idade óssea ( $Z_{vc\_IO}$ ). O cálculo para esta variável também usou como referência o estudo de Tanner, relatado acima). A fórmula para calcular o  $Z_{vc\_IO}$  foi :  $(x - m) / dp$ , sendo que x era o valor observado da velocidade de crescimento, m e dp eram, respectivamente, a média e o valor do desvio padrão (dp) da distribuição correspondente à população de referência, de acordo com o sexo e a idade óssea do participante (não mais de acordo com a idade cronológica).

A estatura alvo familiar também foi corrigida como Z score da estatura alvo ( $Z_{th}$ ) tomando como referência a estatura média esperada para a estatura na vida adulta e sexo, bem como o desvio padrão para estatura para a vida adulta e sexo, utilizando também o aplicativo Anthro Plus. Ainda, calculamos a diferença entre  $Z_{th}$  e  $Z_e$  (Delta  $Z_e$ ).

Os participantes foram encaminhados para a coleta de sangue periférico. O sangue foi coletado em tubo seco com gel separador para as dosagens bioquímicas. Na avaliação bioquímica foram medidos: TSH

(quimioluminescência - ARCHITECT® - Abbot® referência: de 0,34  $\mu$ IU/mL: até 16  $\mu$ IU/mL (2 semanas a 1 mês), até 9  $\mu$ IU/mL (1 mês a 5 anos), até 6  $\mu$ IU/mL (6 a 18 anos); T4 livre (quimioluminescência – ARCHITECT® - Abbot® referência: 0,54 a 1,60 ng/dL) , colesterol total (colorimétrico-peroxidase- ref < 170mg/dL), HDL colesterol (colorimétrico-enzimático – referência > 45mg/dL), LDL colesterol (eq. de Friedwald referência <110mg/dL), VLDL colesterol (equação de Friedwald referência: 10-50mg/dL ) triglicérides (colorimétrico-peroxidase- referência < 100 mg/dL), IGF-1(ng/mL) (quimioluminescência - Immulite - Siemens® – referência conforme faixa etária) (anexo 3), glicemia (colorimétrico-enzimático referência  $\leq$  99mg/dL), ureia (colorimétrico-enzimático referência:  $\leq$  40mg/dL), creatinina (colorimétrico-Jaffe referência: 0,20 a 0,60 mg/dL), aminotransferase de aspartato (AST) (cinético – IFCC referência: $\leq$  40UI/L sexo feminino,  $\leq$ 50UI/L sexo masculino), aminotransferase de alanina (ALT) (cinético – IFCC referência: $\leq$  40UI/L sexo feminino,  $\leq$ 50UI/L sexo masculino), ferritina ( quimioluminescência referência: 11,0 a 306,8 ng/mL feminino, 23,9 a 336,2 ng/mL masculino), Anticorpo anti-tireoglobulina (AcTg) (quimioluminescência - ARCHITECT® - Abbot® referência: < 4,11 UI/mL), Anticorpo ani-peroxidase (Ac TPO) (quimioluminescência ARCHITECT®- Abbot® referência: < 5,61 UI/mL), hemoglobina (citoquímico/isovolumétrico referência:  $13,5 \pm 2$ ), VCM (citoquímico/ isovolumétrico referência:  $86 \pm 8$ fl), CHCM (citoquímico/isovolumétrico referência:  $34 \pm 3$ g/dL) e apoA-I (mg/dL) (immunoturbidimetria (Randox Lab.Ltd County Antrim, The United Kingdom)

Foram coletados 2,5mL para o tubo VACUETTE® Tempus™ (Applied Biosystems™ USA) para coleta e conservação adequada do RNA que permaneceram em temperatura ambiente (15° a 25° C) por 24 horas, para que, conforme o fabricante, houvesse a completa lise celular, otimizando assim o rendimento das moléculas de RNA ao final da extração, e após esse período, foi armazenado a -20°C, para realização do transcriptoma. A extração do RNA foi realizada através do kit Tempus™ (Applied Biosystems™ USA), seguindo as instruções do fabricante (anexo 4).

A quantificação do RNA total extraído pelo kit Tempus™ foi realizada no equipamento espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo Fisher Scientific

(MA, USA)), em unidade de concentração ng/ $\mu$ L e relação 260/280 nm ideal para aproximadamente 2,0, mostrando grau e pureza do RNA extraído.

Para a síntese do cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) foi utilizado e o Invitrogen SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific).

Para a realização do PCR em Tempo Real foram utilizados oligos específicos e o Taq Man Master Mix (Applied Biosystems, EUA). Esta validação foi realizada por PCR quantitativo em tempo real, utilizando-se o 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante.

A expressão relativa (RE) para o mRNA alvo foi calculada pela fórmula  $2^{(Cs - Rs)} / 2^{(Cn - Rn)}$ , onde Cs é a média do triplicado de mRNA-Cq alvo de cada amostra, Rs é a média do triplicado 18S-Cq de cada amostra, Cn é a média valor alvo de mRNA-Cq normalizado para crianças e Rn é a média de triplicatas 18S-Cq da mesma amostra.

Os participantes incluídos neste estudo foram radiografados (raio X de mãos e punhos) para análise da idade óssea, através do método de Greulich e Pyle (41). Esta análise foi feita exclusivamente pela autora deste estudo.

### **3.2 Seleção de Genes**

O hipotireoidismo infantil é uma das causas endócrinas mais associada a comprometimento estatural na infância. Com base nesse conhecimento prévio e tendo a disponibilidade de acesso ao transcriptoma de gestantes com TSH alterado, optamos por analisá-lo. Esse transcriptoma foi gerado a partir de um estudo de nosso grupo de pesquisa (42), o qual foi realinhado para hg38 (GSE 157148). A avaliação de genes diferencialmente expressos poderia nos trazer informações relevantes para crianças, tanto por ter sido factível a medida desses transcritos em indivíduos adultos, quanto pelo fato desses genes estarem sendo regulados pelo hormônio tireoideano. Como este interfere no crescimento na infância, talvez esses genes circulantes poderiam ser marcadores de crescimento, tanto em crianças com hipotireoidismo, quanto nas demais crianças. Além disso, cada gene diferencialmente expresso do transcriptoma referido foi avaliado através do banco de dados OMIM e foram

selecionados aqueles que apresentavam desfechos relacionados ao crescimento. Posteriormente a isso, foi realizada uma análise de publicações (pubmed), desses mesmos genes e foi analisada a relevância frente às síndromes ou processos de doenças que cursassem com repercussões sobre o crescimento estatural na infância.

### **3.3. Análise da Interação entre Genes**

A fim de analisar a interrelação entre os genes selecionados neste estudo e demais genes de interesse durante este estudo, utilizamos o software STRING ([string-db.org/](http://string-db.org/)) (43).

Selecionamos os microRNA presentes no HDL (miR-135 a, miR188-5p e miR-877) (44) e, após a seleção, foram identificados os alvos utilizando o banco de dados on line miRDB ([mirdb.org/](http://mirdb.org/)) (45).

### **3.4 Análise Estatística**

As variáveis numéricas analisadas dos indivíduos de nosso estudo foram testadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk). Como algumas delas não apresentavam distribuição normal, todas foram apresentadas sob a forma de mediana e intervalo interquartilico, bem como as medidas mínima e máxima observadas para cada variável.

Uma primeira estratégia do estudo foi analisar as variáveis medidas dos indivíduos em conjunto. Como o TSH apresenta relação não linear com o T4 livre, seguimos com Spearman para a correlação entre todas as variáveis. Consideramos como correlação forte aquela  $>0,7$ ; moderada aquela entre 0,5 e 0,7 e fraca aquela entre 0,3 e 0,5.

Para identificar o impacto de determinada característica na população estudada utilizamos o teste não paramétrico Mann-Whitney.

Para avaliar a frequência de determinadas variáveis entre grupos, utilizamos o teste Qui-quadrado (com o teste exato de Fisher, quando necessário)

A fim de analisar a eficiência na medida da expressão relativa dos genes com relação ao crescimento dos participantes do estudo, foi utilizada a Curva Roc e avaliada a área sob a curva. Com isto, pudemos analisar a sensibilidade e especificidade das medidas dos genes, com relação ao desfecho crescimento.

Com o objetivo de identificar ponto de corte na medida da expressão relativa dos genes capaz de diferenciar o crescimento, utilizamos o cálculo do ponto de Youden (46).

Elaboramos, por regressão logística, cálculo da probabilidade que constrói variável ajustada, com a finalidade de ampliar as correlações sobre o desfecho crescimento

As análises utilizaram o programa SPSS versão 26 (IBM Corp. Liberada 2019. IBM SPSS Statistics para Windows, versão 26.0. Armonk, NY: IBM Corp).

Para o cálculo amostral utilizamos o aplicativo G\*Power (versão 3.1.9.4).

## 4. Resultados

### 4.1. Genes Selecionados

Partindo do transcriptoma de gestantes com TSH alterado, com 408 genes diferencialmente expressos, selecionamos aqueles associados a estados de doença ou síndromes genéticas que cursavam com baixa velocidade de crescimento e que levam a baixa estatura na infância. Os genes selecionados foram: A Disintegrin-like and Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 10 (*ADAMTS10*); Zinc Finger Transcription Factor (*TRPS1*); Nuclear Factor of Activated T Cells, Cytoplasmic, Calcineurin-Dependent 2 (*NFATC2*); Lamin A (*LMNA*) e Insulin-Like Growth Factor I Receptor (*IGF1R*). Abaixo (tabela 1), descrevemos algumas características sobre estes genes:

Tabela 1- Lista de genes selecionados para determinação da expressão relativa e associação com os parâmetros de crescimento da população estudada. Na lista apresentamos o nome dos genes, a localização citogenética, as coordenadas genômicas e o código deste gene no site do Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, [HTTPS://www.omim.org/](https://www.omim.org/))

Gene	Localização citogenética	Coordenada genômica GRCh38	OMIM
<i>ADAMTS10</i>	19p13.2	<a href="#">19:8,580,239-8,610,714</a>	277600
<i>NFATC2</i>	20q13.2	<a href="#">20:51,386,962-51,562,856</a>	
<i>IGF1R</i>	15q12.3	<a href="#">15:98,648,538-98,964,529</a>	270450
<i>TRPS1</i>	8q23.3	<a href="#">8:115,408,495-115,668,974</a>	190350 190351
<i>LMNA</i>	1q22	<a href="#">1:156,082,572-156,140,080</a>	(*)

(\*) = 115200, 605588, 181350, 616516, 610140, 176670, 151660, 212112, 248370, 613205 e 275210

O gene *ADAMTS10* (A Disintegrin-Like and Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1 Motif, 10) é um membro da grande família *ADAMTS* de proteases dependentes de zinco. *ADAMTS* é uma superfamília de proteínas,

sendo 19 metaloproteases e 7 ADAMTS proteínas-like, as quais perdem a atividade catalítica. As ADAMTS proteases são sintetizadas como zimogênio inativo e a clivagem do propeptídeo N terminal inibitório por convertases pró proteína, como a furina, é necessária para sua ativação (47). Tanto a mutação autossômica recessiva no gene *ADAMTS10*, quanto a autossômica dominante no gene *FBN1* levam à Síndrome Weill-Marchesani, desordem rara, com uma prevalência de 1:100 000 pessoas. Nesta síndrome, uma das características é a baixa estatura com braquidactilia. Microfibrilas de fibrilina (fibrillin microfibrils) são amplamente distribuídas entre os tecidos. Uma de suas funções é regular a biodisponibilidade da superfamília TGF $\beta$ , (fator de crescimento transformador  $\beta$ ), bem como da superfamília BMP (proteínas morfogenéticas ósseas), grupo de proteínas com papel fundamental na regulação, indução, manutenção e reparação óssea (48). A proteína ADAMTS10 parece ter uma ação moduladora na produção da microfibrila de fibrilina: a ADAMTS10 pode se ligar a proteína FBN1, em 2 sítios (N-terminal e C-terminal), levando a um aumento das microfibrilas. Ainda, próximo à FBN1, a ADAMTS10 também leva a um aumento da microfibrila de fibrilina. Os sítios de ligação entre ADAMTS10 e FBN1 coincidem com os de mutação de *FBN1*, dando a Síndrome de Weill-Marchesani (49). Foi identificado em animais que na mutação do gene *ADAMTS10*, levando à Síndrome de Weill-Marchesani, a expressão dos genes GDF8 (fator de diferenciação do crescimento e BMP (proteína morfogenética óssea) estava diminuída, associando também vias de ação desse gene no tecido ósseo (50).

O gene *TRPS1* (Zinc Finger Transcription Factor) é um repressor transcricional do dedo de zinco, envolvido na regulação do desenvolvimento de condrócitos e pericôndrios. A mutação deste gene determina a Síndrome tricorriofalangiana tipo I, bem como tipo III, de herança autossômica dominante. Vários estudos associam este gene também à homeostase óssea e densidade mineral óssea (51). A síndrome tricorriofalangiana é caracterizada por anomalias craniofaciais e distúrbios na formação e maturação da matriz óssea. As alterações esqueléticas mais significativas são a clinodactilia, epífises das falanges em forma de cone, baixa estatura, baixa densidade mineral óssea e malformações na articulação do quadril (52).

O gene *NFATC2* (Nuclear Factor of Activated T Cells, Cytoplasmic, Calcineurin-Dependent 2) tem ação inibitória sobre o desenvolvimento de osteoblastos, podendo ter participação no mecanismo da osteopenia (53,54). No entanto, existem evidências de seu papel na diferenciação e proliferação osteocondral (55).

O gene *LMNA* (Lamin A) está associado a algumas síndromes genéticas que cursam com alterações no metabolismo ósseo; tais como displasia mandibuloacral, que cursa com atraso no crescimento e hipoplasia mandibular (56); síndrome coração-mão tipo esloveno, que cursa com braquidactilia (57); e a síndrome progeria Hutchinson-Gilford, que cursa com déficit no crescimento e dentição atrasada (58).

O gene *IGF1R* ( Insulin-Like Growth Factor I Receptor) tem papel importante no crescimento longitudinal ósseo, como descrito em tópico anterior.



## 4.2. Participantes selecionados – População total

Foram atendidos 276 crianças e adolescentes, sendo incluídos 60 (22 do sexo masculino e 38 do sexo feminino) neste estudo. A exclusão dos demais 216 ocorreu pelos seguintes fatores: falta de adesão ao seguimento, presença de patologias e/ou uso de medicamentos e, uso inadequado da levotiroxina (nos pacientes com hipotireoidismo). Todos os participantes selecionados realizaram as medidas laboratoriais propostas e coleta de material para extração do RNA. Tomando como base um poder de amostra de 0,8;  $\alpha$  erro = 0,05;  $\rho_{H1}$  = 0,5 temos que o amostra deveria conter, ao menos, 23 indivíduos. As características clínicas, laboratoriais descritas a seguir serão relativas ao grupo total de pacientes (n=60).

### 4.2.1. Características Clínicas dos Participantes

Como algumas das características clínicas dos participantes não tinham distribuição normal, optamos por caracterizá-las todas de forma homogênea, através de mediana e intervalo interquartilico (tabela 2):

Tabela 2 - Características Clínicas da População Estudada

Variáveis	Mediana (P25-75)	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	11,84(7,69-14,32)	5,17	17,67
Estatura (cm)	146,25(130,63-159,38)	109	180
Z e	0,34(-0,64-1,10)	-3,52	2,59
Ze_IO	0,27(-0,36-1,32)	-2,77	6,72
Delta Ze	0,71(0,18-1,57)	-1,43	2,57
VC (cm/ano)	6(1-6,9)	0	11,5
Zvc	0(-0,64-1,59)	-6,30	6,09
Zvc_IO	0(-0,35-2,14)	-1,51	6,04
Massa (kg)	41,50(29,48-55,00)	18	97,5
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	19,04(16,33-23,61)	13,70	30,10
ZIMC	0,78(-0,43-2,03)	-2,94	3,87
PA Sistólica (mmHg)	100(100-110)	90	120
PA Diastólica(mmHg)	60(50-60)	50	80

Observamos na população estudada (tabela 2) uma variabilidade quanto à faixa etária dos indivíduos, pois tínhamos de fato a intenção de avaliar todos os grupos etários, da infância à adolescência

#### 4.2.2. Medidas Laboratoriais Encontradas na População estudada

As medidas laboratoriais realizadas são descritas na tabela 3, na qual cada variável é expressa em mediana e intervalo interquartilico:

Tabela 3 - Medidas Laboratoriais da População Estudada

Variáveis	Mediana (P25-75)	Mínimo	Máximo
Hb (g/L)	13,4(12,68-13,8)	11,00	15,3
VCM (fl)	85,2(80,7-89,35)	36,80	98,50
CHCM (g/dL)	32,60(31,65-33,50)	29,00	34,70
Ferritina (mg/dL)	42,80(28,35-63,60)	14,60	142,00
Glicemia(mg/dL)	84,00(81,00-89,00)	72	105
Ureia (mg/dL)	26,50(21,00-31,00)	11,00	48,00
Creatinina (mg/dL)	0,59(0,44-0,69)	0,2	1,00
Colesterol Total (mg/dL)	151,00(136,50-172,25)	100,00	344,00
LDL-C (mg/dL)	88,00(71,75-104,25)	49,00	207,00
HDL-C (mg/dL)	49,00(41,00-55,00)	36,00	114,00
VLDL-C (mg/dL)	13,00(11,00-19,00)	7,00	57,00
Triglicérides (mg/dL)	67,50(54,75-94,50)	37,00	283,00
apoA-I (mg/dL)	153,43(132,50-161,14)	127,00	181,91
AST (U/L)	22,00(17,00-24,50)	11,00	64,00
ALT(U/L)	14,00(11,00-16,50)	7,00	61,00
TSH(mUI/L)	5,21(3,48-8,20)	0,05	100,00
T4L (ng/dL)	1,04(0,96-1,12)	0,48	1,39
AcTPO (UI/mL)	3,00(3,00-161,73)	3,00	1000,00
AcTg(UI/mL)	6,31(2,53-69,56)	1,00	1000,00
IGF-1(ng/mL)	249,00(187,00-328,00)	81,90	528,00
Volume Tireoidiano (cm <sup>3</sup> )	5,35(3,40-9,67)	1,60	28,40
Idade Óssea (anos)	11,00(8,42-15,00)	3,00	18,00

Na tabela 3, podemos analisar as medidas laboratoriais apresentadas pelos indivíduos incluídos no estudo. Nota-se alteração da função tireoideana em parte da população. Ainda, alguns apresentavam dislipidemia.

#### 4.2.3. Correlação entre Parâmetros Clínico-Laboratoriais da População Estudada:

A partir de todas as medidas realizadas, correlacionamos (Spearman) alguns parâmetros clínicos entre si (tabela 4), parâmetros clínicos e medidas laboratoriais realizadas (tabela 5), medidas hormonais e demais medidas (tabela 5) e medidas dos lípides e demais medidas laboratoriais (tabela 6), como seguem abaixo:

Tabela 4 - Correlação entre os Parâmetros Clínicos da População Estudada

		Idade (anos)	Estatura (cm)	Ze	Ze_IO	VC (cm/a)	Zvc	Delta Ze	Massa (Kg)	IMC	ZIMC
<b>Idade (anos)</b>	rs	1,000	,904**	0,183	-0,115	-,631**	-,284*	-0,017	-,316*	,328*	-0,245
	p		<0,001	0,162	0,474	<0,001	0,043	0,915	0,016	0,011	0,060
<b>Estatura (cm)</b>	rs	,904**	1,000	0,161	0,060	-,483**	-,285*	-0,023	-0,069	,369**	-0,155
	p	0,000		0,220	0,710	<0,001	0,042	0,889	0,607	0,004	0,237
<b>Ze</b>	rs	-0,183	0,161	1,000	,363*	0,203	0,051	0,066	,567**	,280*	,403**
	p	0,162	0,220		0,020	0,154	0,723	0,688	<0,001	0,030	0,001
<b>Ze_IO</b>	rs	-0,115	0,060	,363*	1,000	0,192	0,172	0,086	0,160	0,099	0,197
	p	0,474	0,710	0,020		0,255	0,307	0,612	0,323	0,537	0,217
<b>VC(cm/a)</b>	rs	-,631**	-,483**	0,203	0,192	1,000	,769**	,518**	0,220	-,284*	0,045
	p	0,000	0,000	0,154	0,255		<0,001	0,001	0,124	0,043	0,756
<b>Zvc</b>	rs	-,284*	-,285*	0,051	0,172	,769**	1,000	,722**	0,017	-0,133	0,036
	p	0,043	0,042	0,723	0,307	0,000		<0,001	0,908	0,352	0,799
<b>Delta Ze</b>	rs	-0,017	-0,023	0,066	0,086	,518**	,722**	1,000	0,068	0,153	0,133
	p	0,915	0,889	0,688	0,612	0,001	0,000		0,675	0,347	0,415
<b>Massa (kg)</b>	rs	-,316*	-0,069	,567**	0,160	0,220	0,017	0,068	1,000	0,119	,352**
	p	0,016	0,607	0,000	0,323	0,124	0,908	0,675		0,372	0,007
<b>IMC</b>	rs	,328*	,369**	,280*	0,099	-,284*	-0,133	0,153	0,119	1,000	,822**
	p	0,011	0,004	0,030	0,537	0,043	0,352	0,347	0,372		<0,01
<b>ZIMC</b>	rs	-0,245	-0,155	,403**	0,197	0,045	0,036	0,133	,352**	,822**	1,000
	p	0,060	0,237	0,001	0,217	0,756	0,799	0,415	0,007	0,000	

Identifica-se na tabela 4 uma correlação forte positiva entre idade e estatura, velocidade de crescimento e Zvc, Zvc e delta Ze. Ainda, do IMC com ZIMC.

Tabela 5 - Correlação entre Parâmetros Clínicos e Medidas Laboratoriais

		Estatura		Ze	Ze_IO	VC	Zvc	Zvc_IO	Delta Ze	IMC	Z_IMC
		Idade	(cm)								
Hb (g/dL)	rs	,265*	,399**	0,182	0,116	-0,082	-0,080	-0,052	0,157	0,019	-0,135
	p	0,045	0,002	0,171	0,481	0,576	0,583	0,759	0,249	0,889	0,311
VCM (fl)	rs	,604**	,463**	-,297*	-0,063	-0,265	0,066	0,201	-,284*	0,215	-0,139
	p	<0,01	<0,01	0,025	0,706	0,069	0,655	0,233	0,035	0,108	0,301
Uréia (mg/dL)	rs	-0,041	-0,139	-0,118	0,190	-0,040	0,162	-0,039	-,343*	0,071	0,103
	p	0,764	0,309	0,385	0,261	0,791	0,276	0,823	0,011	0,606	0,450
Cr (mg/dL)	rs	,816**	,774**	-0,167	-0,070	-,597**	-,335*	-0,285	-,305*	,346**	-0,129
	p	<0,01	<0,01	0,215	0,675	<0,01	0,020	0,087	0,024	0,008	0,338
CT (mg/dL)	rs	-0,190	-0,208	0,040	0,169	-0,047	0,094	0,099	0,146	0,180	,274*
	p	0,168	0,132	0,772	0,317	0,755	0,532	0,561	0,301	0,192	0,045
HDL-C (mg/dL)	rs	0,009	-0,077	-,330*	-0,182	0,096	0,129	0,036	-0,150	-0,197	-0,214
	p	0,946	0,580	0,015	0,282	0,519	0,387	0,834	0,288	0,154	0,120
LDL-C (mg/dL)	rs	-0,203	-0,227	0,041	0,124	-0,065	0,077	0,086	0,106	0,174	,271*
	p	0,141	0,098	0,769	0,466	0,663	0,607	0,613	0,454	0,209	0,047
VLDL-C (mg/dL)	rs	-0,164	-0,165	0,193	0,213	0,136	0,110	0,032	0,154	0,174	,290*
	p	0,249	0,247	0,175	0,226	0,379	0,477	0,856	0,292	0,222	0,039
ApoA-I (mg/dL)	rs	0,200	0,174	-0,128	0,360	-0,376	-0,290	-0,654	-0,114	-0,091	-0,278
	p	0,555	0,610	0,709	0,427	0,254	0,388	0,111	0,739	0,790	0,408
TG (mg/dL)	rs	-0,123	-0,135	0,145	0,274	0,102	0,082	0,047	0,128	0,202	,298*
	p	0,377	0,329	0,297	0,101	0,495	0,586	0,782	0,366	0,142	0,029
AST (U/L)	rs	-,471**	-,463**	-0,117	-0,152	0,160	-0,125	-,314	0,026	-,419**	-0,164
	p	<0,01	<0,01	0,386	0,362	0,272	0,391	0,055	0,849	0,001	0,221
ALT (U/L)	rs	-,351**	-,325*	0,044	-0,093	0,137	0,060	0,014	0,124	0,028	0,219
	p	0,008	0,014	0,742	0,579	0,347	0,681	0,935	0,368	0,837	0,102
TSH (uUI/mL)	rs	-0,077	-0,018	-0,053	0,043	0,175	0,013	-0,066	0,023	0,095	0,154
	p	0,556	0,894	0,689	0,789	0,220	0,929	0,688	0,863	0,469	0,241
T4 L (ng/dL)	rs	-,343**	-,433**	-0,034	0,305	-0,117	-0,059	-0,120	-0,026	-0,114	0,105
	p	0,008	0,001	0,798	0,059	0,419	0,685	0,468	0,851	0,395	0,435
AcTG (ng/dL)	rs	,398**	,319*	-,319*	-0,052	-0,223	-0,180	-0,030	-0,130	-0,017	-0,253
	p	0,002	0,017	0,016	0,761	0,131	0,225	0,863	0,347	0,900	0,060
AcTPO (UI/mL)	rs	,535**	,419**	-,319*	-0,257	-,467**	-,311*	-0,135	-0,160	0,073	-0,246
	p	<0,01	0,001	0,014	0,109	0,001	0,028	0,411	0,236	0,582	0,060
IGF-1 (ng/mL)	rs	,327*	,452**	0,177	-,488*	-0,082	-0,045	0,204	0,168	0,281	0,078
	p	0,042	0,004	0,282	0,012	0,644	0,801	0,328	0,314	0,083	0,637

Na tabela 5, identifica-se correlação forte positiva entre a creatinina com idade e estatura.

Tabela 6 - Correlação entre Medidas Hormonais e Demais Medidas

		TSH (uUI/mL)	T4 L (ng/dL)	ANTI Tg (ng/dL)	ANTI TPO (UI/mL)	IGF-1 (ng/mL)
TSH (uUI/mL)	rs	1,000	-,354**	,306*	,260*	0,017
	p		0,006	0,022	0,047	0,920
T4 L (ng/dL)	rs	-,354**	1,000	-0,252	-,283*	-0,297
	p	0,006		0,063	0,033	0,066
ANTI Tg (ng/dL)	rs	,306*	-0,252	1,000	,687**	0,142
	p	0,022	0,063		<0,01	0,402
ANTI TPO (UI/mL)	rs	,260*	-,283*	,687**	1,000	0,153
	p	0,047	0,033	0,000		0,353
IGF-1 (ng/mL)	rs	0,017	-0,297	0,142	0,153	1,000
	p	0,920	0,066	0,402	0,353	
Hb (g/dL)	rs	0,025	-0,149	0,134	,295*	0,031
	p	0,850	0,267	0,328	0,026	0,850
VCM (fl)	rs	-0,028	-0,146	0,215	,306*	0,047
	p	0,834	0,282	0,118	0,022	0,777
Uréia (mg/dL)	rs	-0,014	0,139	0,030	-0,102	-0,116
	p	0,917	0,313	0,827	0,455	0,489
Creatinina (mg/dL)	rs	0,114	-0,261	,340*	,422**	0,299
	p	0,397	0,052	0,011	0,001	0,064
CT (mg/dL)	rs	0,129	0,177	-0,244	-0,172	-,482**
	p	0,354	0,205	0,085	0,218	0,003
HDL-C (mg/dL)	rs	-0,096	0,023	0,059	0,113	0,000
	p	0,490	0,871	0,681	0,420	0,998
LDL-C (mg/dL)	rs	0,157	0,140	-0,218	-0,213	-,473**
	p	0,256	0,316	0,124	0,127	0,004
VLDL-C (mg/dL)	rs	0,015	0,078	-,329*	-0,132	-0,240
	p	0,917	0,591	0,022	0,362	0,172
ApoA-I (mg/dL)	rs	-0,096	0,055	0,437	0,372	-0,196
	p	0,780	0,873	0,179	0,259	0,564
TG (mg/dL)	rs	0,052	0,065	-,295*	-0,089	-0,167
	p	0,710	0,645	0,036	0,524	0,337
AST (U/L)	rs	0,235	0,054	-0,088	-0,167	-0,248
	p	0,079	0,695	0,527	0,219	0,139
ALT (U/L)	rs	0,111	0,166	-0,082	-0,144	-0,085
	p	0,409	0,220	0,557	0,290	0,616

Ao correlacionarmos as medidas hormonais com demais medidas laboratoriais (tabela 6), encontramos correlação fraca e negativa entre IGF1 e as medidas de colesterol total e LDL colesterol. Identificamos correlação fraca e negativa entre TSH e T4I.

Tabela 7 - Correlação Lípides com Demais Medidas Laboratoriais

		CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	VLDL-C (mg/dL)	ApoA-I (mg/dL)	TG (mg/dL)
CT (mg/dL)	rs	1,000	0,044	,935**	,486**	0,082	,439**
	p		0,749	<0,01	<0,01	0,811	0,001
HDL-C (mg/dL)	rs	0,044	1,000	-0,174	-,288*	,721*	-,358**
	p	0,749		0,208	0,041	0,012	0,008
LDL-C (mg/dL)	rs	,935**	-0,174	1,000	,395**	-0,319	,383**
	p	0,000	0,208		0,004	0,339	0,004
VLDL-C (mg/dL)	rs	,486**	-,288*	,395**	1,000	0,011	,997**
	p	0,000	0,041	0,004		0,973	<0,01
ApoA-I (mg/dL)	rs	0,082	,721*	-0,319	0,011	1,000	-0,018
	p	0,811	0,012	0,339	0,973		0,958
TG (mg/dL)	rs	,439**	-,358**	,383**	,997**	-0,018	1,000
	p	0,001	0,008	0,004	0,000	0,958	
TSH (uUI/mL)	rs	0,129	-0,096	0,157	0,015	-0,096	0,052
	p	0,354	0,490	0,256	0,917	0,780	0,710
T4 L (ng/dL)	rs	0,177	0,023	0,140	0,078	0,055	0,065
	p	0,205	0,871	0,316	0,591	0,873	0,645
ANTI Tg (ng/dL)	rs	-0,244	0,059	-0,218	-,329*	0,437	-,295*
	p	0,085	0,681	0,124	0,022	0,179	0,036
ANTI TPO (UI/mL)	rs	-0,172	0,113	-0,213	-0,132	0,372	-0,089
	p	0,218	0,420	0,127	0,362	0,259	0,524
IGF-1 (ng/mL)	rs	-,482**	0,000	-,473**	-0,240	-0,196	-0,167
	p	0,003	0,998	0,004	0,172	0,564	0,337
Hb (g/dL)	rs	-0,126	-0,102	-0,191	0,049	0,492	0,056
	p	0,367	0,466	0,170	0,731	0,124	0,692
VCM (fl)	rs	0,053	,295*	-0,077	0,009	,708*	0,022
	p	0,708	0,034	0,587	0,951	0,015	0,877
Uréia (mg/dL)	rs	-0,002	-0,030	0,046	-0,080	-0,059	-0,045
	p	0,988	0,834	0,746	0,585	0,862	0,751
Creatinina (mg/dL)	rs	-0,180	0,027	-0,194	-0,149	0,201	-0,116
	p	0,203	0,848	0,168	0,305	0,554	0,412
AST (U/L)	rs	0,123	0,015	0,106	-0,055	0,309	-0,024
	p	0,376	0,916	0,447	0,700	0,355	0,863
ALT (U/L)	rs	,299*	-0,095	,273*	0,191	0,353	0,137
	P	0,028	0,494	0,046	0,179	0,286	0,325

Ao realizarmos a correlação entre lípidos e demais medidas, encontramos correlação forte positiva entre colesterol total e LDL-C; bem como entre VLDL e Triglicérides. Além disso, identificamos correlação forte positiva entre o HDL colesterol e ApoA1 (tabela 7) .

#### 4.2.4. Medida da Expressão dos Genes Selecionados

A quantificação do RNA foi realizada inicialmente para 62 dos participantes (crianças e adolescentes). Destes indivíduos, apenas em 2 não foi possível a quantificação do RNA (não houve detecção dele na amostra). Nos demais 60 selecionados tivemos êxito na detecção do RNA.

Na tabela 8 podemos identificar a medida da expressão dos genes selecionados nos participantes:

Tabela 8 - Medida da Expressão Relativa dos Genes Analisados no Estudo

Expressão Relativa (RE)	Mediana(P25-75)	Mínimo	Máximo
<i>IGF1R</i>	0,79(0,45-1,45)	0,08	11,88
<i>NFATC2</i>	1,12(0,44-1,88)	0,07	19,54
<i>LMNA</i>	0,97(0,56-1,45)	0,08	6,48
<i>ADAMTS10</i>	1,02(0,54-1,64)	0,08	9,36
<i>TRPS1</i>	0,92(0,55-1,74)	0,07	10,94

#### 4.2.5. Correlação Entre os Transcritos

Avaliando a correlação entre os transcritos estudados (Spearman), identificamos que todos os genes selecionados apresentavam correlação entre eles (tabela 9):

Tabela 9 - Correlação Entre os Transcritos

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
RE_NFATC2	rs	1,000	,653**	,704**	,758**	,821**
	p		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
RE_ADAMTS10	rs	,653**	1,000	,509**	,721**	,466**
	p	0,000		<0,01	<0,01	<0,01
RE_IGF1R	rs	,704**	,509**	1,000	,715**	,794**
	p	0,000	0,000		<0,01	<0,01
RE_LMNA	rs	,758**	,721**	,715**	1,000	,729**
	p	0,000	0,000	0,000		<0,01
RE_TRPS1	rs	,821**	,466**	,794**	,729**	1,000
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	

Na tabela 9 evidenciamos correlação entre todos os genes entre si. A grande maioria apresentava correlação forte; alguns, moderada.



#### 4.2.6. Correlação entre as medidas dos Genes e Parâmetros Clínicos:

Tabela 10 - Correlação entre a medida dos Genes e parâmetros clínicos

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
Idade (anos)	rs	0,013	0,073	-0,103	-0,049	-0,117
	p	0,925	0,589	0,441	0,713	0,384
Estatura (cm)	rs	0,026	-0,038	-0,082	-0,033	-0,101
	p	0,849	0,779	0,540	0,806	0,450
Ze	rs	0,068	-0,076	0,141	0,133	0,040
	p	0,614	0,569	0,290	0,318	0,766
Delta Ze	rs	-0,084	-0,272*	-0,038	-0,126	-0,083
	p	0,536	0,043	0,779	0,353	0,545
VC	rs	-0,192	-0,295*	-0,063	-0,102	-0,086
	p	0,176	0,036	0,662	0,477	0,549
Zvc	rs	-0,261	-0,244	-0,218	-0,190	-0,279*
	p	0,064	0,085	0,125	0,181	0,048
Zvc_IO	rs	-0,133	-0,079	-0,135	-0,094	-0,203
	p	0,415	0,630	0,407	0,563	0,210
Ze_IO	rs	0,188	0,044	0,127	0,063	0,130
	p	0,239	0,783	0,430	0,694	0,420
ZIMC	rs	0,119	0,005	-0,035	0,068	-0,027
	p	0,375	0,968	0,797	0,610	0,843

Quando correlacionamos as medidas dos genes circulantes e variáveis clínicas (tabela 10), não obtivemos nenhum dado relevante.

#### 4.2.7. Correlação dos Transcritos e Medidas Laboratoriais

A seguir, partimos para avaliar possível correlação entre os transcritos e as medidas hormonais e outras variáveis (tabela 11).

Tabela 11 - Correlação da Expressão Relativa dos Transcritos Circulantes com Medidas laboratoriais

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
TSH (uUI/mL)	rs	-0,083	-0,161	-0,100	-0,176	-0,148
	p	0,537	0,226	0,455	0,186	0,267
T4 L (ng/dL)	rs	0,018	0,215	-0,029	-0,046	0,046
	p	0,897	0,112	0,834	0,736	0,735
ANTI Tg (ng/dL)	rs	-0,116	-0,133	-0,134	-0,229	-0,134
	p	0,402	0,337	0,334	0,096	0,333
ANTI TPO (UI/mL)	rs	-0,057	0,014	-0,100	-0,143	-0,157
	p	0,675	0,918	0,460	0,290	0,242
IGF-1 (ng/mL)	rs	-0,089	-0,230	-0,249	-0,157	-0,165
	p	0,596	0,165	0,132	0,347	0,322
Hb (g/dL)	rs	-0,087	-0,137	-0,016	-0,014	0,025
	p	0,524	0,313	0,904	0,920	0,857
VCM (fl)	rs	-0,046	0,075	-0,255	-0,027	-0,207
	p	0,740	0,586	0,060	0,843	0,129
CHCM (g/dL)	rs	0,055	-0,102	0,195	0,079	0,249
	p	0,692	0,457	0,154	0,568	0,067
Ferritina (ng/mL)	rs	0,102	0,169	,281*	0,222	0,156
	p	0,480	0,241	0,048	0,121	0,280
Glicemia (mg/dL)	rs	-0,073	-0,276	0,243	-0,103	0,048
	p	0,658	0,089	0,137	0,534	0,771
CT (mg/dL)	rs	0,021	-0,040	0,110	-0,063	0,015
	p	0,883	0,779	0,436	0,658	0,918
HDL-C (mg/dL)	rs	-,323*	-,393**	-,472**	-,475**	-,351*
	p	0,019	0,004	<0,01	<0,01	0,011
LDL-C (mg/dL)	rs	0,115	0,048	0,208	0,063	0,108
	p	0,415	0,738	0,139	0,656	0,447
VLDL-C (mg/dL)	rs	0,214	0,271	,317*	0,173	0,237
	p	0,139	0,060	0,026	0,234	0,101
ApoA-I (mg/dL)	rs	-0,437	-0,437	-0,446	-0,538	-0,255
	p	0,179	0,179	0,169	0,088	0,449
TG (mg/dL)	rs	0,262	,300*	,335*	0,225	0,264
	p	0,060	0,031	0,015	0,108	0,059
AST (U/L)	rs	-0,038	-0,039	0,147	0,103	0,110
	p	0,781	0,779	0,284	0,453	0,425
ALT (U/L)	rs	-0,173	-0,063	-0,010	-0,080	-0,084
	p	0,206	0,646	0,942	0,560	0,543
Creatinina (mg/dL)	rs	-0,046	0,031	-0,248	-0,109	-0,164
	p	0,739	0,820	0,068	0,428	0,231
Uréia (mg/dL)	rs	-0,055	-0,053	-0,249	-0,049	-0,083
	p	0,691	0,701	0,070	0,726	0,550

Ao analisar a correlação entre a expressão relativa dos genes e perfil lipídico, identificamos que todos tinham correlação fraca e negativa com o HDL colesterol (tabela11).

#### 4.2.8. Correlação dos Transcritos e Lípides – Pacientes Sem Excesso de Peso.

Dos 60 participantes da população normal, 8 apresentavam excesso de peso. Fizemos então uma análise excluindo os mesmos, pensando na possibilidade deste fator (excesso de peso) estar impactando no perfil lipídico e este ser fator confundidor na análise quanto ao HDL-C. Identificamos que a correlação negativa entre os genes com o HDL-C se mantinha (tabela 12):

Tabela 12 - Correlação dos Transcritos e Lípides - População Sem Excesso de Peso

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
CT (mg/dL)	rs	-0,059	-0,147	0,005	-0,225	-0,069
	p	0,698	0,336	0,973	0,137	0,650
HDL-C (mg/dL)	rs	-,318*	-,403**	-,541**	-,466**	-,389**
	p	0,033	0,006	<0,01	0,001	0,008
LDL-C (mg/dL)	rs	0,039	-0,065	0,122	-0,071	0,032
	p	0,800	0,673	0,424	0,644	0,834
VLDL-C (mg/dL)	rs	0,142	0,233	0,223	0,037	0,163
	p	0,363	0,133	0,150	0,811	0,297
ApoA-I (mg/dL)	rs	-0,437	-0,437	-0,446	-0,538	-0,255
	p	0,179	0,179	0,169	0,088	0,449
TG (mg/dL)	rs	0,177	0,238	0,277	0,088	0,192
	p	0,244	0,115	0,066	0,565	0,207

Identificamos, ao excluir os pacientes com excesso de peso, que a correlação negativa entre os genes com o HDL-C se mantinha (tabela 12).

#### 4.2.9. Impacto da Puberdade Sobre a Medida dos Transcritos e do HDL-C

Como a população estudada apresentava ampla faixa etária e, portanto, participantes púberes e pré-púberes, tentamos identificar o papel da puberdade impactando tanto na medida do HDL-C, quanto na medida dos transcritos

(Mann-Whitney). Como pode ser evidenciado na tabela abaixo, isto não ocorreu.

Tabela 13 - Impacto da Puberdade Sobre a Medida dos transcritos e do HDL-C

	HDL-C (mg/dL)	RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
U	289,500	353,000	346,000	350,000	345,000	346,000
p	0,632	0,892	0,800	0,852	0,787	0,800

#### 4.2.10. Correlação entre os transcritos, ajustados pelo HDL e variáveis clínicas

Com o objetivo de corrigir uma possível interferência gerada pelos valores de HDL, as medidas de expressão relativa dos genes foram corrigidas pelo HDL e esta variável criada foi correlacionada com parâmetros clínicos (tabela 14).

Tabela 14– Correlação dos transcritos, ajustados pelo HDL e Variáveis Clínicas

		RE_NFATC2_ Adj_HDL	RE_ADAMTS10_ Adj_HDL	RE_IGF1R_ Adj_HDL	RE_LMNA_ Adj_HDL	RE_TRPS1_ Adj_HDL
Idade (anos)	rs	-0,005	-0,167	-0,010	0,001	0,074
	p	0,970	0,237	0,943	0,994	0,603
Estatura (cm)	rs	0,021	0,047	0,077	0,064	0,128
	p	0,882	0,739	0,590	0,654	0,367
Ze	rs	0,058	,277*	0,106	0,029	0,086
	p	0,681	0,047	0,454	0,837	0,543
Ze_IO	rs	-0,048	0,160	0,132	0,232	0,025
	p	0,777	0,345	0,435	0,166	0,881
Delta Ze	rs	0,109	,353*	0,123	0,163	0,147
	p	0,449	0,012	0,394	0,258	0,309
VC	rs	0,177	,422**	0,114	0,194	0,131
	p	0,234	0,003	0,447	0,191	0,379
Zvc	rs	0,228	0,287	0,183	0,256	0,268
	p	0,124	0,050	0,220	0,082	0,068
Zvc_IO	rs	0,195	0,274	0,242	0,243	0,271
	p	0,248	0,101	0,149	0,147	0,105
ZIMC	rs	-0,086	0,034	0,110	0,018	0,096
	p	0,543	0,812	0,439	0,898	0,499

Identificamos uma correlação fraca entre a medida do gene ADAMTS10 ajustado pelo HDL e Delta Ze, bem como com velocidade de crescimento (tabela 14).

#### 4.2.11. Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e variáveis clínicas

Tabela 15 - Correlação dos transcritos, ajustados por idade e Variáveis Clínicas

		RE_NFATC2_ Adj_Idade	RE_ADAMTS10_ Adj_Idade	RE_IGF1R_ Adj_Idade	RE_LMNA_ Adj_Idade	RE_TRPS1_ Adj_Idade
Idade (anos)	rs	-,794**	-,808**	-,828**	-,880**	-,748**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Estatura (cm)	rs	-,732**	-,673**	-,736**	-,796**	-,679**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ze	rs	0,079	0,235	0,124	0,141	0,133
	p	0,555	0,075	0,353	0,291	0,321
Ze_IO	rs	0,105	0,041	0,122	0,151	0,071
	p	0,515	0,800	0,446	0,347	0,657
Delta Ze	rs	0,245	,420**	,294*	,349**	,281*
	p	0,069	0,001	0,028	0,008	0,036
VC	rs	,647**	,730**	,657**	,659**	,618**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Zvc	rs	,458**	,466**	,451**	,406**	,490**
	p	0,001	0,001	0,001	0,003	<0,01
Zvc_IO	rs	0,138	0,156	0,205	0,149	0,235
	p	0,395	0,338	0,204	0,358	0,145
ZIMC	rs	0,108	0,204	0,211	0,189	0,207
	p	0,419	0,124	0,112	0,156	0,119

Identificamos que os genes, agora ajustados por idade, apresentavam, todos correlação positiva, tanto para a velocidade de crescimento (VC), quanto para a velocidade de crescimento corrigida para idade e sexo (Zvc). Ainda, todos apresentavam correlação forte e negativa com idade e estatura (tab 15 ).

#### 4.2.12. Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e HDL, com variáveis clínicas

Tabela 16 - Correlação dos transcritos, ajustados por idade e HDL com variáveis clínicas

		RE_NFATC2_Adj _Idade_HDL	RE_ADAMTS10_Adj _Idade_HDL	RE_IGF1R_Adj _Idade_HDL	RE_TRPS1_Adj _Idade_HDL
Idade (anos)	rs	-,690**	-,609**	-,618**	-,562**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Estatura (cm)	rs	-,570**	-,387**	-,466**	-,424**
	p	<0,01	0,005	0,001	0,002
Ze	rs	0,179	,327*	0,221	0,240
	p	0,205	0,018	0,116	0,087
Ze_IO	rs	0,121	0,090	0,206	0,128
	p	0,476	0,594	0,221	0,452
Delta Ze	rs	,331*	,471**	,326*	,346*
	p	0,019	0,001	0,021	0,014
VC	rs	,598**	,653**	,579**	,549**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Zvc	rs	,393**	,367*	,418**	,441**
	p	0,006	0,011	0,003	0,002
Zvc_IO	rs	0,134	0,179	0,258	0,270
	p	0,427	0,288	0,123	0,106
ZIMC	rs	0,147	0,153	0,213	0,244
	p	0,299	0,278	0,129	0,082

Identificamos que os genes, agora ajustados por idade e HDL apresentavam, todos correlação positiva, tanto para a velocidade de crescimento (VC), quanto para a velocidade de crescimento corrigida para idade e sexo (Zvc), porém com menor intensidade do que quando só ajustados por idade. Ainda, observamos também correlação fraca com Delta Z estatura (tabela (tabela 16)).

#### 4.2.13. Correlação entre os transcritos, ajustados por IGF-1, com variáveis clínicas

Elaboramos a correlação entre os transcritos, ajustados agora pela medida do IGF-1, como segue na próxima página (tabela 17):

Tabela 17 - Correlação dos transcritos, ajustados pelo IGF-1 e variáveis clínicas

		RE_NFATC2_ Adj_IGF1	RE_ADAMTS10_ Adj_IGF1	RE_IGF1R_ Adj_IGF1	RE_LMNA_ Adj_IGF1	RE_TRPS1_ Adj_IGF1
Idade (anos)	rs	0,026	-0,116	0,190	0,238	0,067
	p	0,876	0,487	0,252	0,149	0,689
Estatura (cm)	rs	0,054	0,030	0,306	0,319	0,144
	p	0,746	0,860	0,062	0,051	0,389
Ze	rs	-0,052	0,161	0,101	,328*	0,057
	p	0,758	0,334	0,547	0,044	0,735
Ze_IO	rs	-,496**	-0,263	-,488*	-0,159	-,399*
	p	0,010	0,195	0,011	0,439	0,044
Delta Ze	rs	0,178	,355*	0,192	-0,035	0,221
	p	0,292	0,031	0,256	0,837	0,189
VC	rs	0,075	0,138	0,047	0,032	0,051
	p	0,671	0,435	0,793	0,859	0,775
Zvc	rs	0,201	0,124	0,157	0,047	0,154
	p	0,255	0,483	0,374	0,791	0,384
Zvc_IO	rs	0,088	-0,003	0,138	0,237	0,028
	p	0,676	0,987	0,511	0,254	0,896
ZIMC	rs	0,040	0,166	0,162	0,151	0,155
	p	0,814	0,319	0,331	0,365	0,354

A correlação dos transcritos, ajustados pelo IGF-1 e variáveis clínicas não proporcionou nenhuma correlação relevante (tabela 17).

#### 4.2.14. Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e IGF-1, com variáveis clínicas

Tabela 18 - Correlação entre transcritos, ajustados por idade e IGF-1 e variáveis clínicas

		NFATC2_Aj_ Idade_IGF-1	ADAMTS_Aj Idade_IGF-1	IGF1-R_Aj Idade_IGF-1	LMNA_Aj Idade_IGF-1	TRPS1_Aj Idade_IGF-1
Idade (anos)	rs	-,856**	-,920**	-,927**	-,852**	-,913**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Estatura (cm)	rs	-,707**	-,756**	-,749**	-,660**	-,768**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ze	rs	,416**	,469**	,500**	,580**	,438**
	p	0,009	0,003	0,001	<0,01	0,006
Ze_IO	rs	-0,090	0,074	0,131	0,111	0,061
	p	0,661	0,720	0,523	0,589	0,766
Delta Ze	rs	,521**	,522**	,518**	,477**	,486**
	p	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002
VC	rs	,700**	,700**	,693**	,671**	,683**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Zvc	rs	,462**	,391*	,368*	,359*	,411*
	p	0,006	0,022	0,032	0,037	0,016
Zvc_IO	rs	0,170	0,211	0,227	0,321	0,215
	p	0,417	0,312	0,275	0,117	0,302
ZIMC	rs	,339*	,329*	,333*	,394*	,343*
	p	0,037	0,044	0,041	0,014	0,035

Identificamos que os genes, agora ajustados por idade e IGF-1 apresentavam, todos correlação positiva, tanto para a velocidade de crescimento (VC) (forte a moderada), quanto para a velocidade de crescimento corrigida para idade e sexo (Zvc) (fraca) , com intensidade similar à aquela obtida quando só ajustados por idade . Ainda, observamos também correlação com estatura e Ze (moderada a fraca) (tabela 18).

#### 4.2.15. Associação dos transcritos, ajustados por idade e pela medida do IGF-1, com Z-score da velocidade de crescimento (Zvc):

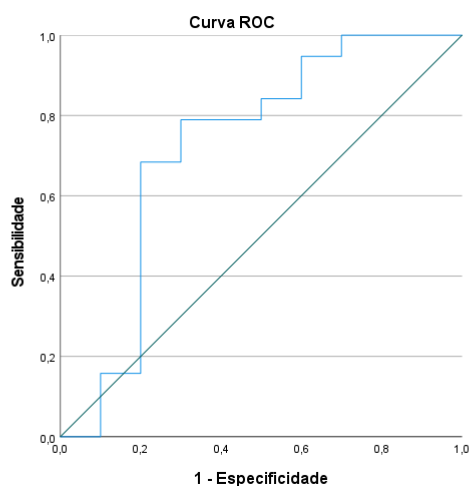
A partir da correlação observada na tabela 17, categorizamos o Zscore da velocidade de crescimento (Zvc\_categorizado). Embora conceitualmente o esperado seria considerar um z-score de velocidade de crescimento normal acima de -2 e inadequado aquele abaixo de -2, optamos por uma

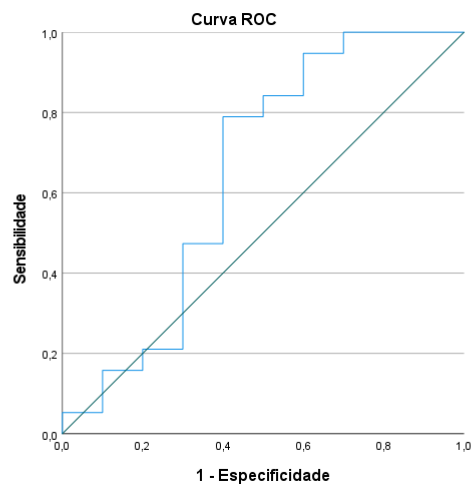
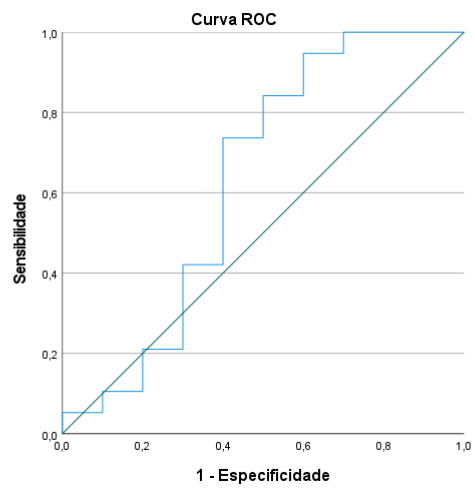
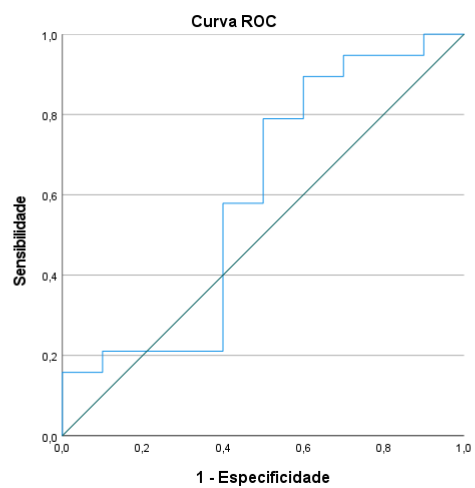


caracterização mais rígida, já que parte da população avaliada era normal. Desta forma, consideramos um bom crescimento como aquele no qual Z-score  $>0$  e crescimento inadequado o Z-score  $< 0$  e avaliamos a medida dos transcritos ajustada por idade e pela medida do IGF-1, com o desfecho o Z-score da velocidade de crescimento (Zvc). A seguir, podemos visualizar na figura 1 as Curvas Roc geradas, bem como na tabela 18 podemos observar os valores gerados da área sob a curva (AUC).

Figura 1 – Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1 com Zvc categorizada : *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1R* (C), *LMNA* (D), e *TRPS1* (E) – Curvas ROC população total:

**A**



**B****C****D**

E

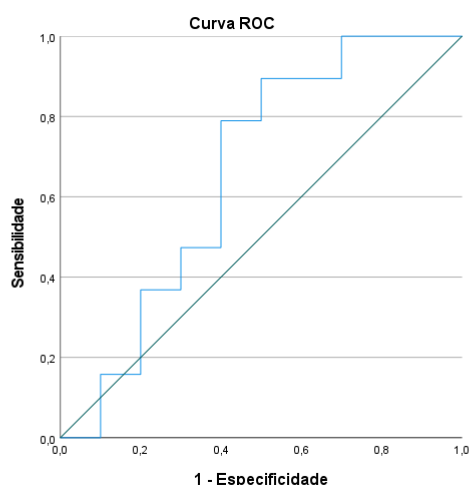


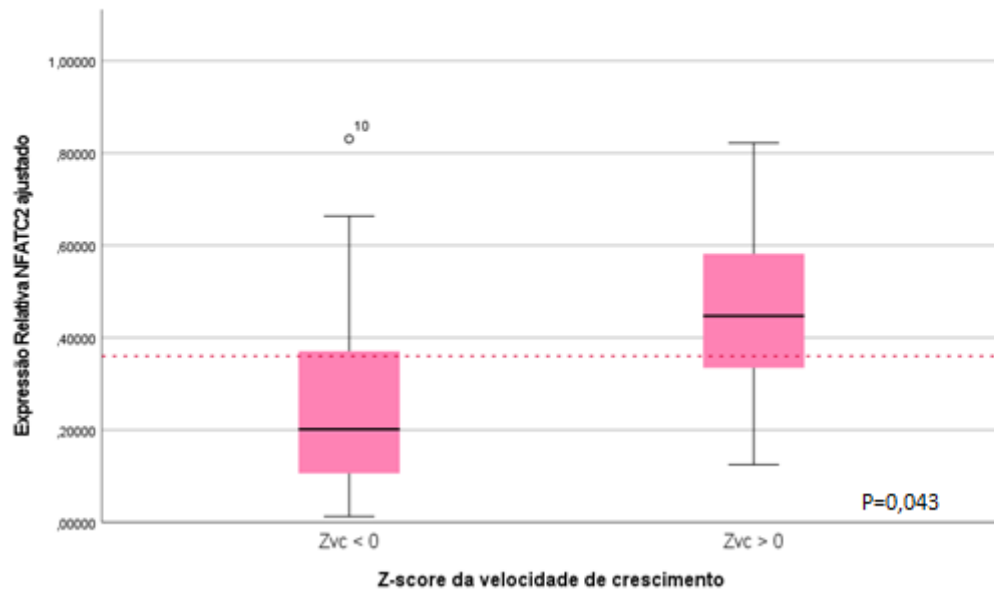
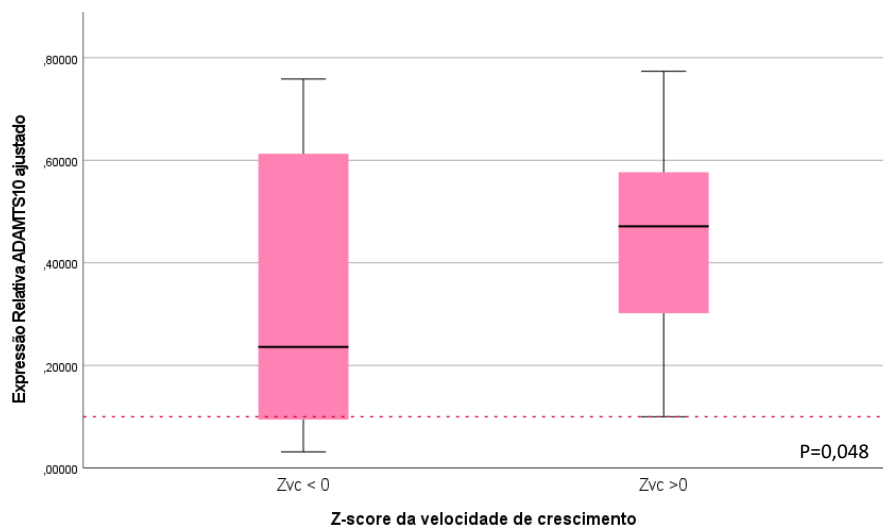
Tabela 19 - Área Sob a Curva - Genes Transcritos, ajustados por idade e IGF1R e Z score da Velocidade de Crescimento (Zvc)

	AUC	Ponto de Corte	Qui-quadrado	p
<b><i>NFATC2</i></b>	0,72	0,36	3,91	0,043
<b><i>ADAMTS10</i></b>	0,65	0,10	4,08	0,048
<b><i>IGF1R</i></b>	0,63	0,09	6,36	0,012
<b><i>LMNA</i></b>	0,56	0,11	3,37	0,066
<b><i>TRPS1</i></b>	0,66	0,11	6,36	0,012

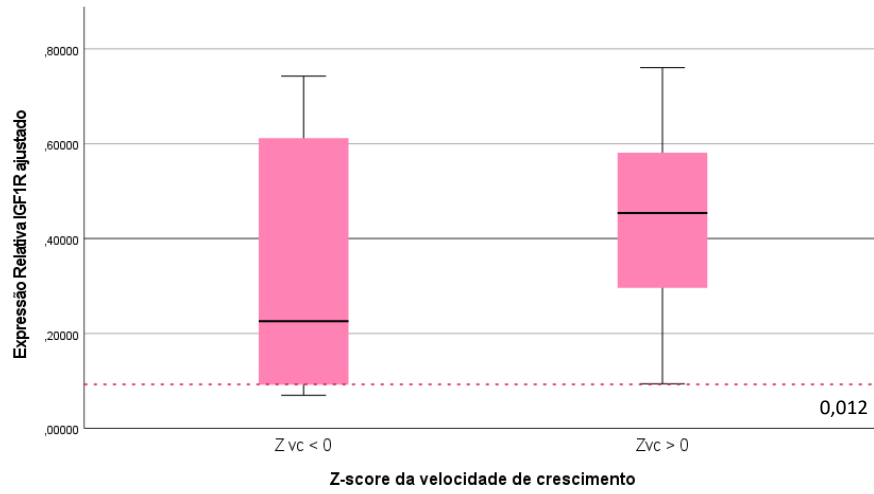
#### 4.2.16. Diferença na Medida da Expressão dos genes, ajustados por Idade e medida do IGF-1, entre a população estudada crescendo de forma adequada ( $Zvc > 0$ ) e aquela crescendo inadequadamente ( $Zvc < 0$ )

Podemos visualizar na figura 2 a diferença da medida da expressão dos genes, ajustados por idade e a medida do IGF-1, entre a população crescendo de forma adequada ( $Zvc > 0$ ) e aquela crescendo inadequadamente ( $Zvc < 0$ ).

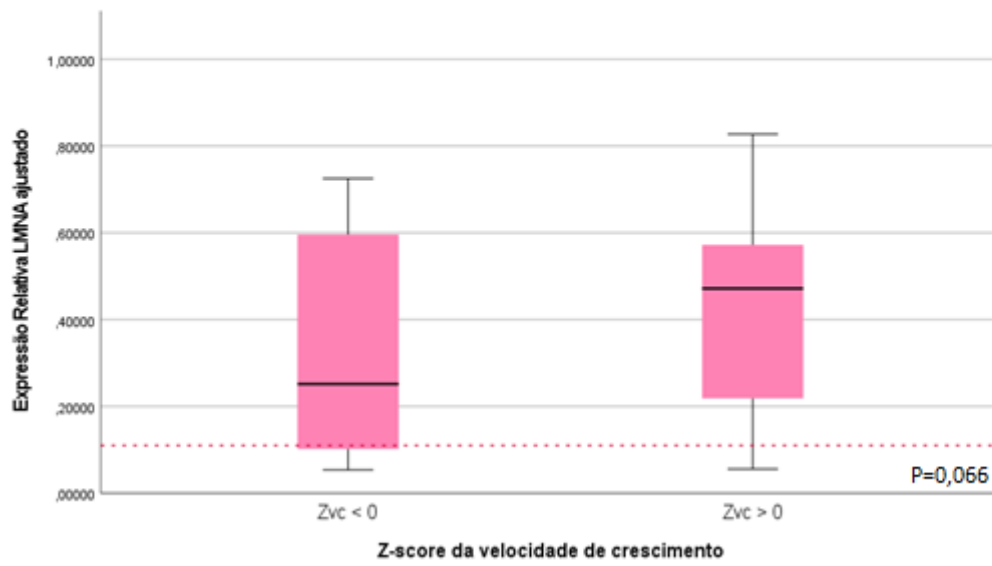
Figura 2 – Medida dos genes ajustados por idade e IGF-1 na população crescendo adequadamente ( $Zvc > 0$ ) e na crescendo inadequadamente ( $Zvc < 0$ ). Respectivamente seguem abaixo: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1-R* (C), *LMNA* (D) e *TRPS1* (E):

**A****B**

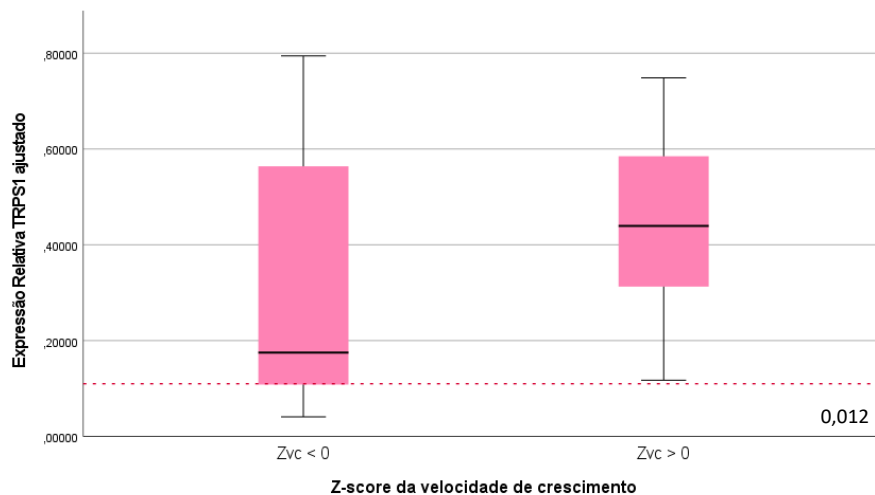
C



D



E



Ao avaliar a medida da expressão dos genes ajustados por idade e a medida do IGF-1 identificamos que o gene NFATC2 apresentou uma área sob a curva (curva ROC) maior que 0,70 (figura 1 e tabela 17). Aproximadamente o terceiro quartil de crianças crescendo bem teve medida do gene ajustada diferente do terceiro quartil de crianças crescendo mal (figura 2 A). Comparando a medida do gene NFATC2 entre os dois grupos, identificamos que esta é diferente entre os mesmos (Qui-quadrado  $p=0,043$ ) (tabela17).

### 4.3. Participantes Selecionados – População Normal

Avaliamos, separadamente, os participantes do estudo que se apresentavam normais quanto à medida de TSH, bem como estatura e velocidade de crescimento ( $n=24$ , sendo 10 do sexo masculino e 14 do sexo feminino).

#### 4.3.1. Características Clínicas dos Participantes – População Normal

Como algumas das características clínicas dos participantes não tinham distribuição normal, optamos por caracterizá-las todas de forma homogênea, através de mediana e intervalo interquartilico, bem como medidas máxima e mínima identificadas de cada variável, como segue abaixo (tabela 20):

Tabela 20 - Características Clínicas da População Normal

Variáveis	Mediana (P25-75)	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	8,08(6,42-10,00)	5,17	14,92
Estatutura (cm)	132,50(120,00-143,50)	109	160,5
Z e	0,74(0,27-1,07)	-0,89	1,32
Ze_IO	0,49(-0,20-1,19)	-2,36	6,72
Delta Ze	0,83(0,44-1,62)	-0,89	2,20
VC (cm/ano)	6,5(5,75-7,90)	0	11,50
Zvc	1,59(-0,39-3,98)	-6,02	6,09
Zvc_IO	0,74(-0,35-3,42)	-1,51	6,04
Massa (kg)	32,00(22,30-46,90)	19,30	60,40
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	18,65(16,24-22,80)	14,75	29,12
ZIMC	0,83(0,33-2,54)	-0,72	3,87
PA Sistólica (mmHg)	100(100-100)	90	110
PA Diastólica(mmHg)	60(50-60)	50	60

Ao avaliarmos as características clínicas da população normal, identificamos também que esta apresenta variabilidade quanto à faixa etária, abrangendo crianças e adolescentes. Ainda, o grupo apresentava variabilidade de ritmos de crescimento: desde jovens em estirão puberal (velocidade de crescimento de 11,5 cm/ano), até adolescentes em final puberal (velocidade de crescimento =0) (tabela 20)

### 4.3.2. Medidas Laboratoriais Encontradas na População Normal

As medidas laboratoriais realizadas são descritas abaixo (tabela 21), na qual cada variável é expressa em mediana, intervalo interquartílico, medidas mínima e máxima).

Tabela 21 - Medidas Laboratoriais da População Normal

Variáveis	Mediana (P25-75)	Mínimo	Máximo
Hb (g/L)	13,30(12,40-13,70)	11,60	13,90
VCM (fl)	80,90(79,90-85,50)	36,80	90,20
CHCM (g/dL)	33,30(32,40-34,10)	29,00	34,60
Ferritina (mg/dL)	45,60(27,60-59,10)	21,00	142,00
Glicemia(mg/dL)	84,50(81,50-86,70)	78,00	94,00
Ureia (mg/dL)	26,00(22,00-30,50)	18,00	41,00
Creatinina (mg/dL)	0,43(0,35-0,49)	0,20	0,63
Colesterol Total (mg/dL)	154,00(142,00-176,50)	129,00	208,00
LDL-C (mg/dL)	91,00(79,50-106,50)	67,00	132,00
HDL-C (mg/dL)	48,00(40,00-56,00)	36,00	84,00
VLDL-C (mg/dL)	13,50(11,25-18,75)	8,00	30,00
Triglicérides (mg/dL)	65,00(52,50-92,50)	38,00	152,00
AST (U/L)	22,50(20,00-24,25)	15,00	29,00
ALT(U/L)	15,00(11,75-18,25)	7,00	24,00
TSH(mUI/L)	4,49(3,09-5,14)	2,19	6,04
T4L (ng/dL)	1,06(0,99-1,18)	0,75	1,33
AATPO (UI/mL)	3,00(3,00-3,00)	3,00	3,00
AATg(UI/mL)	3,10(1,53-5,38)	1,00	34,46
IGF-1(ng/mL)	197,50(136,00-263,00)	81,90	461,00
Volume Tireoidiano (cm <sup>3</sup> )	3,40(3,3-5,8)	2,40	7,50
Idade Óssea (anos)	8,92(5,46-11,00)	3,00	16,00



Como pode ser identificado na tabela 21, a população normal apresentava medidas de função tireoideana, IGF-1, função hepática, renal e medidas hematimétricas dentro da normalidade.

#### 4.3.3. Correlação entre Parâmetros Clínico-Laboratoriais da População Normal :

A partir de todas as medidas realizadas, correlacionamos (Spearman) alguns parâmetros clínicos entre si (tabela 22), parâmetros clínicos e medidas laboratoriais realizadas (tabela 23), medidas hormonais e demais medidas (tabela 24) e medidas dos lípides e demais medidas laboratoriais (tabela 24), como seguem abaixo:

Tabela 22 - Correlação entre os Parâmetros Clínicos - População Normal

		Idade (anos)	Estatura (cm)	Ze	Ze_IO	VC	Zvc	Delta Ze	Massa (Kg)	IMC	ZIMC
Idade (anos)	rs	1,000	,954**	0,085	-0,365	0,032	0,326	-0,209	,855**	,472*	0,083
	p		<0,01	0,729	0,165	0,903	0,202	0,391	<0,01	0,041	0,734
Estatura (cm)	rs	,954**	1,000	0,161	-0,309	0,004	0,256	-0,096	,883**	,499*	0,115
	p	0,000		0,511	0,244	0,987	0,321	0,697	<0,01	0,030	0,639
Ze	rs	0,085	0,161	1,000	0,035	-0,280	-,499*	,537*	0,289	0,317	0,292
	p	0,729	0,511		0,897	0,277	0,041	0,018	0,230	0,186	0,225
Ze_IO	rs	-0,365	-0,309	0,035	1,000	0,420	0,182	0,206	-0,035	0,294	,497*
	p	0,165	0,244	0,897		0,119	0,516	0,444	0,897	0,269	0,050
Vc	rs	0,032	0,004	-0,280	0,420	1,000	,851**	-,615**	-0,039	-0,120	-0,140
	p	0,903	0,987	0,277	0,119		<0,01	0,009	0,882	0,647	0,592
Zvc	rs	0,326	0,256	-,499*	0,182	,851**	1,000	-,695**	0,173	0,000	-0,131
	p	0,202	0,321	0,041	0,516	0,000		0,002	0,507	1,000	0,616
Delta Ze	rs	-0,209	-0,096	,537*	0,206	-,615**	-,695**	1,000	0,045	0,254	0,405
	p	0,391	0,697	0,018	0,444	0,009	0,002		0,854	0,293	0,086
Massa (Kg)	rs	,855**	,883**	0,289	-0,035	-0,039	0,173	0,045	1,000	,819**	,529*
	p	0,000	0,000	0,230	0,897	0,882	0,507	0,854		<0,01	0,020
IMC	rs	,472*	,499*	0,317	0,294	-0,120	0,000	0,254	,819**	1,000	,896**
	p	0,041	0,030	0,186	0,269	0,647	1,000	0,293	0,000		<0,01
ZIMC	rs	0,083	0,115	0,292	,497*	-0,140	-0,131	0,405	,529*	,896**	1,000
	p	0,734	0,639	0,225	0,050	0,592	0,616	0,086	0,020	0,000	

Na população normal deste estudo, identificamos correlação positiva e moderada entre Ze e Delta Ze, dentro do esperado para crianças e

adolescentes saudáveis. Já a VC, bem como o Zvc tinham correlação negativa e moderada com Delta Ze (tabela 22).

Tabela 23 - Correlação entre Parâmetros Clínicos e Medidas Laboratoriais - População Normal

		Idade (anos)	Estatura (cm)	Ze	Ze_IO	VC	Zvc	Zvc_IO	Delta Ze	IMC	ZIMC
Hb (g/dL)	rs	0,049	0,128	0,035	-0,084	-0,160	-0,127	-0,022	0,140	0,398	0,335
	p	0,844	0,602	0,886	0,757	0,539	0,627	0,939	0,567	0,092	0,162
VCM (fl)	rs	0,437	0,392	0,006	0,188	,519*	,647**	,729**	-0,203	,521*	0,396
	p	0,061	0,097	0,980	0,485	0,033	0,005	0,002	0,405	0,022	0,093
Uréia (mg/dL)	rs	0,155	-0,014	-0,289	0,298	,533*	,664**	0,534	-0,429	0,156	0,145
	p	0,553	0,959	0,261	0,301	0,041	0,007	0,060	0,086	0,550	0,579
Cr (mg/dL)	rs	,631**	,696**	-0,264	-0,429	0,037	0,315	0,389	-0,138	0,120	-0,201
	p	0,005	0,001	0,289	0,111	0,892	0,235	0,169	0,585	0,636	0,423
CT (mg/dL)	rs	-0,320	-0,319	0,443	0,323	0,019	-0,097	-0,051	0,444	0,251	0,422
	p	0,210	0,212	0,075	0,260	0,944	0,721	0,864	0,074	0,330	0,091
HDL-C (mg/dL)	rs	-0,096	-0,098	-0,332	0,277	0,247	0,434	0,304	-0,044	-0,072	0,007
	p	0,715	0,709	0,193	0,337	0,356	0,093	0,291	0,866	0,782	0,979
LDL-C (mg/dL)	rs	-0,211	-0,246	,587*	0,081	-0,162	-0,268	-0,077	0,440	0,194	0,299
	p	0,416	0,341	0,013	0,782	0,550	0,316	0,794	0,077	0,456	0,244
VLDL-C (mg/dL)	rs	0,133	0,152	0,143	0,352	0,013	-0,147	-0,187	0,195	0,433	0,452
	p	0,625	0,575	0,597	0,238	0,962	0,602	0,541	0,470	0,094	0,078
TG (mg/dL)	rs	0,161	0,172	0,112	0,332	0,043	-0,116	-0,141	0,148	0,386	0,369
	p	0,538	0,510	0,670	0,246	0,874	0,668	0,631	0,570	0,126	0,145
AST (U/L)	rs	-,689**	-,721**	-0,073	0,085	0,001	-0,259	-0,446	0,143	-,507*	-0,247
	p	0,002	0,001	0,772	0,763	0,996	0,316	0,095	0,571	0,032	0,322
ALT (U/L)	rs	-0,121	-0,059	0,165	0,174	0,038	-0,095	-0,090	0,204	0,327	,475*
	p	0,634	0,815	0,512	0,535	0,885	0,716	0,750	0,417	0,185	0,046
TSH (uUI/mL)	rs	-,526*	-,605**	-0,238	0,497	0,408	0,250	-0,029	-0,135	-0,195	0,092
	p	0,021	0,006	0,327	0,050	0,104	0,333	0,919	0,581	0,424	0,708
T4 L (ng/dL)	rs	-,774**	-,790**	-0,185	0,437	0,003	-0,239	-0,469	0,098	-0,343	0,023
	p	<0,01	<0,01	0,448	0,090	0,991	0,355	0,078	0,691	0,150	0,925
Ac Tg (ng/dL)	rs	-0,046	-0,091	0,065	0,279	0,237	0,135	0,018	-0,064	0,049	0,080
	p	0,853	0,710	0,792	0,295	0,360	0,606	0,950	0,794	0,842	0,745
IGF-1 (ng/mL)	rs	,713**	,764**	-0,168	-,697*	-0,152	0,300	0,083	-0,378	0,168	-0,147
	p	0,009	0,004	0,601	0,025	0,656	0,370	0,831	0,226	0,602	0,648

Na tabela 23 identifica-se correlação positiva (de moderado a forte) entre o volume corpuscular médio (VCM) e todos os parâmetros relacionados a crescimento (VC, Zvc, Zvc\_IO). Também a medida da uréia apresentou

correlação moderada positiva com dois desses marcadores (VC,Zvc). Tanto TSH quanto T4I tiveram correlação negativa (de moderada a forte) com a idade e estatura.

Tabela 24 - Correlação entre Medidas Hormonais e Demais Medidas - População Normal

		TSH (uUI/mL)	T4 L (ng/dL)	ANTI Tg (ng/dL)	IGF-1 (ng/mL)
TSH (uUI/mL)	rs	1,000	0,422	0,397	-0,434
	p		0,072	0,093	0,159
T4 L (ng/dL)	rs	0,422	1,000	0,116	-0,383
	p	0,072		0,636	0,219
ANTI Tg (ng/dL)	rs	0,397	0,116	1,000	-0,147
	p	0,093	0,636		0,649
IGF-1 (ng/mL)	rs	-0,434	-0,383	-0,147	1,000
	p	0,159	0,219	0,649	
Hb (g/dL)	rs	-0,285	-0,335	-,483*	-0,164
	p	0,237	0,161	0,036	0,610
VCM (fl)	rs	-0,086	-0,387	0,020	0,077
	p	0,726	0,101	0,935	0,812
Uréia (mg/dL)	rs	0,476	0,119	0,089	0,318
	p	0,053	0,649	0,734	0,340
Creatinina (mg/dL)	rs	-,476*	-,643**	-0,225	0,315
	p	0,046	0,004	0,370	0,319
CT (mg/dL)	rs	0,259	0,325	0,190	-,709*
	p	0,316	0,203	0,465	0,022
HDL-C (mg/dL)	rs	0,448	0,103	0,250	-0,152
	p	0,071	0,693	0,333	0,675
LDL-C (mg/dL)	rs	0,085	0,227	0,104	-0,600
	p	0,747	0,382	0,690	0,067
VLDL-C (mg/dL)	rs	-0,099	-0,055	-0,454	-0,350
	p	0,716	0,839	0,078	0,356
TG (mg/dL)	rs	-0,234	-0,038	-,540*	-0,164
	p	0,366	0,885	0,025	0,651
AST (U/L)	rs	0,280	,636**	0,073	-0,139
	p	0,260	0,005	0,774	0,684
ALT (U/L)	rs	0,301	0,120	0,411	-0,014
	p	0,224	0,635	0,090	0,968

Tabela 25 - Correlação de Lípidios com Demais Medidas Laboratoriais - População Normal

		CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	VLDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)
CT (mg/dL)	rs	1,000	0,110	,913**	0,317	0,137
	p		0,673	<0,01	0,232	0,599
HDL-C (mg/dL)	rs	0,110	1,000	-0,154	-,554*	-,616**
	p	0,673		0,555	0,026	0,008
LDL-C (mg/dL)	rs	,913**	-0,154	1,000	0,282	0,150
	p	0,000	0,555		0,289	0,564
VLDL-C (mg/dL)	rs	0,317	-,554*	0,282	1,000	,999**
	p	0,232	0,026	0,289		<0,01
TG (mg/dL)	rs	0,137	-,616**	0,150	,999**	1,000
	p	0,599	0,008	0,564	0,000	
TSH (uUI/mL)	rs	0,259	0,448	0,085	-0,099	-0,234
	p	0,316	0,071	0,747	0,716	0,366
T4 L (ng/dL)	rs	0,325	0,103	0,227	-0,055	-0,038
	p	0,203	0,693	0,382	0,839	0,885
ANTI Tg (ng/dL)	rs	0,190	0,250	0,104	-0,454	-,540*
	p	0,465	0,333	0,690	0,078	0,025
IGF-1 (ng/mL)	rs	-,709*	-0,152	-0,600	-0,350	-0,164
	p	0,022	0,675	0,067	0,356	0,651
Hb (g/dL)	rs	0,162	-0,398	0,125	,676**	,604*
	p	0,533	0,114	0,633	0,004	0,010
VCM (fl)	rs	0,195	0,368	0,018	0,050	0,036
	p	0,453	0,146	0,944	0,854	0,892
Uréia (mg/dL)	rs	0,204	0,412	0,035	0,225	0,222
	p	0,466	0,127	0,902	0,420	0,426
Creatinina (mg/dL)	rs	-0,311	0,275	-0,373	0,067	-0,036
	p	0,240	0,303	0,155	0,812	0,894
AST (U/L)	rs	0,184	-0,134	0,156	-0,124	0,008
	p	0,480	0,608	0,549	0,646	0,976
ALT (U/L)	rs	0,464	-0,165	0,382	0,335	0,122
	p	0,061	0,528	0,130	0,204	0,640

Observamos correlação forte e positiva entre colesterol total e LDL-C, bem como entre VLDL e triglicérides. Identificamos correlação forte e negativa entre colesterol total e IGF-1 (tabela 25).

#### 4.3.4. Medida da Expressão dos Genes Selecionados – População Normal

Abaixo segue a medida da quantificação do RNA dos participantes saudáveis incluídos no estudo (tabela 26):

Tabela 26 - Medida da Expressão Relativa dos Genes Analisados- População Normal

Expressão (RE)	Relativa	Mediana(P25-75)	Mínimo	Máximo
<i>IGF1R</i>		0,99(0,35-2,12)	0,10	11,88
<i>NFATC2</i>		1,13(0,38-2,77)	0,07	19,54
<i>LMNA</i>		0,96(0,43-1,80)	0,08	6,48
<i>ADAMTS10</i>		0,83(0,41-1,73)	0,08	5,39
<i>TRPS1</i>		1,17(0,51-2,04)	0,07	10,94

#### 4.3.5. Correlação Entre os Transcritos – População Normal

Tabela 27 - Correlação Entre os Transcritos - População Normal

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
RE_NFATC2	rs	1,000	,703**	,917**	,773**	,924**
	p		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
RE_ADAMTS10	rs	,703**	1,000	,771**	,818**	,536*
	p	0,001		<0,01	<0,01	0,022
RE_IGF1R	rs	,917**	,771**	1,000	,903**	,874**
	p	0,000	0,000		<0,01	<0,01
RE_LMNA	rs	,773**	,818**	,903**	1,000	,736**
	p	0,000	0,000	0,000		0,001
RE_TRPS1	rs	,924**	,536*	,874**	,736**	1,000
	p	0,000	0,022	0,000	0,001	

Também aqui no grupo avaliado de crianças normais, identificamos correlação positiva (de moderada a forte) entre todos os transcritos (tabela 27).

#### 4.3.6. Correlação entre as medidas dos Genes e Parâmetros Clínicos – População Normal :

Tabela 28 - Correlação dos Transcritos com Variáveis Clínicas - População Normal

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
Idade (anos)	rs	0,207	0,143	0,082	0,102	0,053
	p	0,409	0,570	0,748	0,687	0,836
Estatura (cm)	rs	0,168	0,091	0,044	0,069	0,068
	p	0,504	0,720	0,861	0,785	0,788
Ze	rs	0,018	-0,074	0,104	0,191	0,118
	p	0,945	0,769	0,680	0,448	0,642
Delta Ze	rs	-0,020	-0,052	0,034	-0,018	0,167
	p	0,938	0,839	0,893	0,945	0,507
VC	rs	-0,149	-0,153	-0,172	-0,138	-0,260
	p	0,567	0,558	0,510	0,597	0,313
Zvc	rs	-0,314	-0,270	-0,382	-0,314	-0,441
	p	0,220	0,295	0,130	0,220	0,076
Zvc_IO	rs	-0,254	-0,168	-0,275	-0,157	-0,368
	p	0,362	0,550	0,321	0,576	0,177
Ze_IO	rs	-0,038	-0,053	0,050	-0,156	-0,044
	p	0,888	0,846	0,854	0,564	0,871
ZIMC	rs	0,003	0,010	0,042	-0,096	-0,085
	p	0,990	0,968	0,868	0,705	0,738

Inicialmente, ao correlacionar a medida dos transcritos com parâmetros clínicos, não se identificou qualquer correlação (tabela 28)

#### 4.3.7. Correlação dos Transcritos e Medidas Laboratoriais

A seguir, partimos para avaliar possível correlação entre os transcritos e as medidas hormonais e outras variáveis (tabela 29):

Tabela 29 - Correlação dos Transcritos com Medidas Laboratoriais - População Normal

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
TSH (uUI/mL)	rs	-0,350	-0,340	-0,342	-,496*	-0,439
	p	0,155	0,168	0,165	0,036	0,069
T4 L (ng/dL)	rs	0,007	0,082	0,047	-0,027	0,084
	p	0,977	0,747	0,855	0,916	0,741
ANTI Tg (ng/dL)	rs	0,094	0,038	0,020	0,026	-0,040
	p	0,711	0,880	0,938	0,919	0,874
IGF-1 (ng/mL)	rs	-0,245	-0,287	-0,385	-0,259	-0,196
	p	0,443	0,366	0,217	0,417	0,542
Hb (g/dL)	rs	0,017	0,005	0,131	0,126	0,083
	p	0,948	0,984	0,605	0,619	0,743
VCM (fl)	rs	-0,199	0,007	-0,214	-0,119	-0,381
	p	0,428	0,977	0,395	0,639	0,119
CHCM (g/dL)	rs	0,181	-0,260	0,090	0,054	0,327
	p	0,472	0,298	0,722	0,832	0,185
Ferritina (ng/mL)	rs	-0,120	-0,130	-0,074	-0,086	-0,157
	p	0,646	0,619	0,779	0,743	0,548
Glicemia (mg/dL)	rs	,742*	0,359	0,578	0,328	0,444
	p	0,014	0,309	0,080	0,354	0,199
CT (mg/dL)	rs	-0,326	-0,035	-0,203	-0,065	-0,276
	p	0,217	0,897	0,451	0,812	0,300
HDL-C (mg/dL)	rs	-,614*	-0,487	-,733**	-,793**	-,653**
	p	0,011	0,056	0,001	<0,01	0,006
LDL-C (mg/dL)	rs	-0,140	0,104	-0,009	0,168	-0,077
	p	0,606	0,700	0,974	0,535	0,778
VLDL-C (mg/dL)	rs	0,236	0,242	0,370	0,252	0,252
	p	0,397	0,386	0,174	0,364	0,364
TG (mg/dL)	rs	0,321	0,240	0,450	0,355	0,361
	p	0,226	0,371	0,080	0,178	0,170
AST (U/L)	rs	-0,180	-0,020	-0,005	0,088	-0,031
	p	0,490	0,940	0,985	0,737	0,906
ALT (U/L)	rs	-0,114	0,031	-0,027	0,002	-0,125
	p	0,664	0,906	0,918	0,992	0,633
Creatinina (mg/dL)	rs	-0,054	0,025	-0,162	-0,157	-0,061
	p	0,837	0,926	0,535	0,548	0,815
Uréia (mg/dL)	rs	-0,470	-0,464	-,538*	-,612*	-,600*
	p	0,066	0,070	0,032	0,012	0,014

Ao analisar a correlação entre a expressão relativa dos genes e perfil lipídico, identificamos padrão similar ao identificado na avaliação da população total: Dos 5 genes analisados, 4 apresentavam correlação positiva (de moderada a forte) com o HDL-C (tabela 29).

#### 4.3.8. Correlação dos Transcritos e Lípides – População Normal Sem Excesso de Peso

Dos 24 participantes da população normal, 5 apresentavam excesso de peso. Fizemos então uma análise excluindo os mesmos, pensando na possibilidade deste fator (excesso de peso) estar impactando no perfil lipídico e este ser fator confundidor na análise quanto ao HDL-C. Identificamos que a correlação positiva de 4 dos 5 genes com o HDL-C se mantinha (tabela 30)

Tabela 30 Correlação entre Transcritos e Lipídeos - População Normal Sem Excesso de Peso

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
CT (mg/dL)	rs	-0,382	-0,064	-0,282	-0,173	-0,164
	p	0,247	0,853	0,401	0,612	0,631
HDL-C (mg/dL)	rs	<b>-,700*</b>	-0,282	<b>-,809**</b>	<b>-,773**</b>	<b>-,836**</b>
	p	<b>0,016</b>	0,401	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>	<b>0,001</b>
LDL-C (mg/dL)	rs	-0,282	0,036	-0,082	0,045	0,009
	p	0,401	0,915	0,811	0,894	0,979
VLDL- C (mg/dL)	rs	0,049	-0,207	-0,006	-0,165	0,122
	p	0,894	0,565	0,987	0,649	0,737
TG (mg/dL)	rs	0,169	-0,228	0,182	0,073	0,305
	p	0,620	0,501	0,592	0,831	0,361

Identificamos que a correlação positiva de 4 dos 5 genes com o HDL-C se mantinha (tabela 30).

#### 4.3.9. Correlação entre os transcritos, ajustados pelo HDL e variáveis clínicas – População Normal

Com o objetivo de corrigir uma possível interferência gerada pelos valores de HDL, as medidas de expressão relativa dos genes foram corrigidas



pele HDL e esta variável criada foi correlacionada com parâmetros clínicos (tabela 31):

Tabela 31 - Correlação entre os Transcritos, ajustados pelo HDL e Variáveis clínicas - População Normal

		RE_NFATC2 _Adj_HDL	RE_ADAMTS10 _Adj_HDL	RE_IGF1R _Adj_HDL	RE_LMNA _Adj_HDL	RE_TRPS1 _Adj_HDL
Idade (anos)	rs	-0,326	-0,329	-0,229	-0,209	-0,026
	p	0,217	0,213	0,393	0,438	0,922
Estatura (cm)	rs	-0,240	-0,171	-0,125	-0,135	-0,054
	p	0,371	0,527	0,644	0,617	0,841
Ze	rs	0,119	0,153	0,010	-0,200	-0,049
	p	0,660	0,571	0,970	0,457	0,858
Ze_IO	rs	0,073	0,174	0,002	0,231	0,134
	p	0,805	0,553	0,994	0,427	0,648
Delta Ze	rs	-0,128	-0,015	-0,165	-0,100	-0,253
	p	0,637	0,957	0,542	0,712	0,344
VC	rs	0,314	0,329	0,412	0,409	0,424
	p	0,236	0,213	0,113	0,116	0,102
Zvc	rs	0,274	0,224	0,379	0,394	0,494
	p	0,305	0,405	0,147	0,131	0,052
Zvc_IO	rs	0,319	0,231	0,402	0,284	,534*
	p	0,267	0,427	0,154	0,326	0,049
ZIMC	rs	-0,022	-0,188	-0,137	-0,050	0,104
	p	0,935	0,485	0,613	0,854	0,700

Na avaliação entre genes ajustados pelo HDL-C e variáveis clínicas não identificamos qualquer correlação entre os genes e parâmetros relacionados ao crescimento (tabela 31).

#### 4.3.10. Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e variáveis clínicas – População Normal

Tabela 32 - Correlação dos Transcritos, ajustados por Idade, com Variáveis Clínicas - População normal

		RE_NFATC2_ Adj_Idade	RE_ADAMTS10_ Adj_Idade	RE_IGF1R_ Adj_Idade	RE_LMNA_ Adj_Idade	RE_TRPS1_ Adj_Idade
Idade (anos)	rs	-,754**	-,659**	-,699**	-,785**	-,598**
	p	<0,01	0,003	0,001	<0,01	0,009
Estatura (cm)	rs	-,638**	-,546*	-,595**	-,698**	-,548*
	p	0,004	0,019	0,009	0,001	0,018
Ze	rs	0,029	0,203	0,043	-0,023	-0,049
	p	0,909	0,418	0,864	0,929	0,848
Ze_IO	rs	0,324	0,297	0,315	0,485	0,324
	p	0,222	0,264	0,235	0,057	0,222
Delta Ze	rs	0,127	0,277	0,167	0,221	0,062
	p	0,616	0,266	0,507	0,378	0,807
VC	rs	0,211	0,138	0,189	0,101	0,331
	p	0,416	0,597	0,468	0,699	0,195
Zvc	rs	0,061	-0,010	0,056	-0,049	0,216
	p	0,815	0,970	0,830	0,852	0,406
Zvc_IO	rs	-0,004	-0,168	-0,075	-0,229	0,104
	p	0,990	0,550	0,791	0,413	0,713
ZIMC	rs	-0,043	0,011	-0,039	0,008	-0,038
	p	0,864	0,964	0,877	0,974	0,880

Identificamos que os genes, agora ajustados por idade, não apresentavam qualquer correlação com parâmetros relacionados a crescimento (VC, Zvc, Zvc\_IO) (tabela 32).

#### 4.3.11. Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e HDL, com variáveis clínicas – População Normal

Tabela 33 - Correlação dos Transcritos, Ajustados por Idade e HDL, com Variáveis Clínicas- População Normal

		RE_NFATC2 _Adj_Idade _HDL	RE_ADAMTS10 _Adj_Idade _HDL	RE_IGF1R _Adj_Idade _HDL	RE_LMNA _Adj_Idade _HDL	RE_TRPS1 _Adj_Idade _HDL
Idade (anos)	rs	-,621*	-,562*	-,594*	-,600*	-,571*
	p	0,010	0,024	0,015	0,014	0,021
Estatura (cm)	rs	-0,487	-0,431	-0,467	-0,464	-,500*
	p	0,056	0,095	0,069	0,071	0,048
Ze	rs	0,163	0,252	0,228	0,219	0,230
	p	0,546	0,347	0,395	0,415	0,392
Ze_IO	rs	0,288	0,341	0,310	0,486	0,363
	p	0,318	0,233	0,281	0,078	0,203
Delta Ze	rs	0,063	0,125	0,075	0,163	0,054
	p	0,816	0,644	0,782	0,546	0,841
VC	rs	0,270	0,215	0,317	0,292	0,366
	p	0,312	0,424	0,231	0,272	0,163
Zvc	rs	0,085	0,062	0,121	0,062	0,182
	p	0,753	0,820	0,656	0,820	0,499
Zvc_IO	rs	0,020	0,002	0,037	-0,064	0,138
	p	0,946	0,994	0,899	0,829	0,637
ZIMC	rs	-0,010	-0,057	-0,066	0,081	0,062
	p	0,970	0,833	0,807	0,766	0,820

Identificamos que os genes, agora ajustados por idade e HDL não apresentaram qualquer correlação com parâmetros de crescimento ( VC, Zvc, Zvc\_IO) (tabela (33) ).

#### 4.3.12. Correlação entre os transcritos, ajustados por IGF-1 , com variáveis clínicas – População Normal

Elaboramos a correlação entre os transcritos, ajustados agora pela medida do IGF-1, como segue abaixo (tabela 34):

Tabela 34 - Correlação dos Transcritos, ajustados pelo IGF-1, e Variáveis Clínicas - População Normal

		RE_NFATC2 _Adj_IGF1	RE_ADAMTS10 _Adj_IGF1	RE_IGF1R _Adj_IGF1	RE_LMNA _Adj_IGF1	RE_TRPS1 _Adj_IGF1
Idade (anos)	rs	0,126	0,126	0,420	,580*	0,350
	p	0,697	0,697	0,175	0,048	0,265
Estatura (cm)	rs	0,126	0,217	0,417	0,557	0,235
	p	0,696	0,498	0,178	0,060	0,463
Ze	rs	0,077	0,168	-0,172	-0,095	-0,018
	p	0,812	0,601	0,594	0,770	0,957
Ze_IO	rs	-0,358	-0,394	-0,430	-0,333	-0,164
	p	0,310	0,260	0,214	0,347	0,651
Delta ZE	rs	0,175	0,147	0,077	-0,594*	0,119
	p	0,587	0,649	0,812	0,042	0,713
VC	rs	-0,524	-0,722*	-0,386	0,400	-0,202
	p	0,098	0,012	0,241	0,223	0,551
Zvc	rs	-0,009	-0,236	0,164	0,518	0,327
	p	0,979	0,484	0,631	0,102	0,326
Zvc_IO	rs	-0,033	-0,267	-0,133	0,600	0,200
	p	0,932	0,488	0,732	0,088	0,606
ZIMC	rs	0,105	0,056	-0,046	-0,137	0,263
	p	0,745	0,863	0,888	0,672	0,409

Identificamos uma correlação forte e negativa entre a medida da expressão relativa do *ADAMTS10*, ajustado pelo IGF-1 e velocidade do crescimento. (tabela 34).

#### 4.3.13. Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e IGF-1, com variáveis clínicas – População Normal

Tabela 35 - Correlação dos Transcritos, Ajustados por Idade e IGF-1, com Variáveis Clínicas - População Normal

		RE_NFATC2_ Adj_Idade_IGF1	RE_ADAMTS10_ Adj_Idade_IGF1	RE_IGF1R_ Adj_Idade_IGF1	RE_LMNA_ Adj_Idade_IGF1	RE_TRPS1_Adj _Idade_IGF1
Idade (anos)	rs	-,755**	-,902**	-,902**	-,685*	-,860**
	p	0,005	<0,01	<0,01	0,014	<0,01
Estatura (cm)	rs	-,662*	-,816**	-,841**	-,627*	-,869**
	p	0,019	0,001	0,001	0,029	<0,01
Ze	rs	0,256	0,144	0,056	0,193	-0,035
	p	0,422	0,656	0,863	0,549	0,914
Ze_IO	rs	0,103	0,345	0,382	0,394	0,430
	p	0,777	0,328	0,276	0,260	0,214
Delta Ze	rs	0,538	0,364	0,252	0,007	0,294
	p	0,071	0,245	0,430	0,983	0,354
Vc	rs	-0,446	-0,349	-0,225	0,124	-0,175
	p	0,169	0,292	0,505	0,716	0,607
Zvc	rs	-,736**	-,764**	-,673*	-0,464	-0,555
	p	0,010	0,006	0,023	0,151	0,077
Zvc_IO	rs	-,817**	-,867**	-,733*	-0,367	-,700*
	p	0,007	0,002	0,025	0,332	0,036
ZIMC	rs	0,018	-0,060	-0,196	-0,032	-0,175
	p	0,957	0,854	0,541	0,923	0,586

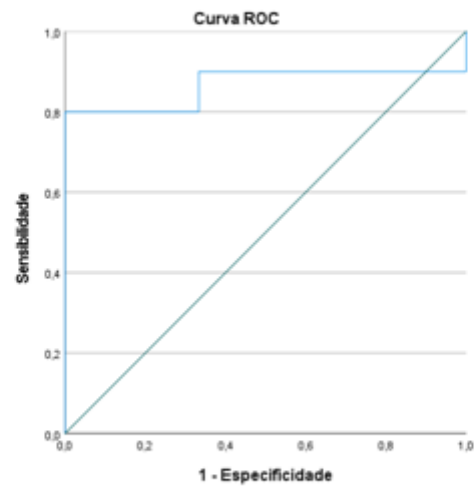
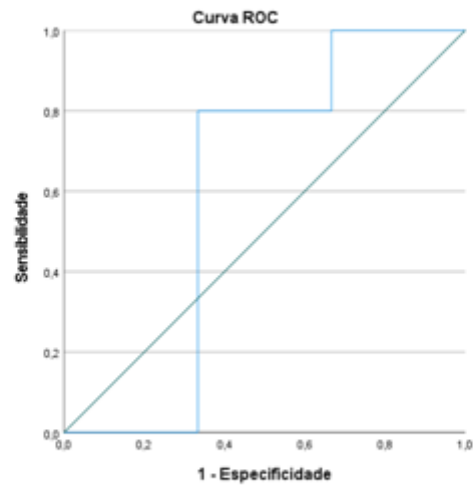
Identificamos que, dos 5 genes, agora ajustados por idade e IGF-1, 4 (*NFATC2*, *ADAMTS10*, *IGF1R* E *TRPS1*) apresentavam correlação forte e negativa com *Zvc\_IO*. Já *NFAT2*, *ADAMTS10* e *IGF1R* apresentavam correlação forte e negativa com *Zvc*. (tabela 35).

#### **4.3.14. Associação dos transcritos, ajustados por idade e pela medida do IGF-1, com Z-score da velocidade de crescimento (Zvc) - População Normal:**

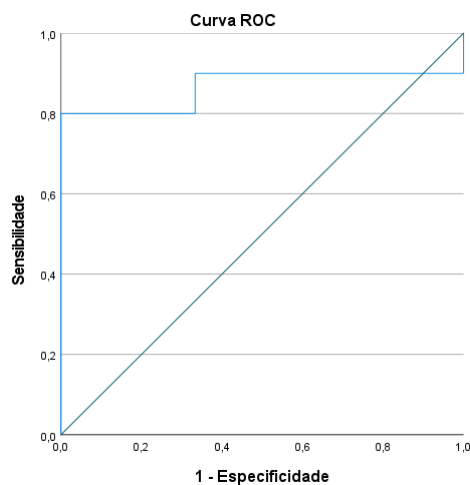
A partir da correlação observada na tabela 35, categorizamos o Z-score da velocidade de crescimento (*Zvc\_categorizado*). Embora conceitualmente o esperado seria considerar um z-score de velocidade de crescimento normal aquele acima de -2 e inadequado aquele abaixo de -2, optamos por uma caracterização mais rígida, já que a população avaliada era normal. Desta forma, consideramos um bom crescimento como aquele no qual Z-score >0 e crescimento inadequado o Z-score < 0. Avaliamos, então, a medida dos transcritos ajustada por idade e pela medida do IGF-1, com o desfecho o Z-score da velocidade de crescimento (*Zvc*). A seguir, podemos visualizar na figura 3 as Curvas Roc geradas, bem como na tabela 36 podemos observar os valores gerados da área sob a curva (AUC) .

Figura 3– – Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1 com *Zvc* categorizada : *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B) e *IGF1R* (C) – Curvas ROC população normal

A



B



C

Tabela 36 - Área Sob a Curva - Genes Transcritos e Velocidade de Crescimento (ZVC) – População Normal

	AUC	Ponto de Corte	Qui-quadrado	p
<i>NFATC2</i>	0,600	0,826	13,0	0,37
<i>ADAMTS10</i>	0,867	0,597	6,24	0,01
<i>IGF1R</i>	0,867	0,608	6,24	0,01

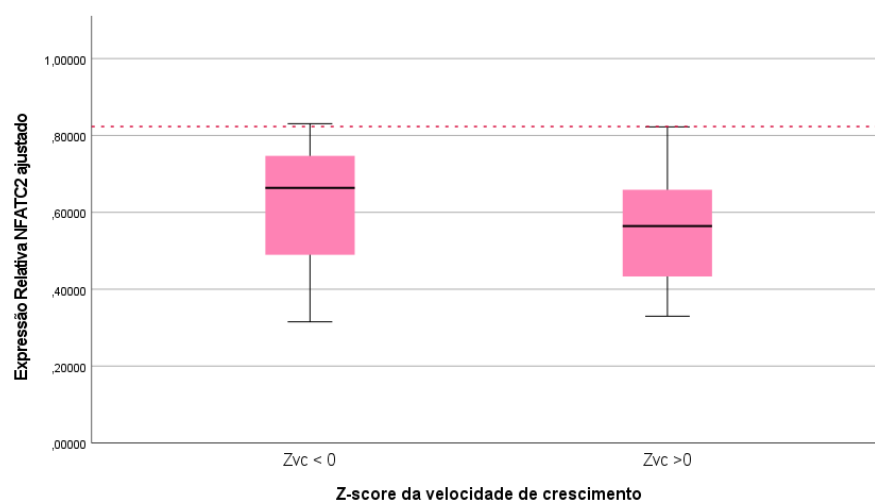
#### 4.3.15. Diferença na Medida da Expressão dos genes, ajustados por Idade e medida do IGF-1, entre a população normal crescendo de forma adequada (Zvc > 0) e aquela crescendo inadequadamente (Zvc < 0)

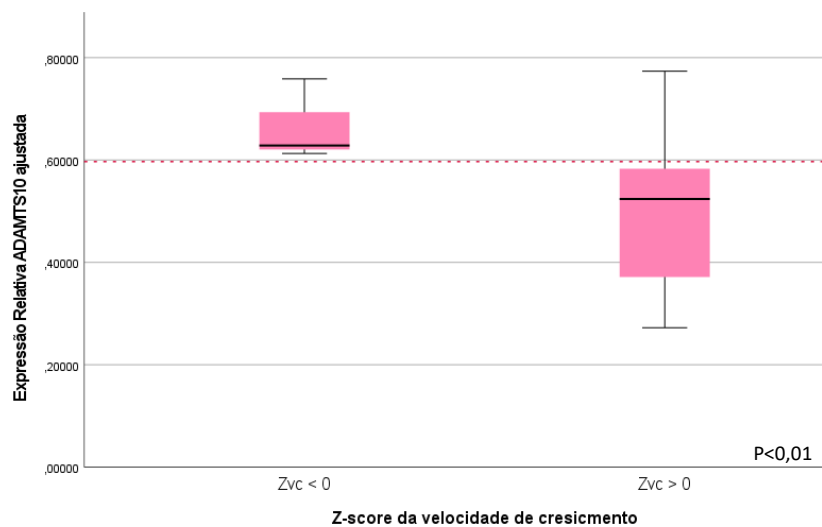
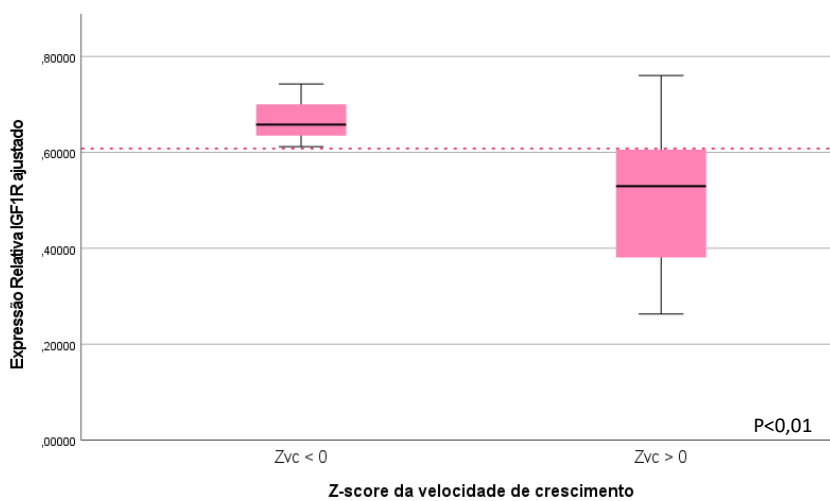
Podemos visualizar na figura 4 a diferença da medida da expressão dos genes, ajustados por idade e a medida do IGF-1, entre a população crescendo de forma adequada (Zvc > 0) e aquela crescendo inadequadamente (Zvc < 0):



Figura 4 – Medida dos genes ajustados por idade e IGF-1 na população crescendo adequadamente ( $Z_{vc} > 0$ ) e na crescendo inadequadamente ( $Z_{vc} < 0$ ). Respectivamente seguem abaixo: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1-R* (C):

**A**



**B****C**

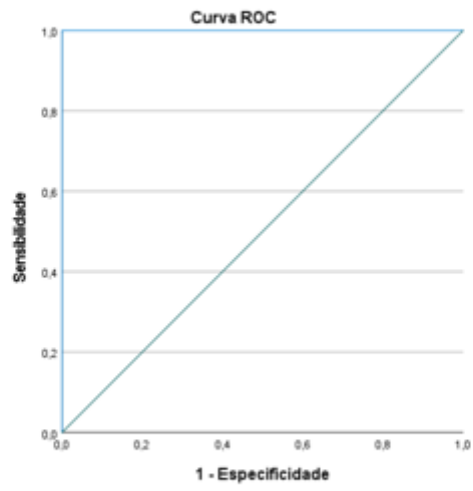
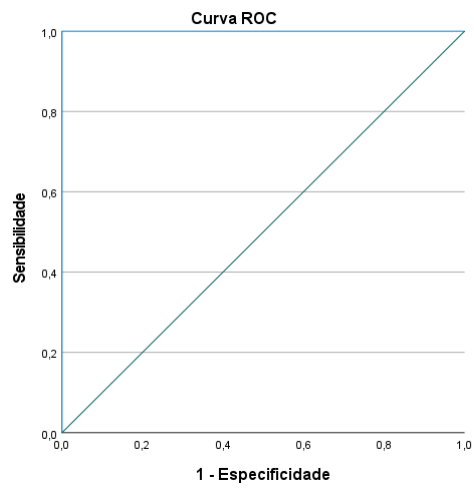
Ao avaliar a medida da expressão dos genes ajustados por idade e a medida do IGF-1 identificamos que os genes *ADAMTS10* e *IGF1-R*

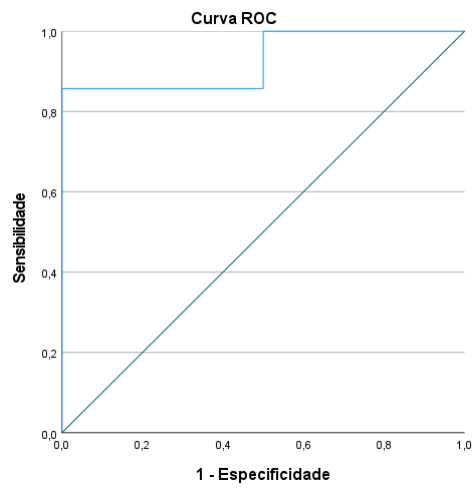
apresentaram uma área sob a curva (curva ROC) maior que 0,70 (figura 3 e tabela 36). Aproximadamente o terceiro quartil de crianças crescendo bem teve medida do gene ajustada diferente das crianças crescendo mal (figura 4 B e C). Comparando a medida dos genes *ADAMTS10* e *IGF1-R* entre os dois grupos, identificamos que esta é diferente entre os mesmos (Qui-quadrado  $p < 0,01$ ) (tabela 36). As medidas dos transcritos *ADAMTS10* e *IGF1R*, ajustadas pela idade e pela medida do IGF-1, foram capazes de diferenciar, quanto à velocidade de crescimento (*Zvc*), os participantes da população normal.

#### **4.3.16. Associação dos transcritos, ajustados por idade e pela medida do IGF-1, com Z-score da velocidade de crescimento corrigida pela idade óssea (*Zvc\_IO*):**

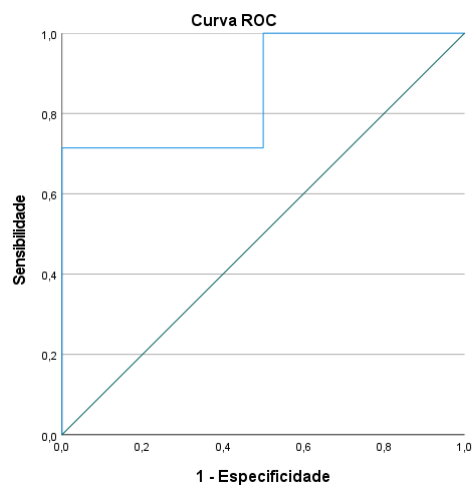
A partir da correlação observada na tabela 35, categorizamos o Zscore da velocidade de crescimento corrigida pela Idade óssea (*Zvc\_IO* categorizado). Embora conceitualmente o esperado seria considerar um z-score da velocidade de crescimento, para a idade óssea, acima de -2 e inadequado aquele abaixo de -2, optamos por uma caracterização mais rígida, já que a população avaliada era normal. Desta forma, consideramos um bom crescimento como aquele no qual Z-score  $> 0$  e crescimento inadequado o Z-score  $< 0$ . Avaliamos a medida dos transcritos, ajustada por idade e pela medida do IGF-1, com o desfecho o Z-score da velocidade de crescimento corrigida pela idade óssea (*Zvc\_IO*). A seguir, podemos visualizar na figura 5 as Curvas Roc geradas, bem como na tabela 37 podemos observar os valores gerados da área sob a curva (AUC).

Figura 5 – – Associação dos transcritos, ajustados por idade e IGF-1 com *Zvc\_IO* categorizada : *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B) *IGF1R* (C) e *TRPS1* (D) – Curvas ROC população normal:

**A****B**



C



D

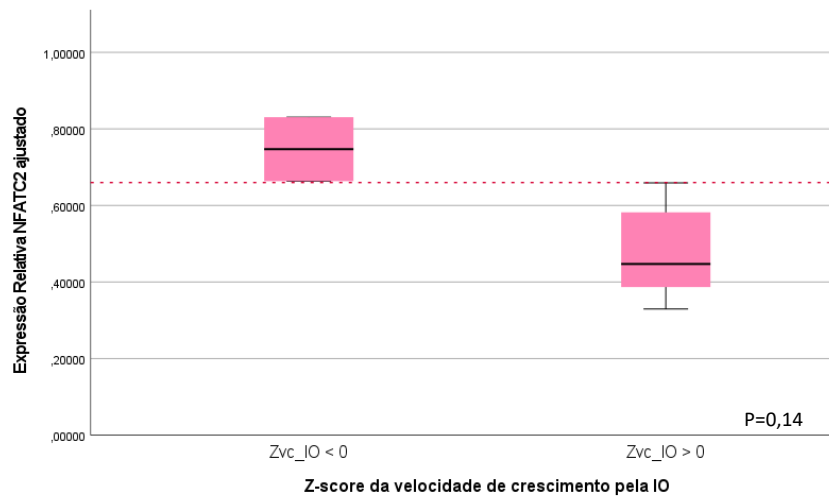
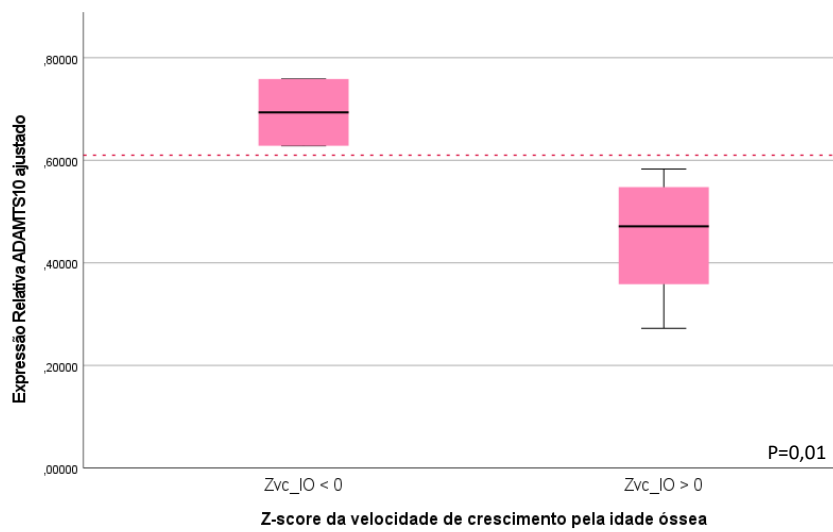
Tabela 37 - Área Sob a Curva - Genes Transcritos e Z Score da Velocidade de Crescimento Corrigida pela Idade Óssea (Zvc\_IO) – população normal

	AUC	Ponto de Corte	Qui-quadrado	p
<i>NFATC2</i>	1,00	0,66	2,35	0,14
<i>ADAMTS10</i>	1,00	0,61	6,24	0,01
<i>IGF1R</i>	0,93	0,58	4,55	0,03
<i>TRPS1</i>	0,86	0,70	2,43	0,12

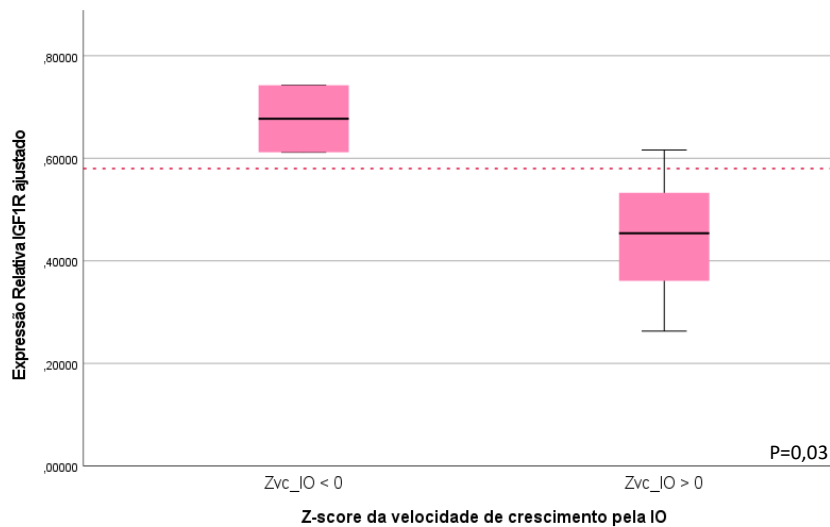
#### 4.3.17. Diferença na Medida da Expressão dos genes, ajustados por Idade e medida do IGF-1, entre a população normal crescendo de forma adequada (Zvc\_IO > 0) e aquela crescendo inadequadamente (Zvc\_IO < 0)

Podemos visualizar na figura 6 a diferença da medida da expressão dos genes, ajustados por idade e a medida do IGF-1, entre a população crescendo de forma adequada (Zvc\_IO > 0) e aquela crescendo inadequadamente (Zvc\_IO < 0).

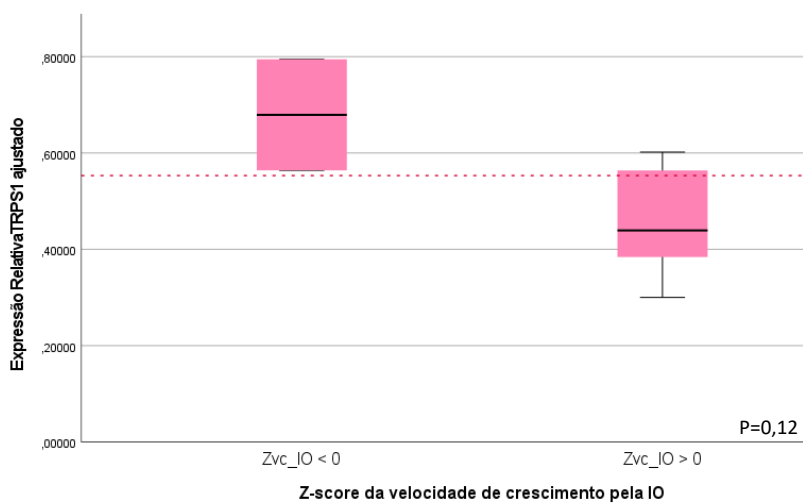
Figura 6 – Medida dos genes ajustados por idade e IGF-1 na população crescendo adequadamente (Zvc\_IO > 0) e na crescendo inadequadamente (Zvc\_IO < 0). Respectivamente seguem abaixo: *NFATC2* (A), *ADAMTS10* (B), *IGF1-R* (C) e *TRPS1* (D):

**A****B**

C



D



Ao avaliar a medida da expressão dos genes ajustados por idade e a medida do IGF-1 identificamos que os genes *NFATC2*, *ADAMTS10*, *IGF1-R* e *TRPS1* apresentaram uma área sob a curva (curva ROC) maior que 0,70 (figura 5 e tabela 37). Identificamos através do ponto de corte que as medidas dos 4 genes ajustadas conseguiram diferenciar os dois grupos de crianças, quanto à Zvc\_IO. (figura 6). Comparando a medida dos genes *ADAMTS10* e *IGF1-R*



entre os dois grupos, identificamos que esta é diferente entre os mesmos (Qui-quadrado  $p=0,01$  e  $p=0,03$ , respectivamente)

#### 4.4. Participantes Selecionados – População com TSH alterado

Avaliamos, separadamente, os participantes do estudo que apresentavam concentrações do TSH alteradas ( $n=21$ , sendo 9 do sexo masculino e 12 do sexo feminino) e que ainda não haviam sido tratados, quando fosse o caso.

##### 4.4.1. Características Clínicas dos Participantes – População com TSH alterado

Como algumas das características clínicas dos participantes não tinham distribuição normal, optamos por caracterizá-las todas de forma homogênea, através de mediana e intervalo interquartilico, bem como medidas máxima e mínima identificadas de cada variável, como segue abaixo (tabela 38):

Tabela 38 - Características Clínicas da População Estudada – Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Variáveis	Mediana (P25-75)	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	12,33(7,58-13,91)	6,00	15,42
Estatura (cm)	149,00(130,50-160,70)	110,50	174,50
Z e	-0,07(-0,86-1,23)	-3,52	1,95
Ze_IO	0,29(-0,92-1,75)	-2,77	2,74
Delta Ze	0,87(0,24-1,88)	-1,43	2,57
VC (cm/ano)	6,00(1,00-6,75)	0,00	9,30
Zvc	0,12(-2,40-2,14)	-6,30	3,70
Zvc_IO	0,00(-0,33-3,55)	-0,35	5,48
Massa (kg)	47,50(30,00-56,30)	18,00	78,40
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	20,38(16,75-24,85)	13,70	28,97
ZIMC	1,32(-0,68-2,57)	-2,94	3,63
PA Sistólica (mmHg)	100,00(100-110)	90	120
PA Diastólica(mmHg)	60,00(60,00-60,00)	50	80

Podemos identificar que a população com TSH alterado também apresentava faixa etária abrangendo crianças e adolescentes (tabela 38).

#### 4.4.2. Medidas Laboratoriais encontradas na População estudada – Crianças e adolescentes com TSH alterado

As medidas laboratoriais realizadas são descritas abaixo (tabela 39), na qual cada variável é expressa em mediana e intervalo interquartilico

Tabela 39- Medidas Laboratoriais da População Estudada - Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Variáveis	Mediana (P25-75)	Mínimo	Máximo
Hb (g/L)	13,50(12,70-14,10)	12,30	14,70
VCM (fl)	86,20(81,93-89,53)	79,50	92,30
CHCM (g/dL)	32,70(31,50-33,63)	30,80	34,60
Ferritina (mg/dL)	42,30(30,40-81,05)	21,90	130,20
Glicemia(mg/dL)	87,00(83,25-93,50)	78,00	105,00
Ureia (mg/dL)	26,50(20,00-31,75)	15,00	48,00
Creatinina (mg/dL)	0,58(0,51-0,70)	0,38	0,87
Colesterol Total (mg/dL)	149,50(133,00-176,25)	100,00	344,00
LDL-C (mg/dL)	88,50(75,50-109,75)	49,00	207,00
HDL-C (mg/dL)	44,00(40,75-49,25)	38,00	114,00
VLDL-C (mg/dL)	12,00(11,00-21,00)	8,00	26,00
Triglicérides (mg/dL)	66,00(56,00-103,50)	41,00	132,00
AST (U/L)	23,00(19,00-28,00)	15,00	64,00
ALT(U/L)	14,00(12,00-18,00)	10	61
TSH(mUI/L)	9,64(7,56-18,37)	6,70	100,00
T4L (ng/dL)	0,96(0,91-1,07)	0,48	1,24
AATPO (UI/mL)	22,35(3,00-456,36)	3,00	1000,00
AATg(UI/mL)	67,95(5,42-182,49)	1,29	1000,00
IGF-1(ng/mL)	242,50(203,00-347,50)	138,00	527,00
Volume Tireoidiano (cm <sup>3</sup> )	5,00(3,40-9,70)	1,6	14,50
Idade Óssea (anos)	13,00(8,42-16,00)	6,00	18,00

Quando analisamos as medidas laboratoriais do grupo de crianças com TSH alterado, identificamos concentrações deste hormônio desde valores considerados como subclínico, até medidas compatíveis com hipotireoidismo franco. Todos os participantes deste grupo apresentavam função hepática, renal, IGF-1 e medidas hematimétricas dentro da normalidade.

#### 4.4.3. Correlação entre Parâmetros Clínico-Laboratoriais da População Estudada – Crianças e Adolescentes com TSH alterado :

A partir de todas as medidas realizadas, correlacionamos (Spearman) alguns parâmetros clínicos entre si (tabela 40), parâmetros clínicos e medidas laboratoriais realizadas (tabela 41), medidas hormonais e demais medidas (tabela 42) e medidas dos lípides e demais medidas laboratoriais (tabela 43), como seguem abaixo:

Tabela 40 - Correlação Entre os Parâmetros Clínicos da População Estudada - Crianças e Adolescentes com TSH alterado

		Idade (anos)	Estatura (cm)	Ze	Ze_IO	VC	Zvc	Delta Ze	Massa (Kg)	IMC	ZIMC
Idade (anos)	rs	1,000	,883**	-0,063	0,204	-0,381	-0,388	-0,428	,579**	-0,007	-,502*
	p		<0,01	0,786	0,505	0,161	0,153	0,067	0,006	0,975	0,020
Estatura (cm)	rs	,883**	1,000	0,344	0,462	-0,295	-0,389	-0,133	,805**	0,188	-0,276
	p	0,000		0,127	0,112	0,286	0,152	0,586	<0,01	0,415	0,227
Ze	rs	-0,063	0,344	1,000	0,440	0,222	0,125	,574*	,518*	0,352	0,403
	p	0,786	0,127		0,133	0,426	0,657	0,010	0,016	0,118	0,070
Ze_IO	rs	0,204	0,462	0,440	1,000	0,134	0,091	0,014	0,038	-0,258	-0,143
	p	0,505	0,112	0,133		0,712	0,803	0,966	0,901	0,394	0,642
VC	rs	-0,381	-0,295	0,222	0,134	1,000	,947**	,547*	-0,394	-0,302	-0,078
	p	0,161	0,286	0,426	0,712		<0,01	0,043	0,147	0,273	0,781
Zvc	rs	-0,388	-0,389	0,125	0,091	,947**	1,000	,613*	-0,443	-0,321	-0,064
	p	0,153	0,152	0,657	0,803	0,000		0,020	0,098	0,243	0,820
Delta Ze	rs	-0,428	-0,133	,574*	0,014	,547*	,613*	1,000	0,068	0,156	0,349
	p	0,067	0,586	0,010	0,966	0,043	0,020		0,781	0,523	0,143
Massa (Kg)	rs	,579**	,805**	,518*	0,038	-0,394	-0,443	0,068	1,000	,692**	0,299
	p	0,006	0,000	0,016	0,901	0,147	0,098	0,781		0,001	0,188
IMC	rs	-0,007	0,188	0,352	-0,258	-0,302	-0,321	0,156	,692**	1,000	,826**
	p	0,975	0,415	0,118	0,394	0,273	0,243	0,523	0,001		<0,01
ZIMC	rs	-,502*	-0,276	0,403	-0,143	-0,078	-0,064	0,349	0,299	,826**	1,000
	p	0,020	0,227	0,070	0,642	0,781	0,820	0,143	0,188	0,000	

Tabela 41 - Correlação entre Parâmetros Clínicos e Medidas Laboratoriais – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

		Idade (anos)	Estatura (cm)	Ze	Ze_IO	VC	Zvc	Zvc_IO	Delta Ze	IMC	ZIMC
Hb (g/dL)	rs	0,437	,518*	0,289	0,387	-0,151	-0,121	-0,469	0,016	-0,026	-0,179
	p	0,061	0,023	0,230	0,239	0,623	0,694	0,203	0,952	0,915	0,463
VCM (fl)	rs	0,134	-0,026	-,484*	-0,115	-0,121	-0,007	-0,287	-0,368	-0,290	-0,354
	p	0,595	0,919	0,042	0,751	0,707	0,983	0,490	0,161	0,243	0,150
Uréia (mg/dL)	rs	-0,431	-0,333	0,075	0,239	-0,257	-0,143	-0,543	0,131	-0,108	0,196
	p	0,058	0,151	0,754	0,455	0,375	0,625	0,105	0,606	0,651	0,407
Cr (mg/dL)	rs	,590**	,563**	-0,056	0,151	-0,475	-0,519	-,646*	-,488*	0,250	-0,096
	p	0,006	0,010	0,813	0,640	0,086	0,057	0,043	0,040	0,288	0,688
CT (mg/dL)	rs	-0,129	-0,369	-0,451	-0,464	-0,156	0,044	0,351	0,118	-0,013	-0,013
	p	0,610	0,132	0,060	0,151	0,610	0,887	0,354	0,664	0,958	0,958
HDL-C (mg/dL)	rs	0,048	-0,043	-0,154	-0,173	0,126	0,163	-0,276	-0,265	-0,354	-0,378
	p	0,849	0,867	0,541	0,612	0,682	0,595	0,472	0,322	0,149	0,122
LDL-C (mg/dL)	rs	-0,104	-0,342	-0,463	-0,473	-0,179	0,000	0,351	0,107	0,052	0,042
	p	0,680	0,165	0,053	0,142	0,559	1,000	0,354	0,692	0,839	0,868
VLDL-C (mg/dL)	rs	-0,359	-0,444	-0,037	-0,114	0,364	0,512	0,529	0,168	0,114	0,294
	p	0,172	0,085	0,891	0,771	0,272	0,108	0,222	0,565	0,673	0,269
TG (mg/dL)	rs	-0,309	-0,441	-0,130	0,018	0,237	0,352	0,452	0,074	0,125	0,327
	p	0,213	0,067	0,607	0,958	0,435	0,239	0,222	0,787	0,621	0,185
AST (U/L)	rs	-0,158	-0,313	-0,410	-0,483	-0,439	-0,305	-0,285	-0,175	-0,087	-0,002
	p	0,519	0,191	0,081	0,132	0,134	0,310	0,458	0,503	0,723	0,994
ALT (U/L)	rs	-0,300	-0,392	-0,124	-0,411	-0,222	-0,089	0,152	0,103	0,290	0,378
	p	0,213	0,097	0,612	0,209	0,466	0,772	0,696	0,693	0,228	0,110
TSH (uUI/mL)	rs	,534*	,435*	-0,006	-0,148	-0,160	-0,132	-0,055	-0,295	0,311	0,010
	p	0,013	0,048	0,980	0,629	0,568	0,639	0,873	0,220	0,170	0,967
T4 L (ng/dL)	rs	-,569*	-,696**	-0,216	0,136	0,167	0,156	-0,274	-0,125	-0,326	0,014
	p	0,011	0,001	0,375	0,689	0,569	0,594	0,444	0,633	0,174	0,955
ANTI Tg (ng/dL)	rs	,669**	,641**	0,169	0,237	-0,358	-0,352	-0,147	-0,204	-0,069	-0,255
	p	0,002	0,004	0,504	0,510	0,253	0,262	0,728	0,450	0,785	0,306
ANTI TPO (UI/mL)	rs	,560**	,454*	0,010	-0,122	-0,431	-0,323	-0,075	-0,068	0,253	-0,035
	p	0,008	0,039	0,966	0,692	0,108	0,240	0,827	0,781	0,269	0,881
IGF-1 (ng/mL)	rs	-0,106	0,204	0,354	-0,667	0,069	-0,018	0,595	0,357	,547*	0,327
	p	0,719	0,483	0,215	0,071	0,850	0,960	0,159	0,231	0,043	0,253

Identificamos correlação moderada e positiva da creatinina com a idade e estatura, bem como correlação moderada e negativa da mesma com Zvc. Ainda, identificamos correlação moderada e positiva entre TSH e idade, bem

como entre TSH e estatura. Ainda, correlação moderada e negativa entre T4l e idade e estatura (tabela 41).

Tabela 42 - Correlação Entre Medidas Hormonais e Demais Medidas - Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

		TSH (uUI/mL)	T4 L (ng/dL)	ANTI Tg (ng/dL)	ANTI TPO (UI/mL)	IGF-1 (ng/mL)
TSH (uUI/mL)	rs	1,000	<b>-,491*</b>	0,103	<b>,439*</b>	0,068
	p		<b>0,033</b>	0,683	<b>0,046</b>	0,817
T4 L (ng/dL)	rs	<b>-,491*</b>	1,000	-0,401	-0,372	-0,253
	p	<b>0,033</b>		0,111	0,117	0,383
ANTI Tg (ng/dL)	rs	0,103	-0,401	1,000	<b>,651**</b>	-0,028
	p	0,683	0,111		<b>0,003</b>	0,931
ANTI TPO (UI/mL)	rs	<b>,439*</b>	-0,372	<b>,651**</b>	1,000	-0,058
	p	<b>0,046</b>	0,117	0,003		0,844
IGF-1 (ng/mL)	rs	0,068	-0,253	-0,028	-0,058	1,000
	p	0,817	0,383	0,931	0,844	
Hb (g/dL)	rs	0,358	-0,266	<b>,534*</b>	0,378	-0,213
	p	0,133	0,287	<b>0,027</b>	0,111	0,464
VCM (fl)	rs	0,257	-0,157	-0,027	-0,101	-0,508
	p	0,303	0,547	0,922	0,690	0,064
Uréia (mg/dL)	rs	-0,225	0,445	-0,150	-0,177	-0,260
	p	0,341	0,056	0,551	0,456	0,370
Creatinina (mg/dL)	rs	0,430	-0,332	0,355	0,243	0,022
	p	0,058	0,165	0,148	0,302	0,940
CT (mg/dL)	rs	-0,011	-0,066	-0,269	0,083	-0,368
	p	0,964	0,801	0,313	0,743	0,216
HDL-C (mg/dL)	rs	0,227	-0,244	-0,072	-0,023	-0,435
	p	0,365	0,345	0,790	0,927	0,137
LDL-C (mg/dL)	rs	-0,117	-0,066	-0,215	0,019	-0,280
	p	0,645	0,801	0,424	0,939	0,354
VLDL-C (mg/dL)	rs	0,091	0,141	-0,202	0,054	-0,430
	p	0,739	0,616	0,490	0,842	0,142
TG (mg/dL)	rs	0,074	0,161	-0,217	0,084	-0,416
	p	0,769	0,537	0,419	0,739	0,157
AST (U/L)	rs	0,119	-0,079	-0,162	-0,204	-0,222
	p	0,627	0,756	0,535	0,403	0,467
ALT (U/L)	rs	-0,130	0,319	-0,184	-0,304	0,135
	p	0,595	0,197	0,480	0,206	0,660

Na tabela 42 identificamos novamente correlação negativa entre TSH e T4l, já discutida anteriormente.

Tabela 43- Correlação Lípidos com Demais Medidas Laboratoriais - Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

		CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	VLDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)
TSH (uUI/mL)	rs	-0,011	0,227	-0,117	0,091	0,074
	p	0,964	0,365	0,645	0,739	0,769
T4 L (ng/dL)	rs	-0,066	-0,244	-0,066	0,141	0,161
	p	0,801	0,345	0,801	0,616	0,537
ANTI Tg (ng/dL)	rs	-0,269	-0,072	-0,215	-0,202	-0,217
	p	0,313	0,790	0,424	0,490	0,419
ANTI TPO (UI/mL)	rs	0,083	-0,023	0,019	0,054	0,084
	p	0,743	0,927	0,939	0,842	0,739
IGF-1 (ng/mL)	rs	-0,368	-0,435	-0,280	-0,430	-0,416
	p	0,216	0,137	0,354	0,142	0,157
Hb (g/dL)	rs	-0,130	0,254	-0,239	-0,120	-0,103
	p	0,619	0,324	0,355	0,659	0,695
VCM (fl)	rs	0,165	0,384	0,062	0,246	0,239
	p	0,542	0,142	0,820	0,357	0,374
Uréia (mg/dL)	rs	-0,311	-0,237	-0,320	-0,060	-0,030
	p	0,209	0,343	0,195	0,827	0,906
Creatinina (mg/dL)	rs	-0,379	-0,056	-0,312	-0,341	-0,317
	p	0,121	0,825	0,208	0,196	0,199
AST (U/L)	rs	,504*	0,297	0,465	0,069	0,049
	p	0,033	0,232	0,052	0,799	0,846
ALT (U/L)	rs	0,435	-0,143	,493*	0,229	0,217
	p	0,071	0,571	0,038	0,393	0,387

#### 4.4.4. Medida da Expressão dos Genes Seleccionados - Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

Tabela 44 - Medida da Expressão Relativa dos Genes Analisados – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

Expressão (RE)	Relativa	Mediana(P25-75)	Mínimo	Máximo
<i>IGF1R</i>		0,74(0,50-1,07)	0,08	3,74
<i>NFATC2</i>		1,09(0,44-2,11)	0,13	8,12
<i>LMNA</i>		0,98(0,55-1,17)	0,24	3,53
<i>ADAMTS10</i>		0,89(0,52-1,25)	0,22	4,06
<i>TRPS1</i>		0,79(0,55-1,53)	0,20	3,05

#### 4.4.5. Correlação entre os Transcritos – Crianças e Adolescentes com TSH alterado

Avaliando a correlação entre os transcritos estudados (Spearman), identificamos que a maioria dos genes selecionados apresentavam correlação entre eles (tabela 45):

Tabela 45 - Correlação entre Transcritos - Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
RE_NFATC2	rs	1,000	,591**	,531*	,896**	,838**
	p		0,006	0,016	<0,01	<0,01
RE_ADAMTS10	rs	,591**	1,000	0,235	,738**	0,370
	p	0,006		0,319	<0,01	0,108
RE_IGF1R	rs	,531*	0,235	1,000	0,383	,561*
	p	0,016	0,319		0,095	0,010
RE_LMNA	rs	,896**	,738**	0,383	1,000	,714**
	p	0,000	0,000	0,095		<0,01
RE_TRPS1	rs	,838**	0,370	,561*	,714**	1,000
	p	0,000	0,108	0,010	0,000	

Quando avaliamos a correlação dos genes entre si, identificamos que a maioria ainda apresenta correlação, de moderada a forte. No entanto, neste grupo alguns genes circulantes deixaram de se correlacionar, como o *ADAMTS10* e *IGF1R*, *ADAMTS10* e *TRPS1*, bem como *IGF1R* e *LMNA* (tabela 45).

#### 4.4.6. Correlação entre as medidas dos Genes e Parâmetros Clínicos – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado:

Tabela 46 - Correlação entre as Medidas dos Genes e Parâmetros Clínicos - Crianças e Adolescentes com TSH alterado

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
Idade (anos)	rs	-0,115	-0,102	0,314	-0,151	-0,073
	p	0,629	0,668	0,178	0,524	0,760
Estatura (cm)	rs	-0,014	-0,143	0,223	-0,015	-0,072
	p	0,952	0,548	0,344	0,950	0,762
Ze	rs	-0,029	-0,195	-0,012	0,069	-0,102
	p	0,905	0,409	0,960	0,772	0,668
Delta Ze	rs	-0,141	-0,408	-0,013	-0,112	-0,090
	p	0,576	0,093	0,958	0,657	0,723
VC	rs	-0,208	-0,113	-0,293	-0,033	-0,206
	p	0,458	0,689	0,289	0,908	0,462
Zvc	rs	-0,243	-0,196	-0,154	-0,068	-0,143
	p	0,383	0,483	0,585	0,810	0,612
Zvc_IO	rs	-0,310	-0,310	-0,251	-0,187	-0,219
	p	0,354	0,354	0,457	0,582	0,518
Ze_IO	rs	0,181	0,071	0,060	0,176	0,060
	p	0,553	0,817	0,845	0,566	0,845
ZIMC	rs	0,286	0,176	-0,135	0,322	0,129
	p	0,222	0,458	0,569	0,166	0,587

Não houve qualquer correlação entre a medida dos genes circulantes e parâmetros clínicos no grupo de crianças com TSH alterado (tabela 46).

#### 4.4.7. Correlação dos Transcritos e Medidas Laboratoriais – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

A seguir, partimos para avaliar possível correlação entre os transcritos e as medidas hormonais e outras variáveis (tabela 47):



Tabela 47 - Correlação da Expressão Relativa dos Transcritos Circulantes com Medidas Laboratoriais - Crianças e Adolescentes com TSH alterado

		RE_NFATC2	RE_ADAMTS10	RE_IGF1R	RE_LMNA	RE_TRPS1
TSH (uUI/mL)	rs	-0,119	0,062	0,047	-0,035	-0,150
	p	0,618	0,794	0,845	0,885	0,527
T4 L (ng/dL)	rs	-0,219	0,001	-0,405	-0,260	-0,243
	p	0,383	0,997	0,096	0,297	0,332
ANTI Tg (ng/dL)	rs	-0,214	-0,351	0,113	-0,292	-0,066
	p	0,410	0,167	0,666	0,255	0,800
ANTI TPO (UI/mL)	rs	-0,129	-0,137	0,235	-0,188	-0,135
	p	0,587	0,565	0,319	0,427	0,569
IGF-1 (ng/mL)	rs	-0,005	-0,484	-0,319	-0,121	-0,077
	p	0,986	0,094	0,289	0,694	0,803
Hb (g/dL)	rs	-0,219	-0,355	-0,022	-0,095	0,040
	p	0,382	0,149	0,932	0,707	0,874
VCM (fl)	rs	0,397	0,434	0,199	,525*	,527*
	p	0,115	0,082	0,445	0,031	0,030
CHCM (g/dL)	rs	-0,160	0,282	0,034	0,021	-0,010
	p	0,541	0,272	0,896	0,937	0,970
Ferritina (ng/mL)	rs	0,035	0,279	0,285	0,324	0,103
	p	0,897	0,295	0,284	0,222	0,704
Glicemia (mg/dL)	rs	-0,066	-0,217	0,403	-0,131	0,077
	p	0,822	0,457	0,153	0,656	0,792
CT (mg/dL)	rs	0,208	0,037	,625**	0,054	0,412
	p	0,422	0,889	0,007	0,837	0,101
HDL-C (mg/dL)	rs	-0,073	-0,012	0,041	0,010	0,156
	p	0,782	0,963	0,877	0,970	0,549
LDL-C (mg/dL)	rs	0,213	0,029	,578*	0,051	0,355
	p	0,411	0,911	0,015	0,844	0,162
VLDL-C (mg/dL)	rs	0,282	0,482	0,468	0,273	0,428
	p	0,309	0,069	0,079	0,325	0,111
TG (mg/dL)	rs	0,309	,510*	0,418	0,324	0,411
	p	0,227	0,036	0,095	0,205	0,101
AST (U/L)	rs	0,175	-0,087	0,114	0,047	0,369
	p	0,488	0,732	0,653	0,855	0,132
ALT (U/L)	rs	-0,129	-0,169	-0,037	-0,245	0,115
	p	0,611	0,502	0,883	0,327	0,649
Creatinina (mg/dL)	rs	-0,211	0,094	-0,212	-0,066	-0,294
	p	0,387	0,702	0,383	0,789	0,222
Uréia (mg/dL)	rs	-0,033	0,036	-0,268	0,113	-0,068
	p	0,895	0,883	0,268	0,646	0,783

Ao analisar a correlação entre a expressão relativa dos genes e perfil lipídico, identificamos que houve perda da correlação com o HDL colesterol, identificada anteriormente, tanto na população total, quanto na população normal (tabela 47).

#### 4.4.8. Correlação entre os transcritos, ajustados pelo HDL e variáveis clínicas – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado:

Tabela 48 -Correlação dos Transcritos, Ajustados pelo HDL e Variáveis Clínicas – Crianças e Adolescentes com TSH alterado

		RE_NFATC2_ Adj_HDL	RE_ADAMTS10_ Adj_HDL	RE_IGF1R_ Adj_HDL	RE_LMNA_ Adj_HDL	RE_TRPS1_ Adj_HDL
Idade (anos)	rs	0,325	0,348	-0,131	0,310	0,195
	p	0,203	0,171	0,616	0,226	0,453
Estatura (cm)	rs	0,246	0,435	0,063	0,259	0,255
	p	0,340	0,081	0,812	0,316	0,323
Ze	rs	0,054	0,392	0,287	0,069	0,181
	p	0,837	0,119	0,264	0,794	0,486
Ze_IO	rs	-0,018	-0,082	0,109	0,045	-0,009
	p	0,958	0,811	0,750	0,894	0,979
Ze	rs	0,150	0,464	0,279	0,204	0,232
	p	0,594	0,081	0,315	0,467	0,405
VC	rs	0,067	0,106	0,089	-0,039	0,047
	p	0,828	0,730	0,772	0,899	0,878
Zvc	rs	0,126	0,143	-0,005	-0,060	-0,044
	p	0,681	0,642	0,986	0,845	0,887
Zvc_IO	rs	0,259	0,502	0,234	0,226	0,151
	p	0,500	0,168	0,544	0,559	0,699
ZIMC	rs	-0,230	-0,012	0,385	-0,164	0,012
	p	0,374	0,963	0,127	0,529	0,963

Não identificamos qualquer correlação entre os transcritos, ajustados pelo HDL, e variáveis clínicas, como pode ser identificado na tabela 48.

#### 4.4.9. Correlação entre os transcritos, ajustados por idade e variáveis clínicas – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado:

Tabela 49 - Correlação dos Transcritos, Ajustados por Idade, e Variáveis Clínicas – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

		RE_NFATC2 _Adj_Idade	RE_ADAMTS10_ Adj_Idade	RE_IGF1R_ Adj_Idade	RE_LMNA_Adj _Idade	RE_TRPS1_Adj_ Idade
Idade (anos)	rs	-,849**	-,750**	-,915**	-,941**	-,886**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Estatura (cm)	rs	-,823**	-,664**	-,791**	-,865**	-,799**
	p	<0,01	0,001	<0,01	<0,01	<0,01
Ze	rs	-0,009	0,129	-0,009	-0,029	-0,015
	p	0,970	0,587	0,970	0,905	0,950
Ze_IO	rs	-0,280	-0,363	-0,115	-0,187	-0,121
	p	0,354	0,223	0,707	0,541	0,694
Delta Ze	rs	0,387	,612**	0,362	0,408	0,337
	p	0,113	0,007	0,140	0,093	0,171
VC	rs	0,465	0,406	0,455	0,448	0,477
	p	0,081	0,133	0,088	0,094	0,072
Zvc	rs	,529*	0,496	0,404	0,450	0,454
	p	0,043	0,060	0,136	0,092	0,089
Zvc_IO	rs	0,515	,633*	0,437	0,428	0,428
	p	0,105	0,036	0,179	0,189	0,189
ZIMC	rs	0,211	0,316	0,373	0,317	0,304
	p	0,373	0,175	0,105	0,173	0,193

Identificamos que dois dos cinco genes, agora ajustados por idade, apresentavam correlação moderada e positiva com parâmetros avaliadores de crescimento: *NFATC2* e *Zvc*, bem como *ADAMTS10* e *Zvc\_IO*, como descrito na tabela 49.

#### 4.4.10. Correlação entre os transcritos, ajustados por Idade e HDL, por IGF-1, por IGF-1 e idade; com variáveis clínicas – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

Nas tabelas abaixo, podemos identificar as correlações realizadas (tabelas 50 a 52):

Tabela 50 - Correlação dos Transcritos, Ajustados por Idade e HDL, com Variáveis Clínicas - Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

		RE_NFATC2 _Adj_Idade _HDL	RE_ADAMTS10 _Adj_Idade _HDL	RE_IGF1R _Adj_Idade _HDL	RE_LMNA _Adj_Idade _HDL	RE_TRPS1 _Adj_Idade _HDL
Idade (anos)	rs	-,685**	-0,250	-,688**	-,600*	-0,452
	p	0,002	0,333	0,002	0,011	0,068
Estatura (cm)	rs	-,549*	-0,113	-0,446	-,508*	-0,273
	p	0,022	0,666	0,072	0,037	0,288
Ze	rs	0,208	0,402	0,289	0,110	0,297
	p	0,422	0,110	0,260	0,673	0,248
Ze_IO	rs	-0,073	-0,291	0,136	-0,118	0,155
	p	0,832	0,385	0,689	0,729	0,650
Delta Ze	rs	,518*	,789**	0,464	0,446	0,443
	p	0,048	<0,01	0,081	0,095	0,098
VC	rs	0,279	0,243	0,329	0,064	0,301
	p	0,356	0,424	0,272	0,835	0,317
Zvc	rs	0,363	0,357	0,280	0,121	0,231
	p	0,223	0,231	0,354	0,694	0,448
Zvc_IO	rs	0,418	0,636	0,335	0,285	0,653
	p	0,262	0,066	0,379	0,458	0,057
ZIMC	rs	0,338	0,208	0,475	0,314	0,409
	p	0,184	0,422	0,054	0,220	0,103

Tabela 51- Correlação dos Transcritos, Ajustados por IGF-1, com Variáveis Clínicas – Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

		RE_NFATC2_ Adj_IGF1	RE_ADAMTS10_ Adj_IGF1	RE_IGF1R_ Adj_IGF1	RE_LMNA_ Adj_IGF1	RE_TRPS1_ Adj_IGF1
Idade (anos)	rs	0,083	0,006	-0,190	-0,261	-0,011
	p	0,789	0,986	0,535	0,388	0,972
Estatura (cm)	rs	-0,049	0,110	0,181	0,203	0,170
	p	0,873	0,721	0,553	0,505	0,578
Ze	rs	-0,258	0,033	0,308	,659*	0,159
	p	0,394	0,915	0,306	0,014	0,603
Ze_IO	rs	-0,548	-0,405	-0,571	-0,190	-0,310
	p	0,160	0,320	0,139	0,651	0,456
Delta Ze	rs	-0,028	0,168	0,329	0,420	0,042
	p	0,931	0,602	0,297	0,175	0,897
VC	rs	-0,207	-0,019	0,238	0,401	-0,006
	p	0,566	0,959	0,507	0,250	0,986
Zvc	rs	-0,079	0,139	0,030	0,236	-0,103
	p	0,829	0,701	0,934	0,511	0,777
Zvc_IO	rs	-0,072	0,198	0,631	0,523	-0,126
	p	0,878	0,670	0,129	0,229	0,788
ZIMC	rs	0,038	0,154	0,484	,615*	0,192
	p	0,901	0,616	0,094	0,025	0,529

Tabela 52 - Correlação Entre Transcritos, ajustados por idade e IGF-1, com Variáveis Clínicas - Crianças e Adolescentes com TSH Alterado

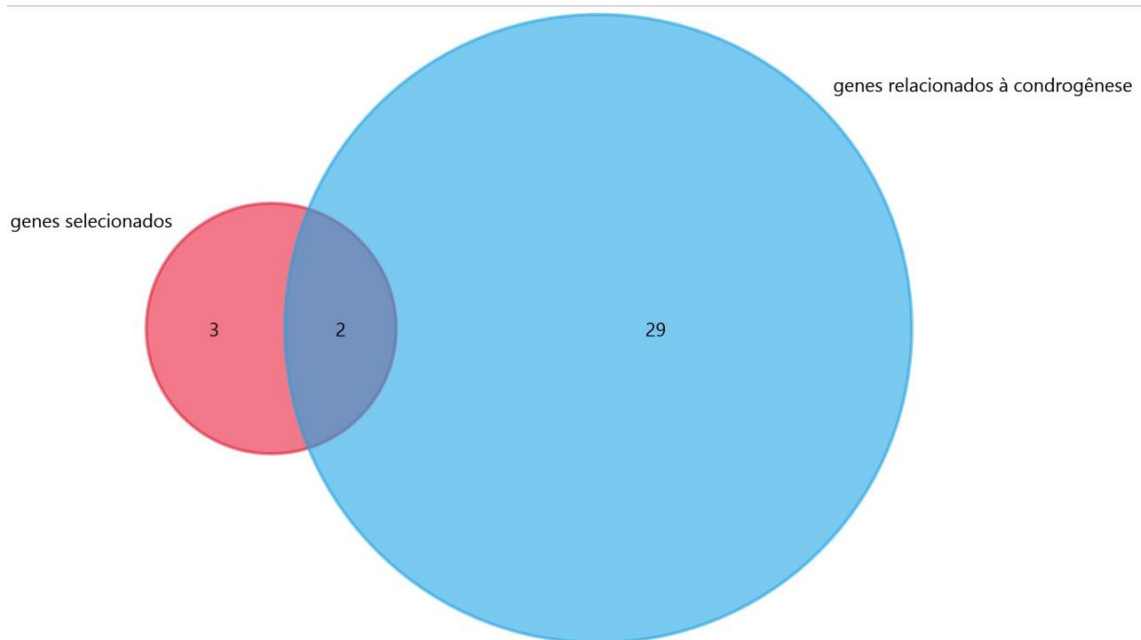
		RE_NFATC2 _Adj_Idade _IGF1	RE_ADAMTS10 _Adj_Idade _IGF1	RE_IGF1R _Adj_Idade _IGF1	RE_LMNA _Adj_Idade _IGF1	RE_TRPS1 _Adj_Idade _IGF1
Idade (anos)	rs	-,894**	-,919**	-,949**	-,913**	-,927**
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Estatura (cm)	rs	-,659*	-,692**	-,703**	-,593*	-,692**
	p	0,014	0,009	0,007	0,033	0,009
Ze	rs	0,412	0,451	0,516	,610*	0,445
	p	0,162	0,122	0,071	0,027	0,128
Ze_IO	rs	-0,548	-0,548	-0,452	-0,381	-0,500
	p	0,160	0,160	0,260	0,352	0,207
Delta Ze	rs	,713**	,734**	,776**	,776**	,741**
	p	0,009	0,007	0,003	0,003	0,006
VC	rs	0,483	0,521	0,521	0,452	0,483
	p	0,157	0,123	0,123	0,190	0,157
Zvc	rs	0,442	0,515	0,515	0,418	0,430
	p	0,200	0,128	0,128	0,229	0,214
Z_VC_IO	rs	0,721	0,721	0,721	0,631	0,721
	p	0,068	0,068	0,068	0,129	0,068
Z_IMC	rs	,665*	,643*	,687**	,725**	,632*
	p	0,013	0,018	0,010	0,005	0,021

Não identificamos correlação entre as medidas dos genes ajustados por idade e HDL-C (tabela 50), por IGF-1 (tabela 51), bem como por idade e IGF-1 (tabela 52) e marcadores de crescimento (vc, Zvc, Zvc\_IO).

#### 4.5. Associação entre os Genes selecionados neste estudo e os principais genes relacionados à condrogênese:

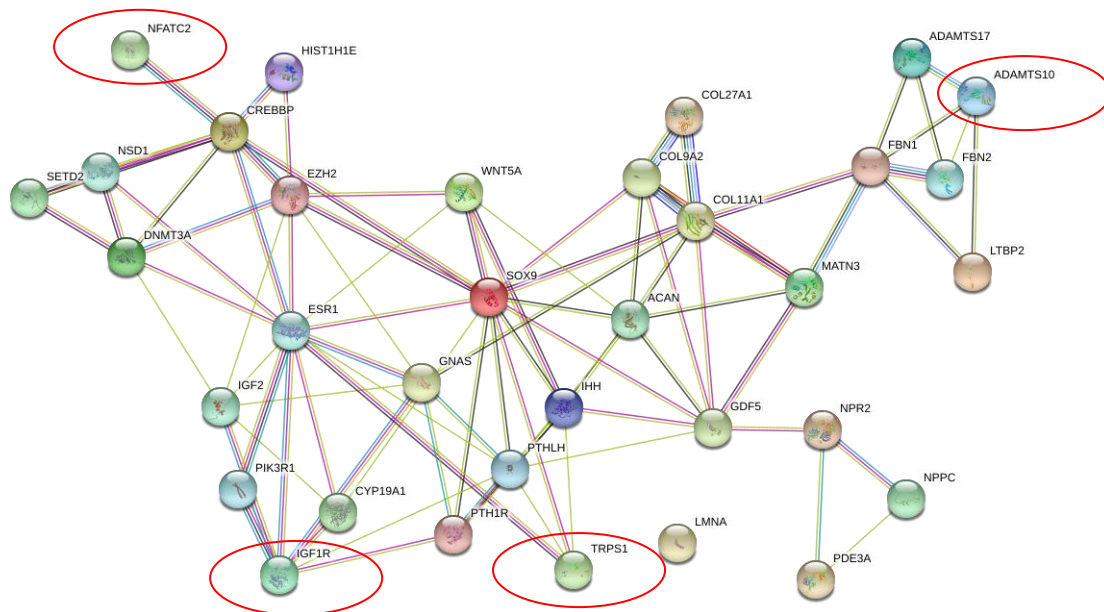
Tendo como base os principais genes associados à condrogênese já descritos na literatura (*ACAN, ADAMTS17, ADAMTS10, COL9A2, COL11A1, COL27A1, FBN1, FBN2, LTBP2, MATN3, CREBBP, GNAS, PDE3A, SOX9, GDF5, IGF2, IHH, NPPC, NPR2, PTH1R, PTHLH e WNT5A, CYP19A1, ESR1, IGF1R, PIK3R1, DNMT3A, EZH2, HIST1H1E, NSD1 e SETD2*), identificamos que 2 haviam sido selecionados por nós (*IGF1R e ADAMTS10*) (figura 7):

Figura 7 - Venn entre Genes Selecionados à Condrogênese



Ao associarmos nosso genes aos demais já descritos (network), identificamos uma interação entre os genes *ADAMTS10*, *IGF1R*, *NFATC2* e *TRPS1* com os demais, como pode ser identificado na figura abaixo (figura 8):

Figura 8 Network entre Genes Selecionados neste Estudo e Genes Relacionados à Condrogênese



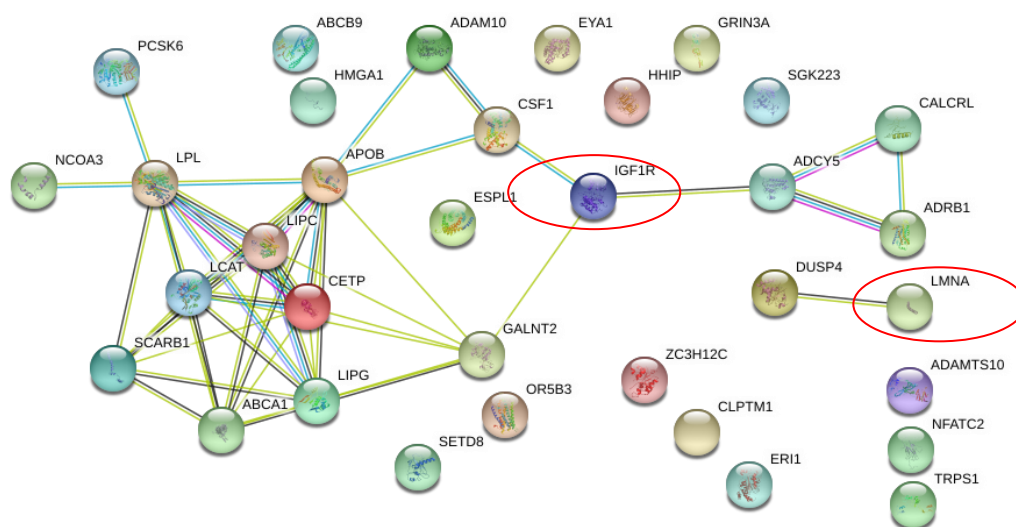


#### 4.6. Associação entre os Genes selecionados neste estudo e os principais genes relacionados ao HDL colesterol:

Em decorrência da associação que identificamos entre os transcritos de nosso estudo e a medida do HDL, buscamos na literatura os genes associados ao HDL, que resultaram nos seguintes: *CSF1*, *CALCRL*, *ADCY5*, *HHIP*, *DUSP4*, *NOA2*, *EYA1*, *GP1HBP1*, *ADRB1*, *MAPK81P1*, *OR5B3*, *ZC3H12C*, *RP11-283GG5*, *ESPL1*, *PCSK6*, *MAPILC3A*, *NCOA3*, *PTTGIIIP*, *HMGA1*, *SGK223*, *ERI1*, *ABCA1*, *ABCB9*, *SETD8*, *SCARB1*, *ADAM10*, *CETP*, *LIPG*, *LPL*, *LIPC*, *LCAT*, *APOA1C3A4A5*, *APOB*, *MADD-FOLH1*, *CTF-PRMT8*, *GALNT2*, *CLPTM1* e *GRIN3A* (59,60).

Fizemos então uma interação (network) entre os genes selecionados neste estudo e os genes relacionados ao HDL colesterol (figura 9). Nota-se uma interação menos relevante entre o gene *IGF1R* e os demais, bem como apenas 1 interação entre o gene *LMNA* e os demais.

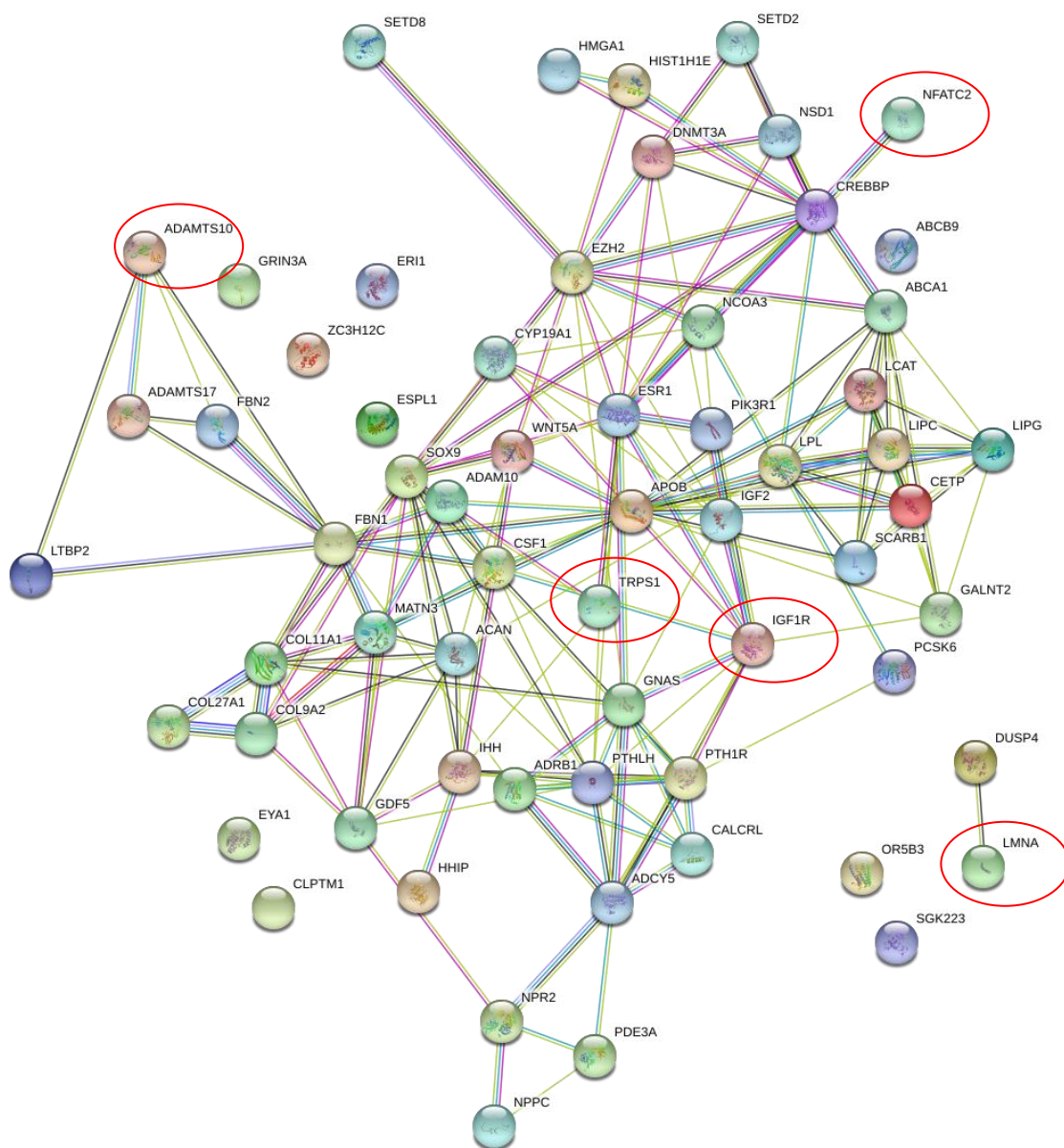
Figura 9 - Network entre Genes Selecionados no Estudo e Genes relacionados ao HDL



**4.7. Associação entre os Genes selecionados neste estudo e os principais genes relacionados ao HDL colesterol e à condrogênese (figura 10):**

A fim de evidenciar uma associação maior entre os genes selecionados deste estudo, os relacionados ao HDL e à condrogênese, construímos um network com todos eles. A princípio, não parece ter gerado uma associação maior entre os 3 grupos de genes

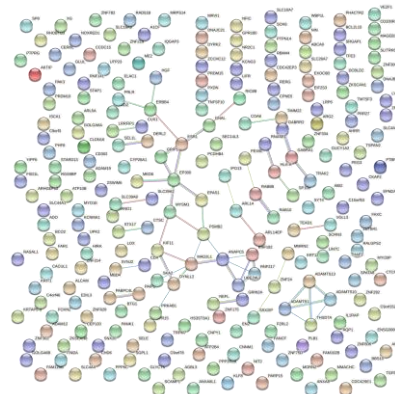
Figura 10- Network entre genes selecionados e genes relacionados a condrogênese e ao HDL



#### 4.8. microRNAs mais abundantes encontrados em HDL-C de indivíduos normais – interação entre alvos

Selecionamos 3 dos microRNA mais abundantemente encontrados no HDL-C de indivíduos adultos saudáveis (miR-135 a\*, miR188-5p e miR-877) e, identificamos os alvos utilizando o banco de dados on line miRDB. Posteriormente a isso, realizamos interação proteína-proteína através do software STRING, como já havíamos descrito anteriormente:

Figura 11 – Interação proteína-proteína entre miR-135a\* e seus genes-alvo

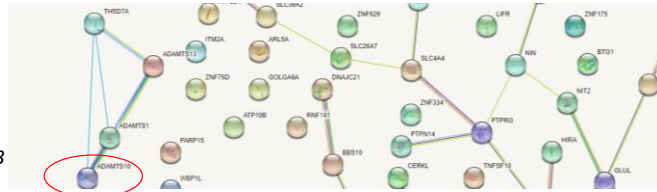


miR -135 a\* - nenhum dos genes de nosso estudo eram alvo conhecido

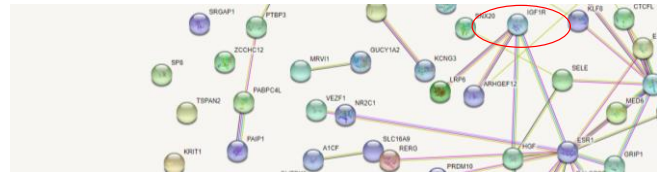
Figura 12 – Interação proteína- proteína : genes de nosso estudo e genes alvo do miR135 a\*

miR 135 a \*

ADAMTS10 : THSD7A, ADAMTS1, ADAMTS13



IGF1R: ARHGEF12, LRP6, HGF, ESR1



TRPS1: CCDC15, UTP23, ESR1

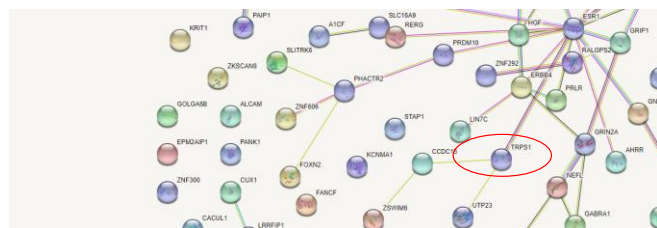
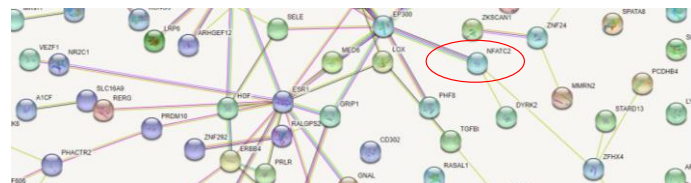


Figura 13 - Interação proteína- proteína : genes de nosso estudo e genes alvo do miR135 a\*

miR 135 a \*

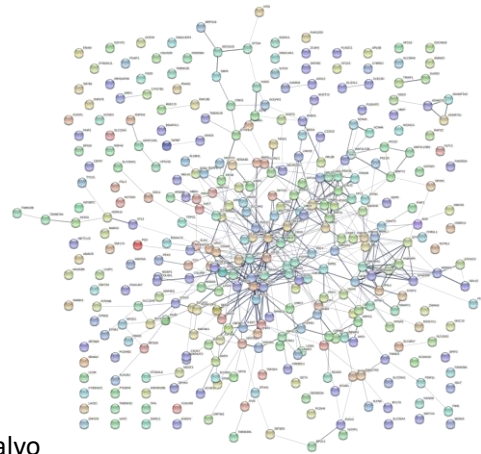
NFATC2: DYRK2, ZFH4, EP300



LMNA: CKAP2, KIFII, AKTIP



Figura 14- Interação proteína-proteína entre miR-188-5p e seus genes-alvo



miR -188-5p - nenhum dos genes de nosso estudo era alvo

Figura 15 - Interação proteína- proteína : genes de nosso estudo e genes alvo do miR188-5p

miR 188 - 5 p

*ADAMTS10: ADAMTS3, ADAMTSL1, ADAMTS13  
ADAMTS1*

*IGF1R: RNF41, AKT1S1, NRP2, RICTOR, PTEN, ESRI,  
PIK3RI, CRKC, ITGAN, SOSI, RASA1, KITL6,RRAS2,  
RADSID*

*TRPS1: ESR1, UBE2I*

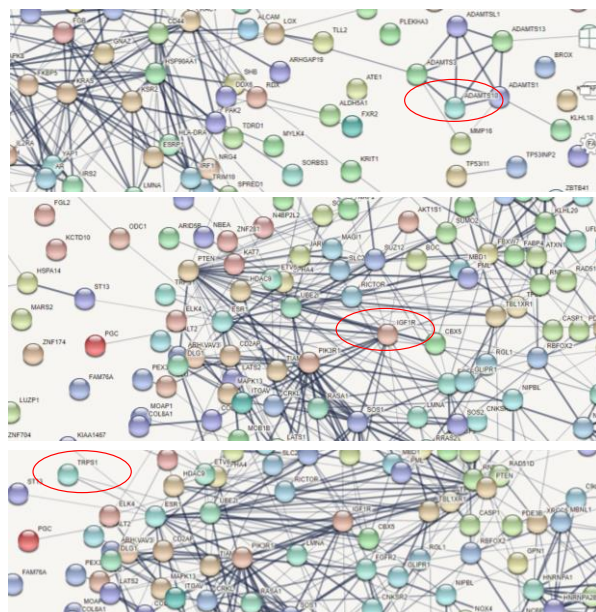


Figura 16 - Interação proteína- proteína : genes de nosso estudo e genes alvo do miR188-5p

miR 188 5 p

*NFATC2*: *PPP3R1*, *ZFX4*, *GPC6*, *SLC8A3*  
*CBFB*, *IL2RA*, *MEF2C*



*LMNA*: *CNKSR2*, *CASPI*, *NOX4*, *LRRC1*,  
*CKAP2*, *LATS2*, *UBES1*, *SH3TC2*, *GDAP1*

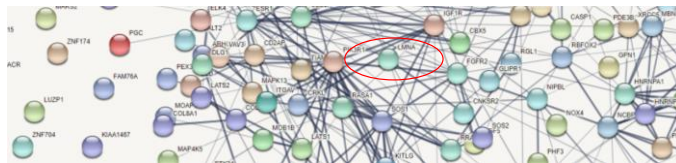
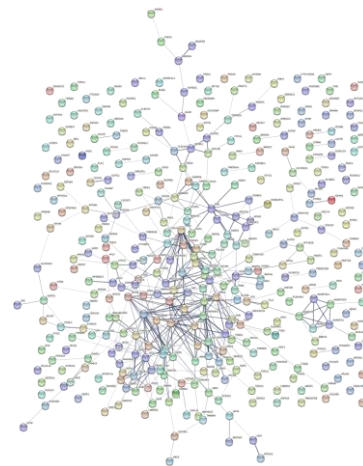


Figura 17 - Interação proteína-proteína entre miR-877 e seus genes-alvo

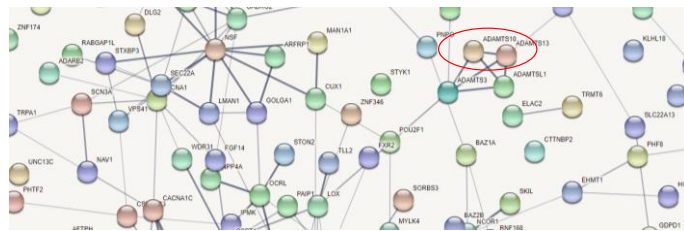


miR 877 – *IGF1R* e *NFATC2* eram alvo

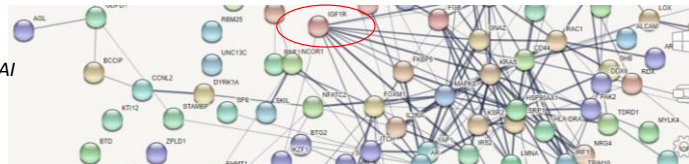
Figura 18 - Interação proteína- proteína : genes de nosso estudo e genes alvo do miR877

miR 877

*ADAMTS10: ADAMTSL1, ADAMTS3, ADAMTS13*



*IGF1R: IK2F1,HGF, GNAZ, CD44, HSP90AAI, ITHC, KRA, MAPK8, IRS2, AR*



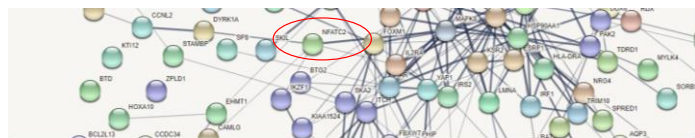
*TRPS1*



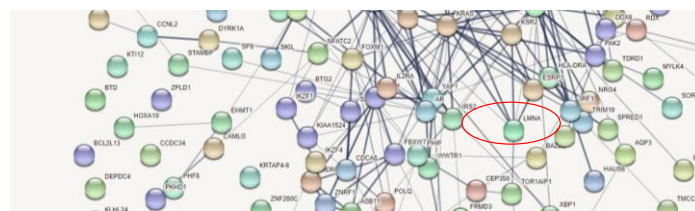
Figura 19 - Interação proteína- proteína : genes de nosso estudo e genes alvo do miR877

miR 877

*NFATC2: DYRK1A, CAMLG, IKZF1, MAPK8, ILZRA*



*LMNA: ESRP1, HSP90AA1, KSR2, KRAS, MAPK8*



## 5.0 DISCUSSÃO

A importância de se identificar um marcador preditivo quanto ao crescimento é notória, seja na prática pediátrica ou naquela dentro de especialidades médicas específicas, como ocorre na endocrinologia pediátrica. Ainda, essa importância ocorre tanto na composição de um diagnóstico médico, quanto pode ser um excelente parâmetro relacionado à evolução de uma terapêutica instituída. A necessidade de uma observação clínica, que dispense meses, torna, em certas situações, a tomada de decisão frente a um diagnóstico ou tratamento postergada.

Neste estudo, buscamos selecionar marcadores moleculares relacionados ao desfecho crescimento estatural, que pudessem ter caráter preditivo quanto a o desfecho descrito.

A população estudada, bem como os subgrupos dela (população normal, população com TSH alterado), tinha como característica uma variabilidade quanto à faixa etária e, por sua vez, variabilidade quanto à estatura e velocidade de crescimento. Este era um de nossos objetivos: a possibilidade de poder avaliar possíveis marcadores genéticos em diferentes fases de crescimento na infância. Para poder comparar, no entanto, essas diferentes fases de crescimento de forma conjunta, utilizamos a estratégia de utilizar os parâmetros relacionados a crescimento sob a forma de Zscore. Acreditamos que essa conduta foi útil, pois pudemos efetivamente realizá-la e, ao mesmo tempo, contemplar a avaliação para todos os indivíduos em conjunto. A diversidade de estaturas ocorreu, mesmo dentro da população normal. Também esse fator era relevante: avaliar o comportamento de crianças que estão acima ou abaixo da média, crianças que tem aceleração fisiológica do crescimento, bem como crianças que tem atraso constitucional do crescimento, mas estão dentro da normalidade.

Ao analisar as medidas laboratoriais da população estudada, pudemos documentar que esta não apresentava outras patologias, a não ser o grupo com TSH alterado, que apresentava alteração da função tireoideana, bem



como concentrações aumentadas de anticorpos antitireoglobulina e antitireoperoxidase.

Em dois dos três grupos de crianças avaliadas, identificou-se correlação negativa entre as medidas do TSH e do T4L. Esta correlação em pacientes pediátricos é descrita na literatura, porém não bem estabelecida, podendo sofrer influência quanto à presença de anticorpos, idade e sexo (61). Não identificamos essa correlação no grupo de crianças normais.

Encontramos ainda uma correlação negativa entre IGF1 e as medidas de colesterol total em 2 dos três grupos. Na literatura, os dados são conflitantes com relação à esta associação, no entanto (62,63). Não identificamos essa correlação nas crianças com TSH alterado.

Identificamos no grupo de crianças com TSH alterada correlação positiva entre TSH e idade, bem como entre TSH e estatura. Ainda, correlação negativa entre T4L e idade e estatura. Estes dados podem ser justificados pois a disfunção tireoideana adquirida mais prevalente levando ao hipotireodismo é a tireoidite de Hashimoto, que predomina em faixas etárias maiores (61).

Houve correlação forte e positiva entre a medida do HDL-C e ApoA1. Este achado está dentro do esperado, visto que a proteína ApoA1 é o principal componente proteico do HDL- C (64).

Não identificamos correlação positiva entre a medida do TSH e as medidas do colesterol total e LDL, dado identificado na literatura (65-67).

Fomos capazes de quantificar, em crianças e adolescentes, a expressão relativa dos 5 genes selecionados.

A seleção de genes associados a desfechos relacionados ao crescimento parece ter sido efetiva. Isso pode ser demonstrado tanto pelos achados que discutiremos mais adiante, quanto pela identificação de uma forte correlação entre eles, identificada nos grupos de crianças e adolescentes estudados. Ainda, quando realizamos interação proteína-proteína, utilizando o software STRING, identificamos que os genes circulantes selecionados por nós tinham interação com outros genes associados à condrogênese. Dos 5 genes

selecionados por nós, 4 apresentaram interação com outros genes associados à condrogênese. Além disto eles apresentaram correlações fortes entre os transcritos circulantes quantificados neste estudo. Desta forma, julgamos que os genes selecionados devem apresentar comunicação entre si. Apesar disso, não encontramos, na literatura, uma associação entre os mesmos.

Este estudo ainda trouxe como achado a correlação entre os transcritos e o HDL-C em crianças e adolescentes normais, bem como na população total avaliada, não associada ao excesso de peso ou estadiamento puberal. A correlação entre os transcritos e o HDL pode não estar relacionada à função do HDL no metabolismo lipídico ou no processo da aterosclerose (68,69). O HDL-C é uma lipoproteína que transporta diferentes peptídeos e está associado ao transporte de microRNAs, que podem contribuir para modular a expressão de diversos genes (44). Considerando essa hipótese, investigamos os microRNAs mais abundantemente encontrados em HDL-C em indivíduos saudáveis (miR135a\*, miR188-5p e miR877) e identificamos seus alvos. Na análise proteína-proteína (STRING) demonstrou que todos os genes selecionados em nosso estudo interagem com transcritos circulantes, alvos dos microRNAs avaliados. Também, 2 de nossos 5 genes selecionados eram alvo do miR877. É possível que microRNA ou outros elementos também transportados pelo HDL possam interferir com o RNAm circulante e por isso tenha ocorrido a correlação encontrada com o HDL-C. Vale a pena salientar que houve perda da correlação dos transcritos com o HDL-C no grupo de crianças e adolescentes com TSH elevado. Talvez isso possa ter ocorrido por uma interferência dessa condição sobre os genes circulantes.

Outros estudos identificaram correlação entre o HDL-C e outros membros da família *ADAMTS* (*ADAMTS13* e *ADAMTS1*), in vitro e in vivo (70-72). Identificamos na literatura também a associação entre *LMNA* e HDL-C. Neste caso, no entanto, parece ter relação com a ação deste gene no processo de dislipidemia e aterogênese (73). Portanto, com excessão do gene *LMNA*, a associação de nossos transcritos parece ser inédita na literatura e é possível que o mecanismo de ocorrência esteja relacionado ao transporte de HDL-C.

Em nossas análises não conseguimos identificar um marcador laboratorial ou molecular que, isoladamente, pudesse servir como marcador preditivo quanto ao crescimento na infância. . No entanto, ao estabelecer novas variáveis, utilizando tanto parâmetros laboratoriais quanto moleculares, conseguimos sim identificar marcadores associados ao desfecho crescimento. Os marcadores de diagnóstico e suas curvas Roc correspondentes podem ser influenciados por covariáveis. Desta forma, podemos ajusta-los entre si, através de regressão logística. Utilizando essa estratégia, avaliamos o comportamento de algumas variáveis ajustadas às outras e sua associação com desfecho crescimento.

A medida da expressão relativa de 2 dos 5 genes selecionados por nós (*ADAMTS10*, *IGF1-R*), quando associada (ajuste) à medida do IGF-1 e idade, conseguiram diferenciar, quanto ao desfecho crescimento, crianças e adolescentes normais. Essas medidas apresentaram acurácia quanto a determinar um crescimento adequado ou inadequado na população normal estudada. Este dado, ainda preliminar, nos parece muito promissor quanto à possibilidade de se obter um painel de genes que possam ser úteis quanto à predição do crescimento na infância. Dos 5 genes selecionados por nós, estes dois já eram descritos na literatura como associados à condrogênese, como já descrito anteriormente. No entanto, é inédito o achado destes genes circulantes como marcadores preditivos do crescimento na infância.

Vale a pena ainda destacar que havíamos utilizado um critério rígido quanto à categorização do crescimento. Talvez numa população na qual haja uma maior variabilidade quanto ao ritmo de crescimento ( em grupos de crianças com patologias que afetem o crescimento, por exemplo), talvez seja ideal a adoção do Z-score < -2 como inadequado e Z-score > - 2 como adequado.

As fragilidades deste estudo são relacionadas ao tamanho da população pois, se tivéssemos um número maior de participantes no estudo, poderíamos ter uma análise mais acurada dos subgrupos nele presentes. Foram neste estudo incluídas crianças de diferentes faixas etárias e em diferentes fases

quanto à puberdade. Não tivemos, no entanto, oportunidade de analisá-las separadamente

## 6.0. CONCLUSÃO

Conseguimos quantificar, em crianças e adolescentes, a expressão relativa dos 5 genes selecionados no estudo. Este dado não é descrito na literatura.

Os 5 genes selecionados neste estudo apresentaram forte correlação entre si. Este achado também não é descrito na literatura.

Dos 5 genes, 4 apresentaram interação com outros genes relacionados à condrogênese.

Os 5 genes selecionados apresentaram correlação com HDL-C. Este achado não é descrito na literatura em 4 deles. O mecanismo desta ocorrência pode ter relação com o transporte de HDL-C.

Dos 5 genes selecionados, 2 deles (*ADAMTS10* e *IGF1R*), quando ajustados por idade e IGF-1, conseguiram ser preditores quanto à velocidade de crescimento em crianças normais.

**ANEXO 1****TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CLÍNICA**

Nome do Participante:.....  
 Endereço:.....  
 Telefone para contato:.....Cidade:.....CEP:.....  
 Email:.....

Estas informações estão sendo fornecidas de maneira clara e simples para a participação voluntária de seus filhos neste estudo. As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pelos pesquisadores Andréa Harumy de Lima Hirata, Prof. Valdelina Alessandra da Silva; Prof. Robson José de Almeida, Profa. Ji Hoon Yang; Prof. Albertina Gomes Rodrigues, Prof Márcia Maria Costa Giaccon Giusti, Prof. Humberto Dellê ou Prof. Cléber Pinto Camacho, objetivando firmar acordo escrito mediante no qual, os pais do participante da pesquisa autorizam sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que ele se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação, podendo retirá-lo da pesquisa quando desejar.

**1. Título do Trabalho Experimental: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA COMO BIOMARCADOR DAS REPERCUSSÕES TECIDUAIS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM NÍVEIS ELEVADOS DE HORMÔNIO TIREOESTIMULANTE**

**2. Objetivos:** Observar o aumento ou a redução no funcionamento das células do organismo através de modificações no número de partes (RNAs) gerados pelo seu código genético quando as crianças ou adolescentes estão com um menor funcionamento da tireoide, e com isso descobrir quais são os pacientes ou situações clínicas onde a reposição de levotiroxina poderá ser vantajosa na população pediátrica.

**3. Justificativa:** Muitas crianças e adolescentes apresentam pequenas alterações nos exames que avaliam a saúde da glândula tireoide, sendo que permanece a dúvida sobre a necessidade de tratar ou não estes indivíduos. Por isso, faremos uma análise do aumento ou redução do número de RNAs nas crianças e adolescentes, para, assim, tentar definir quais são os pacientes que realmente necessitam de tratamento. Não haverá benefícios diretos para os participantes, mas todas as crianças e adolescentes serão avaliados e seguidos durante a realização do estudo. No futuro os resultados deste estudo poderão auxiliar na decisão sobre a melhor conduta para o tratamento das crianças e adolescentes com alteração dos hormônios da tireoide.

- 4. Procedimentos da Fase Experimental:** Os participantes de ambos os sexos serão selecionados através de entrevistas com aplicação de questionários, com duração aproximada 10 minutos. Os participantes selecionados serão submetidos à avaliação clínica, além da coleta de exames de sangue rotineiros para a sua avaliação clínica e para a avaliação dos RNAs. A quantidade de sangue coletada será adequada ao peso da criança. De uma forma geral serão coletados 3 a 5mL em tubo seco e 3mL de sangue no tubo para a análise dos genes.
- 5. Desconforto ou Riscos Esperados:** Os participantes serão submetidos aos riscos mínimos relacionados à coleta de sangue (dor local e pequenos hematomas).
- 6. Medidas Protetivas aos Riscos:** Os questionários serão aplicados em ambiente adequado para manter o sigilo e evitar possíveis constrangimentos. A coleta será realizada com as medidas rotineiras do serviço para evitar possíveis complicações. A coleta de sangue já seria realizada para os exames de rotina, sendo que o material que será utilizado para a análise dos hormônios e do RNA desta pesquisa será colocado nos tubos específicos após a coleta (ou seja, não havendo interação do indivíduo com os tubos de coleta).
- 7. Informações:** O participante tem garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Também os pesquisadores citados acima assumem o compromisso de informação durante todo o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando do estudo.
- 8. Benefícios da Pesquisa:** Não haverá benefícios diretos para os participantes, mas todos as crianças ou adolescentes serão avaliados e seguidos durante a realização do estudo. No futuro, os resultados deste estudo poderão auxiliar na decisão sobre a melhor conduta para o tratamento das crianças ou adolescentes com alteração dos hormônios da tireoide.
- 9. Métodos alternativos Existentes:** Não existem métodos alternativos à coleta de exames laboratoriais.
- 10. Retirada do Consentimento:** O participante tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo quando quiser.
- 11. Aspecto Legal:** Este projeto foi elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos atendendo à Resolução nº 510, de 07 de abril de 2016, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde – Brasília – DF.
- 12. Garantia do Sigilo:** Os pesquisadores asseguram a privacidade dos participantes.
- 13. Formas de Ressarcimento das Despesas Decorrentes da Participação na Pesquisa:** O participante não terá nenhum gasto com exames relacionados ao estudo. Não haverá ressarcimento de despesas com eventuais deslocamentos e/ou qualquer gasto realizado por parte do participante.

14. **Acompanhamento e assistência:** Os pacientes que, por apresentarem hipotireoidismo, necessitarem de tratamento, poderão ser assistidos no Mandaqui, como habitualmente ocorre, ou no ambulatório integrado de saúde da UNINOVE.

15. **Local da Pesquisa:** A pesquisa será desenvolvida no ambulatório de endocrinologia pediátrica do Conjunto Hospitalar do Mandaqui, localizado à rua Voluntários da Pátria 4301, CEP: 02401400, bem como no ambulatório integrado de saúde, localizado na rua Vergueiro nº 235/249 – Liberdade, SP, CEP: 01504-001.

16. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS nº 466/12 e Res. CNS 510/2016). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos.

**Endereço do Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – 12º andar - Liberdade – São Paulo – SP CEP. 01504-001 Fone: 3385-9010 / E-mail: comitedeetica@uninove.br**

**Horários de atendimento do Comitê de Ética: segunda-feira a sexta-feira – Das 11h30 às 13h00 e Das 15h30 às 19h00**

17. **Nome completo e telefones dos Pesquisadores para contato:** Telefone fixo da secretaria da Pós-Graduação da Medicina: (11) 33859241, do Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho: (11) 98203-3277 e da Profa. Albertina Gomes Rodrigues (11) 999076689.

18. Eventuais intercorrências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

**19. Consentimento Pós-Informação:**

Eu, \_\_\_\_\_, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmando que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos somente neste estudo no meio científico.

---

Assinatura dos Pais ou Responsáveis Legais



## ANEXO 2

### TERMO DE ASSENTIMENTO

*Termo de assentimento não elimina a necessidade de fazer o termo de consentimento livre esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal.*

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: **Análise da expressão genica como biomarcador das repercussões teciduais em crianças e adolescentes com níveis elevados de hormônio tireoestimulante.** Seus pais permitiram que você participe.

Nós queremos saber quando é necessário realizar o tratamento das crianças ou adolescentes que estão com um menor funcionamento da tireoide (hipotireoidismo). A tireoide é uma parte do nosso corpo que produz uma substância (hormônio) que ajudam as células a funcionar.

As crianças e adolescentes que irão participar desta pesquisa têm de 0 a 18 anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita no Complexo Hospitalar do Mandaqui e no Ambulatório Integrado de Saúde, localizado na Rua Vergueiro, 235/249 – Liberdade, São Paulo – SP / CEP: 01504-001, onde as crianças serão convidadas a doarem um pouquinho do seu sangue para participar deste projeto.

Para isso será feito uma picadinha com uma pequena agulha. O uso deste material é considerado seguro, mas é possível sentir uma pequena dor no local e pode ficar roxo. Caso aconteça algo errado pela sua participação nesta pesquisa, você pode nos procurar pelos telefones: Tel.: (11) 3385-9241 ou 11-98203-3277.



Mas coisas boas vão acontecer, como ajudar os médicos e pesquisadores a cuidar melhor de você e das outras crianças.

Ninguém saberá que você está participando desta pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que vocês nos der. Os resultados das pesquisas vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa.

Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar aos pesquisadores: Doutora Albertina, Doutor Cleber, Doutor Humberto, Doutora Ji, Valdelina, Robson ou Andréa.

Eu \_\_\_\_\_,  
aceito participar da pesquisa: **Análise da expressão genica como biomarcador das repercussões teciduais em crianças e adolescentes com níveis elevados de hormônio tireoestimulante**, que tem o objetivo de identificar quando é necessário o tratamento do hipotireoidismo em crianças e adolescentes. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir. Os médicos e pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

ACEITO

NÃO ACEITO

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Assinatura do Menor

---

Dra Albertina Gomes Rodrigues

**ANEXO 3****Valores de Referência para o IGF-1:**

<b>Faixa etária (anos)</b>	<b>Valor de referência (ng/mL)</b>
<b>1</b>	<b>55-327</b>
<b>2</b>	<b>51-303</b>
<b>3</b>	<b>49-289</b>
<b>4</b>	<b>49-283</b>
<b>5</b>	<b>50-286</b>
<b>6</b>	<b>52-297</b>
<b>7</b>	<b>57-316</b>
<b>8</b>	<b>64-345</b>
<b>9</b>	<b>74-338</b>
<b>10</b>	<b>88-453</b>
<b>11</b>	<b>111-551</b>
<b>12</b>	<b>143-693</b>
<b>13</b>	<b>183-850</b>
<b>14</b>	<b>220-972</b>
<b>15</b>	<b>237-996</b>
<b>16</b>	<b>226-903</b>
<b>17</b>	<b>193-731</b>
<b>18</b>	<b>163-584</b>

## **ANEXO 4**

### **Extração do RNA**

Este protocolo descreve os passos necessários para usar o Spin Kit para purificar o RNA de um mL de amostra de sangue total coletado em um tubo Tempus. Este protocolo também pode ser usado com o kit de amostras Tempus. O diagrama a seguir fornece uma visão geral do procedimento descrito neste protocolo.

### **Diretrizes para extração de RNA**

O kit de isolamento de RNA de centrifugação Tempus™ é utilizado para isolar e purificar o RNA do sangue total recolhidos com Tubos de ARN Sangue Tempus™. O RNA isolado neste procedimento contém níveis muito baixos de DNA genômico (<0,05% em peso).

- Elimine os resíduos contendo sangue após desinfecção reconhecida procedimentos e de acordo com todas as leis locais, estaduais e regulamentos de sangue / infecção.
- Ajuste a concentração final do reagente estabilizante para uma concentração final de 1X diluindo o sangue estabilizado com cálcio livre de magnésio solução salina tamponada com fosfato (PBS) antes de extrair RNA para purificação. Falhas nisso resulta em rendimentos significativamente mais baixos de RNA.
- Mantenha as amostras no gelo o máximo possível para evitar possível diminuição do RNA rendimentos.

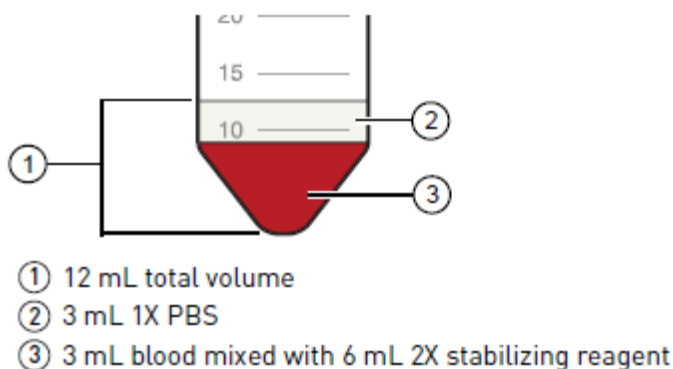
### **Isolar RNA**

1-Se a amostra estiver congelada, descongele a amostra no Tubo de ARN do Sangue Tempus™ em temperatura ambiente (18–25 ° C).

2. Retire a tampa do Tubo de ARN do Sangue Tempus™ e depois despeje o conteúdo um tubo cônico de 50 mL limpo.

3. Adicione 3 mL de 1X PBS (Ca<sup>2+</sup> + / Mg<sup>2+</sup> + - free) no tubo cônico para trazer o total volume para 12 mL.

Nota: Se a amostra de sangue inicial for inferior a 3 mL, some a diferença adicionando 1X PBS suficiente para trazer o volume total para 12 mL.



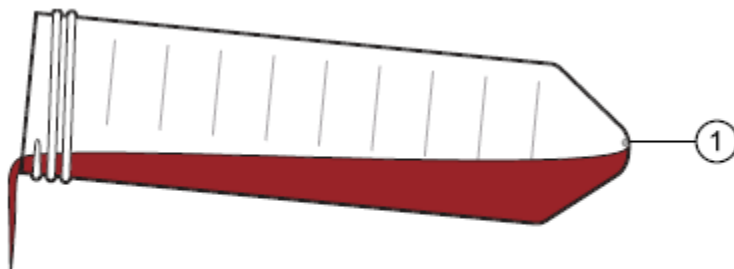
4. Volte a colocar a tampa no tubo cônico, depois agite vigorosamente o tubo (a velocidade máxima do vórtice) por 30 segundos para garantir a mistura correta do conteúdo.

Nota: Certifique-se de que o tubo cônico esteja bem tampado para evitar o conteúdo de vazamento ou pulverização durante o vórtice.

Nota: Vortex por menos de 30 segundos pode causar entupimento da purificação coluna. Uma camada de espuma sobre a amostra após o vórtice é normal.

5. Centrifugar o tubo a 4 ° C a 3.000 × g (rcf) por 30 minutos.

6. Despeje cuidadosamente o sobrenadante. Manuseie o tubo cônico com cuidado para que você não desalojar o pellet de RNA do fundo do tubo.



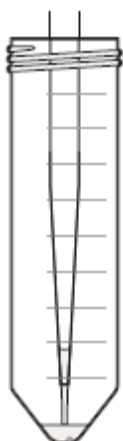
① RNA pellet (transparent and invisible)

7. Deixe o tubo cônico invertido em papel absorvente por 1 a 2 minutos.

8. Limpe as gotas restantes de líquido da borda do tubo cônico com água limpa e papel absorvente.

9. Adicionar 400  $\mu$ l de solução de ressuspensão de purificação de RNA no tubo cônico, em seguida, vortex brevemente para ressuspender o sedimento de RNA.

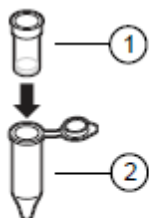
Nota: Para evitar a lavagem de qualquer resíduo de sangue no interior do tubo, insira a ponta da pipeta no tubo e adicione a solução de ressuspensão ao fundo do o tubo.



10. Vá para "Purify RNA". O RNA ressuspenso pode ser mantido no gelo enquanto preparando-se para os próximos passos.

## Purificar o RNA

1. Etiquete o filtro de purificação de RNA, depois insira o filtro em uma coleta de lixo tubo.



- ① RNA purification filter
- ② Waste collection tube

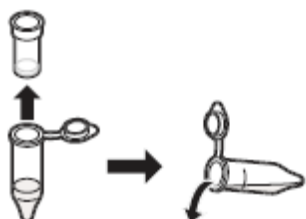
2. Pré-molhar a membrana de filtração adicionando 100  $\mu$ L de lavagem de purificação de RNA Solução 1 no filtro de purificação.



3. Adicione  $\sim$  400  $\mu$ l do RNA ressuspensão no filtro de purificação, depois centrifugue por 30 segundos a 16.000  $\times$  g.

4. Remova o filtro de purificação, descarte o lixo líquido coletado nos resíduos do tubo, volte a inserir o filtro de purificação no tubo de resíduos.

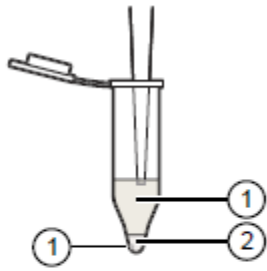
Nota: Cada vez que você descarta o resíduo líquido, em vez de reutilizar o tubo de descarte, você pode transferir o filtro de purificação para um novo tubo de coleta (não fornecido o kit).



5. Adicione 500  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem de purificação de RNA 1 no filtro de purificação, centrifugar por 30 segundos a 16.000  $\times$  g.
6. Retire o filtro de purificação, descarte o lixo líquido coletado nos resíduos tubo, volte a inserir o filtro de purificação no tubo de resíduos.
7. Adicione 500  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem de purificação de RNA 2 no filtro de purificação, centrifugar por 30 segundos a 16.000  $\times$  g.
8. Retire o filtro de purificação, descarte o lixo líquido coletado nos resíduos tubo, volte a inserir o filtro de purificação no tubo de resíduos.
9. Adicione 500  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem de purificação de RNA 2 no filtro de purificação, centrifugar por 30 segundos a 16.000  $\times$  g.
10. Retire o filtro de purificação, descarte o lixo líquido coletado nos resíduos tubo, volte a inserir o filtro de purificação no tubo de resíduos.
11. Centrifugue por 30 segundos a 16.000  $\times$  g para secar a membrana.
12. Transfira o filtro de purificação para um novo tubo de coleta rotulado para coletar eluído.
13. Adicione 100  $\mu\text{L}$  de solução de purificação de ácido nucleico no filtro de purificação, feche a tampa, incube todo o tubo por 2 minutos a 70 ° C, depois centrifugue para 30 segundos a 16.000  $\times$  g.
14. Adicione  $\sim$  100  $\mu\text{l}$  do RNA recolhido eluído de novo para o filtro de purificação, centrifugar por 2 minutos a 16.000-18.000  $\times$  g. Nenhuma incubação é necessária.
15. Elimine o filtro de purificação, depois transfira aproximadamente 90  $\mu\text{L}$  do RNA eluir para um novo tubo de coleta rotulado.

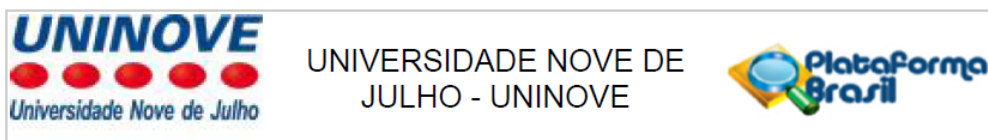
Nota: Ao transferir o eluato de RNA, remova cuidadosamente o líquido do tubo de coleta a partir do topo do líquido para garantir que o pellet não é perturbado.





- ① ~90  $\mu$ L of eluate (transfer to new tube)
- ② ~10  $\mu$ L (do not disturb)
- ③ Pellet

16. Volte a colocar a tampa no novo tubo de recolha e guarde o RNA a  $-20^{\circ}$  C, ou  $-80^{\circ}$  C para armazenamento a longo prazo.



Continuação do Parecer: 3.381.550

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Emenda aprovada. Não foram observados impedimentos éticos

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O pesquisador deverá se apresentar na instituição de realização da pesquisa (que autorizou a realização do estudo) para início da coleta dos dados.

O participante da pesquisa (ou seu representante) e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada

Ao pesquisador cabe manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 466/12 item X1. 2. f). De acordo com a Res. CNS 466/12, X.3.b), o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_136784_2_E3.pdf	29/05/2019 15:46:04		Aceito
Outros	Emenda_Maio_240519.pdf	29/05/2019 15:39:18	Cleber P. Camacho	Aceito
Outros	Parecer_Tecnico_APAE_240519.pdf	29/05/2019	Cleber P. Camacho	Aceito

**Endereço:** VERGUEIRO nº 235/249

**Bairro:** LIBERDADE

**CEP:** 01.504-001

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3385-9010

**E-mail:** comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE  
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 3.381.550

Outros	Parecer_Tecnico_APAE_240519.pdf	15:38:12	Cleber P. Camacho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Analise_da_expressao_genica_Versao_3_240519.pdf	29/05/2019 15:35:54	Cleber P. Camacho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_1_RN_240419.pdf	24/04/2019 22:42:20	Cleber P. Camacho	Aceito
Outros	EMENDA_Correcao_240419.pdf	24/04/2019 22:21:46	Cleber P. Camacho	Aceito
Outros	Emenda_APAE_2019.pdf	11/03/2019 14:43:09	Cleber P. Camacho	Aceito
Outros	Declaracao_CoParticipante_070319.pdf	11/03/2019 12:41:35	Cleber P. Camacho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2_Criancas_070319.pdf	11/03/2019 12:15:44	Cleber P. Camacho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TA_Projeto_Docente_Hipotiroidismo_Infancia_210617.docx	21/06/2017 17:36:26	Cleber P. Camacho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Projeto_Docente_Hipotiroidismo_Infancia_070417.pdf	10/04/2017 15:44:22	Cleber P. Camacho	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 10 de Junho de 2019

Assinado por:

**Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** VERGUEIRO nº 235/249

**Bairro:** LIBERDADE

**CEP:** 01.504-001

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3385-9010

**E-mail:** comitedeetica@uninove.br

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Rogol AD, Hayden GF 2014 Etiologies and early diagnosis of short stature and growth failure in children and adolescents. *J Pediatr* **164**:S1-14 e16.
2. Bassett JH, Williams GR 2016 Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. *Endocr Rev* **37**:135-187.
3. 1995 Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* **854**:1-452.
4. Hamill PV, Drizd TA, Johnson CL, Reed RB, Roche AF, Moore WM 1979 Physical growth: National Center for Health Statistics percentiles. *Am J Clin Nutr* **32**:607-629.
5. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, Mei Z, Curtin LR, Roche AF, Johnson CL 2000 CDC growth charts: United States. *Adv Data*:1-27.
6. Group WHOMGRS 2006 WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl* **450**:76-85.
7. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M 1966 Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child* **41**:454-471.
8. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M 1966 Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. II. *Arch Dis Child* **41**:613-635.
9. Nilsson O, Parker EA, Hegde A, Chau M, Barnes KM, Baron J 2007 Gradients in bone morphogenetic protein-related gene expression across the growth plate. *J Endocrinol* **193**:75-84.
10. Lazarus JE, Hegde A, Andrade AC, Nilsson O, Baron J 2007 Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone* **40**:577-586.
11. Hirai T, Chagin AS, Kobayashi T, Mackem S, Kronenberg HM 2011 Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signaling is required for maintenance of the growth plate in postnatal life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:191-196.
12. Agoston H, Khan S, James CG, Gillespie JR, Serra R, Stanton LA, Beier F 2007 C-type natriuretic peptide regulates endochondral bone growth through p38 MAP kinase-dependent and -independent pathways. *BMC Dev Biol* **7**:18.
13. Karimian E, Chagin AS, Savendahl L 2011 Genetic regulation of the growth plate. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**:113.
14. Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Del Toro F, Schwartz Z 2002 Differential regulation of growth plate chondrocytes by 1 $\alpha$ ,25-(OH) $_2$ D $_3$  and 24R,25-(OH) $_2$ D $_3$  involves cell-maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**:143-154.
15. Skubutyte R, Markova D, Freeman TA, Anderson DG, Dion AS, Williams CJ, Shapiro IM, Risbud MV 2010 Hypoxia-inducible factor regulation of ANK expression in nucleus pulposus cells: possible implications in controlling dystrophic mineralization in the intervertebral disc. *Arthritis Rheum* **62**:2707-2715.
16. Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, de Vega S, Fukumoto S, Yamada Y 2010 Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation. *J Biol Chem* **285**:18948-18958.
17. Ahrens MJ, Li Y, Jiang H, Dudley AT 2009 Convergent extension movements in growth plate chondrocytes require gpi-anchored cell surface proteins. *Development* **136**:3463-3474.
18. De Luca F 2018 Regulatory Role for Growth Hormone in Statural Growth: IGF-Dependent and IGF-Independent Effects on Growth Plate Chondrogenesis and Longitudinal Bone Growth. *Pediatr Endocrinol Rev* **16**:33-38.

19. Lui JC, Baron J 2011 Effects of glucocorticoids on the growth plate. *Endocr Dev* **20**:187-193.
20. Basset JH, Williams GR 2016 Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance. *Endocr Rev* **37**:135-187.
21. Phillip M, Maor G, Assa S, Silbergeld A, Segev Y 2001 Testosterone stimulates growth of tibial epiphyseal growth plate and insulin-like growth factor-1 receptor abundance in hypophysectomized and castrated rats. *Endocrine* **16**:1-6.
22. Oz OK, Millsaps R, Welch R, Birch J, Zerwekh JE 2001 Expression of aromatase in the human growth plate. *J Mol Endocrinol* **27**:249-253.
23. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J 2005 Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* **64**:157-165.
24. Gat-Yablonski G, Ben-Ari T, Shtaf B, Potievsky O, Moran O, Eshet R, Maor G, Segev Y, Phillip M 2004 Leptin reverses the inhibitory effect of caloric restriction on longitudinal growth. *Endocrinology* **145**:343-350.
25. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, et al. 2010 Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* **467**(7317):832-8.
26. 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.
27. Yue S, Whalen P, Jee YH 2019 Genetic regulation of linear growth. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* **24**:2-14.
28. Cirillo F, Catellani C, Lazzeroni P, Sartori C, Street ME 2020 The role of microRNAs in influencing body growth and development. *Horm Res Paediatr* **93** (1):7-15.
29. Lim EC, Brett M, Lai AH, Lee SP, Tan ES, Jamuar SS, Ng IS, Tan EC 2015 Next-generation sequencing using a pre-designed gene panel for the molecular diagnosis of congenital disorders in pediatric patients. *Hum Genomics* **9**:33.
30. Kim JH, Wang X, Ho CH, Bogie KM 2012 Physiological measurements of tissue health; implications for clinical practice. *Int Wound J* **9**:656-664.
31. Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F 2012 Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:328-335.
32. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK 2012 Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* **82**:1024-1032.
33. Camacho CP, Lindsey SC, Melo MC, Yang JH, Germano-Neto F, Valente Fde O, Lima TR, Biscolla RP, Vieira JG, Cerutti JM, Dias-da-Silva MR, Maciel RM 2013 Measurement of calcitonin and calcitonin gene-related peptide mRNA refines the management of patients with medullary thyroid cancer and may replace calcitonin-stimulation tests. *Thyroid* **23**:308-316.
34. Boldarine VT, Maciel RM, Guimarães GS, Nakabashi CC, Camacho CP, Andreoni DM, Mamone MaC, Ikejiri ES, Kasamatsu TS, Crispim F, Hojaij FC, Hidal JT, Biscolla RP 2010 Development of a sensitive and specific quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood thyroglobulin messenger ribonucleic acid in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **95**:1726-1733.
35. Tam S, de Borja R, Tsao MS, McPherson JD 2014 Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies. *Lab Invest* **94**:350-358.
36. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK 2010 edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**:139-140.

37. Collett-Solberg PF, Ambler G, Backeljauw PF, Bidlingmaier M, Biller BMK, Boguszewski MCS, Cheung PT, Choong CSY, Cohen LE, Cohen P, Dauber A, Deal CL, Gong C, Hasegawa Y, Hoffman AR, Hofman PL, Horikawa R, Jorge AAL, Juul A, Kamenický P, Khadilkar V, Kopchick JJ, Kriström B, Lopes MLA, Luo X, Miller BS, Misra M, Netchine I, Radovick S, Ranke MB, Rogol AD, Rosenfeld RG, Saenger P, Wit JM, Woelfle J. 2019 Diagnosis, Genetics, and Therapy of Short Stature in Children: A Growth Hormone Research Society International Perspective. *Horm Res Paediatr* **92**(1):1-14.
38. Bauer AJ, Wassner AJ 2019 Thyroid hormone therapy in congenital hypothyroidism and pediatric hypothyroidism. *Endocrine* **66**:51-62.
39. Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, Cooper DS, Kim BW, Peeters RP, Rosenthal MS, Sawka AM, American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone R Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid* . 2014; **24**:1670-1751.
40. WHO. Anthro for personal computers, version 3.2.2, 2011: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva: WHO, 2010. Available from: <http://www.who.int/childgrowth/software/en>
41. GREULICH, W. W.; PYLE, S. I. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2. ed., Stanford : Stanford University Press, 1959. 256 p.
42. Hirata AHL, Rocha LAJ, da Silva VA, de Almeida RJ, Bacigalupo LDS, Varela P, Martins L, Pesquero JB, Delle H, Camacho CP2020 Circulating RNA Transcriptome of Pregnant Women with TSH Just Above the Trimester-Specific Reference and its Correlation with the Hypertensive Phenotype. *Sci Rep* **10**:6439.
43. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al 2019 STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**(D1):D607-D613
44. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT 2011 MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* **13**:423-433.
45. Chen Y, Wang X 2020 miRDB: na online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* **48** (DI): D127-D131.
46. Youden WJ1950 Index for rating diagnostic tests. *Cancer* **3**:32-35.
47. Apte SS 2009 A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* **284**:31493-31497
48. Sengle G, Charbonneau NL, Ono RN, Sasaki T, Alvarez J, Keene DR, Bachinger HP, Sakai LY 2008 Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem* **283**:13874-13888.
49. Kutz WE, Wang LW, Bader HL, Majors AK, Iwata K, Traboulsi EI, Sakai LY, Keene DR, Apte SS 2011 ADAMTS10 protein interacts with fibrillin-1 and promotes its deposition in extracellular matrix of cultured fibroblasts. *J Biol Chem* **286**:17156-17167.
50. Mularczyk EJ, Singh M, Godwin ARF, Galli F, Humphreys N, Adamson AD, Mironov A, Cain SA, Sengle G, Boot-Handford RP, Cossu G, Kielty CM, Baldock C 2018 ADAMTS10-mediated tissue disruption in Weill-Marchesani syndrome. *Hum Mol Genet* **27**:3675-3687.
51. Ishimori N, Stylianou IM, Korstanje R, Marion MA, Li R, Donahue LR, Rosen CJ, Beamer WG, Paigen B, Churchill GA 2008 Quantitative trait loci for BMD in an SM/J by NZB/BINJ intercross population and identification of Trps1 as a probable candidate gene. *J Bone Miner Res* **23**:1529-1537.

52. Forys-Dworniczak E, Zajdel-Cwynar O, Kalina-Faska B, Malecka-Tendera E, Matusik P 2019 Trichorhinophalangeal syndrome as a diagnostic and therapeutic challenge for paediatric endocrinologists. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* **25**:41-47.
53. Zanolini S, Smerdel-Ramoya A, Canalis E 2013 Nuclear factor of activated T-cells (NFAT)C2 inhibits Notch receptor signaling in osteoblasts. *J Biol Chem* **288**:624-632.
54. Zanolini S, Canalis E 2015 Activation of Nfatc2 in osteoblasts causes osteopenia. *J Cell Physiol* **230**:1689-1695.
55. Chen W, Zhang X, Siu RK, Chen F, Shen J, Zara JN, Culiati CT, Tetradis S, Ting K, Soo C 2011 Nfatc2 is a primary response gene of Nell-1 regulating chondrogenesis in ATDC5 cells. *J Bone Miner Res* **26**:1230-1241.
56. Cenni V, D'Apice MR, Garagnani P, Columbaro M, Novelli G, Franceschi C, Lattanzi G 2018 Mandibuloacral dysplasia: A premature ageing disease with aspects of physiological ageing. *Ageing Res Rev* **42**:1-13.
57. Renou L, Stora S, Yaou RB, Volk M, Sinkovec M, Demay L, Richard P, Peterlin B, Bonne G 2008 Heart-hand syndrome of Slovenian type: a new kind of laminopathy. *J Med Genet* **45**:666-671.
58. Ullrich NJ, Gordon LB 2015 Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Handb Clin Neurol* **132**:249-264.
59. Hoffmann TJ, Theusch E, Haldar T, Ranatunga DK, Jorgenson E, Medina MW, et al 2018 A large electronic-health-record-based genome-wide study of serum lipids. *Nat Genet.* **50**(3):401-13.
60. Boes E, Coassin S, Kollerits B, Heid IM, Kronenberg F 2009 Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review. *Exp Gerontol* **44**(3):136-60.
61. Önsesveren I, Barjaktarovic M, Chaker L, de Rijke YB, Jaddoe VWV, van Santen HM, Visser TJ, Peeters RP, Korevaar TIM 2017 Childhood Thyroid Function Reference Ranges and Determinants: A Literature Overview and a Prospective Cohort Study. *Thyroid* **27**(11):1360-1369.
62. Zhao Q, Jiang Y, Zhang M, Chu Y, Ji B, Pan H, et al 2019 Low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with insulin-like growth factor-1 in short-stature children and adolescents: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis* **18**(1):120.
63. Eggert ML, Wallaschofski H, Grotevendt A, Nauck M, Volzke H, Samietz S, et al 2014 Cross-sectional and longitudinal relation of IGF1 and IGF-binding protein 3 with lipid metabolism. *Eur J Endocrinol* **171**(1):9-19.
64. Dathan-Stumpf A, Vogel M, Hiemisch A, Thiery J, Burkhardt R, Kratzsch J, Kiess W. 2016 Pediatric reference data of serum lipids and prevalence of dyslipidemia: Results from a population-based cohort in Germany. *Clin Biochem.* **49**(10-11):740-9.
65. Dahl AR, Iqbal AM, Lteif AN, Pittock ST, Tebben PJ, Kumar S 2018 Mild subclinical hypothyroidism is associated with paediatric dyslipidaemia. *Clin Endocrinol (Oxf).* **89**(3):330-5.
66. Brenta G, Fretes O 2014 Dyslipidemias and hypothyroidism. *Pediatr Endocrinol Rev.* **11**(4):390-9.
67. Witte T, Ittermann T, Thamm M, Riblet NB, Volzke H. 2015 Association between serum thyroid-stimulating hormone levels and serum lipids in children and adolescents: a population-based study of German youth. *J Clin Endocrinol Metab.* **100**(5):2090-7
68. Ben-Aicha S, Badimon L, Vilahur G 2020 Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters. *Int J Mol Sci* **21**.

69. Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Roxe T, Zeiher AM, Landmesser U, Dimmeler S 2013 Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**:1392-1400.
70. Norata GD, Björk H, Hamsten A, Catapano AL, Eriksson P 2004 High-density lipoprotein subfraction 3 decreases ADAMTS-1 expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells. *Matrix Biol* **22**:557-60.
71. Gebhard C, Maafi F, Stähli BE, Bonnefoy A, Gebhard CE, Nachar W, et al. . 2018 Beneficial Effects of High-Density Lipoproteins on Acquired von Willebrand Syndrome in Aortic Valve Stenosis. *Thromb Haemost.* **118**:288-297.
72. Crawley JT, Lane DA, Woodward M, Rumley A, Lowe GD **2008** Evidence that high von Willebrand factor and low ADAMTS-13 levels independently increase the risk of a non-fatal heart attack. *J Thromb Haemost* **6**:583-588.
73. Murase Y, Yagi K, Katsuda Y, Asano A, Koizumi J, Mabuchi H. 2002 An LMNA variant is associated with dyslipidemia and insulin resistance in the Japanese. *Metabolism*.**51**(8):1017-21