

NATHALIA LIBERATOSCIOLI MENEZES DE ANDRADE

**Análise genética prospectiva de uma coorte de pacientes
classificados como tendo baixa estatura idiopática**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

Coorientador: Dra. Gabriela de Andrade Vasques

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

NATHALIA LIBERATOSCIOLI MENEZES DE ANDRADE

Análise genética prospectiva de uma coorte de pacientes classificados como tendo baixa estatura idiopática

São Paulo
2023

NATHALIA LIBERATOSCIOLI MENEZES DE ANDRADE

Análise genética prospectiva de uma coorte de pacientes classificados como tendo baixa estatura idiopática

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

Coorientador: Dra. Gabriela de Andrade Vasques

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Nathalia Liberatoscioli Menezes de
Análise genética prospectiva de uma coorte de
pacientes classificados como tendo baixa estatura
idiopática / Nathalia Liberatoscioli Menezes de
Andrade. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Coorientadora: Gabriela de Andrade Vasques.

Descritores: 1.Estatura/genética
2.Crescimento/genética 3.Insuficiência de
crescimento 4.Transtornos do crescimento 5.Genética
humana 6.Sequenciamento de nucleotídeos em larga
escala 7.Sequenciamento completo do exoma

USP/FM/DBD-522/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Lenise e Helcio** (*in memoriam*), por terem sido meu maior alicerce, exemplos força, superação, amor, dedicação e que nunca mediram esforços para estimular meu desenvolvimento, aprendizado e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Se cheguei até aqui, foi através de vocês. Dedico mais esta conquista por tudo que vocês representam para sempre para mim.

As minhas irmãs **Verenna e Giovanna** pelo apoio, carinho e por estarmos sempre juntas seja me consolando nas minhas derrotas ou vibrando minhas vitórias e conquistas.

Ao meu amor **Pedro**, meu companheiro de vida pela parceria, paciência, compreensão e incentivo.

A minha **Tia Edma** pelas palavras de carinho, amor e fé.

A **Dra Heloisa Villar** (*in memoriam*), minha maior incentivadora e responsável por estar finalizando esta etapa tão importante na minha vida. Que a senhora esteja orgulhosa de mim. Eternamente grata por ter cruzado e guiado o meu caminho.

A todos os **mestres** que me inspiram diariamente na minha busca por conhecimento e que deixaram um pouco de si durante a minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Alexander Jorge, meu orientador, por todos os ensinamentos, paciência, dedicação, incentivo e pela confiança ao longo desse projeto. Com a sua companhia e orientação pude me desenvolver como pessoa e profissional, e isso transcende qualquer relação entre aluna e professor. Seu exemplo como líder merece todo o nosso reconhecimento e gratidão.

A Dra Gabriela Vasques, minha coorientadora, sempre presente e ativa, que me auxiliou com carinho, sempre disposta a ajudar, identificando minhas limitações e enaltecendo minhas qualidades.

Agradeço às minhas colegas dessa jornada, que se tornaram amigas: Thais Kataoka, Edoarda, Thais Lima, Renata Scalco, Renata Noronha (*in memoriam*), Naiara, Raissa e Laurana. A convivência de vocês tornou este caminho mais leve e divertido.

Agradeço a todos os funcionários do Hospital das Clínicas, SELA, LIM25 e LIM42, em especial a Mariana Funari com toda ajuda na execução do sequenciamento do painel e outros suportes de bancada.

Agradeço a todos os colaboradores e amigos que encaminharam pacientes para este estudo, em especial Alexsandra Malaquias, Paulo Solberg e Nathalia Lisboa por terem contribuído para engrandecer este projeto.

Agradeço a todos da Endocrinologia do HCFMUSP, em especial ao Dr Ivo, Dra Ana Claudia e Dra Berenice que sempre me acolheram e incentivaram durante o meu desenvolvimento na pós graduação.

Agradeço aos pacientes e inúmeros familiares que sem a compreensão e o engajamento de vocês, este trabalho não seria possível.

“Tudo que é feito, merece ser bem-feito”

Papai

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABraOM	banco de dados: Arquivo Brasileiro Online de Mutações
AC	número de alelos encontrados, <i>the allele counting</i>
ACAN	gene aggrecan
ALS	subunidade ácido- lábil
AS	altura sentada
AT	altura total
ACMG	Colégio americano de genética médica e genômica, <i>The American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AMP	Associação de patologia molecular, <i>The Association for Molecular Pathology</i>
BEI	baixa estatura idiopática
BMP	proteínas morfogenéticas ósseas
BNP	peptídeo natriurético tipo B
BWA	programa de bioinformática: Burrows-Wheeler Aligner
CAAE	certificado de apresentação de apreciação ética
CADD	ferramenta de predição <i>in 8uíte8</i> : <i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CDC	Centro de controle de prevenção e controle de doença, <i>Center for disease control and prevention</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise em Pesquisa
Clinvar	banco de dados que possui informações de significado clínico de variantes descritas
Cm	centímetros
CMA	análise cromossômica por microarray, <i>the comparative genomic hybridization array (aCGH)</i>
CNP	peptídeo natriurético tipo C
CNVs	variações no número de cópias, <i>Copy Number Variation</i>
COL2A1	colágeno Tipo II Alfa 1
CONTRA	programa de bioinformática: <i>Copy Number Targeted Resequencing Analysis</i>
dbscSNV	ferramenta de predição <i>in silico</i> para variantes em regiões consenso para <i>splicing</i>
dbSNP ID	banco de dados de variantes de um único nucleotídeo com número de identificação

DGH	deficiência do hormônio de crescimento
DNPM	desenvolvimento neuropsicomotor
DP	desvio-padrão
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
ExAC	banco de dados: Exome Aggregation Consortium
F	Feminino
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FATHMM	ferramenta de predição <i>in silico</i> : <i>Functional Analysis Through Hidden Markov Models</i>
<i>FGFR3</i>	gene do receptor 3 do fator de crescimento de fibroblasto
<i>FGFs</i>	fatores de crescimento dos fibroblastos
FMUSP	Faculdade de medicina da USP
G	Gramas
GERP	ferramenta de predição <i>in silico</i> : <i>Genomic Evolutionary Rate Profiling</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HGMD	banco de dados: Human genome mutation database
GH	hormônio do crescimento
GHBP	proteína ligadora de hormônio do crescimento
<i>GH1</i>	gene hormônio do crescimento tipo 1
<i>GHSR</i>	gene receptor de secretagogo do hormônio do crescimento
<i>GHRH</i>	hormônio liberador do hormônio do crescimento
gnomAD	banco de dados: <i>Genome Aggregation Database</i>
IC	idade cronológica
IMC	índice de massa corporal
IO	idade óssea
IGF	fator de crescimento insulino-símile
<i>IGF-1</i>	gene do fator 1 de crescimento insulino-símile
<i>IGF1R</i>	gene receptor do fator 1 de crescimento insulino-símile
<i>IGFALS</i>	gene da proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina da subunidade ácido lábil
<i>IGF-2</i>	gene do fator 2 de crescimento insulino-símile
<i>IGFBP-3</i>	proteína ligadora 3 do fator de crescimento insulino-símile
<i>IGV</i>	programa de bioinformática: <i>Integrative Genomics Viewer</i>
<i>IHH</i>	gene <i>indian hedgehog</i>

<i>Indels</i>	pequenas deleções e inserções
Kb	Kilobases
Kg	Quilogramas
L	Litro
LIM	Laboratório de investigação médica
LoF	perda de função, <i>loss of function</i>
M	Masculino
MAF	frequência do alelo menos frequente, <i>the minor allele frequency</i>
MAPK	via de sinalização proteína quinase mitógeno ativada, <i>the mitogen-activated protein kinase</i>
mL	Miligramas
Mm	milímetros
MLPA	amplificação dependente da ligação de múltiplas sondas, <i>the multiplex ligation-dependent probe amplificação</i>
NGS	sequenciamento de próxima geração, <i>Next-generation sequencing</i>
Nm	Nanômetro
Nº	Número
<i>NF1</i>	gene neurofibromatose tipo 1
<i>NPPC</i>	gene precursor do peptídeo natriurético tipo C
<i>NPR2</i>	gene receptor do peptídeo natriurético B
<i>NPR3</i>	gene receptor do peptídeo natriurético C
OMIM	banco de dados: <i>Mendelian Inheritance in Man</i>
<i>P</i>	valor-p ou probabilidade de significância
<i>PAPP-A2</i>	gene <i>Pregnancy-associated plasma protein-A2</i>
PAR1	região pseudoautosômica 1
Pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIG	pequeno para idade gestacional
Polyphen2	ferramenta de predição <i>in silico</i> : Polymorphism Phenotyping v2
PROVEAN	ferramenta de predição <i>in silico</i> : PROtein Variation Effect Analyzer
<i>PTHrP</i>	peptídeo relacionado ao paratormônio
<i>PTPN11</i>	gene <i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
<i>rhGH</i>	hormônio do crescimento recombinante
RAS	proteína RAS
REVEL	ferramenta de predição <i>in silico</i> : <i>Rare Exome Variant Ensemble Learner</i>
RUNX2	gene runt related transcription factor 2

RX	raio X
SELA	Laboratório de sequenciamento em larga escala – FMUSP
<i>SHOX</i>	gene short stature homeobox containing gene
SIFT	ferramenta de predição <i>in silico</i> : <i>SIFT Human Coding SNPs</i>
SNVs	variantes de um único nucleotídeo
<i>SOX5/6/9</i>	gene SRY-box 5/6/9
SPLE	sequenciamento paralelo em larga escala
SS	somatostatina
<i>STAT5B</i>	gene transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 5B
TSH	hormônio tireoestimulante
T4L	tiroxina livre
TGO	transaminase glutâmico oxalacética
TGP	transaminase glutâmico pirúvica
VCF	arquivo <i>variant call format</i>
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VUS	<i>variant of Unknown Significance</i> / Variante de significado incerto
1000g	banco de dados: <i>1000 Genomes Project</i>
X	Vezes
Z	escore-Z
µg	Micrograma
%	Porcentagem
°C	graus Celsius
-	menos
+	mais
<	Menor
>	Maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática do eixo GH-IGF, indicando os principais distúrbios desse sistema: 1) deficiência de hormônio do crescimento (DGH); 2) GH bioinativo; 3) insensibilidade ao GH por defeitos no GHR; 4) insensibilidade ao GH por defeitos do STAT5B; 5) deficiência de IGF-1; 6) deficiência de subunidade lábil ao ácido (ALS); 7) defeitos na clivagem proteolítica de IGFbps por deficiência de PAPP2; 8) IGF-1 bioinativo; e 9) insensibilidade ao IGF causada por defeitos no IGF1R. 25
- Figura 2** – Representação esquemática da cartilagem de crescimento, com suas diferentes zonas. 2A) Defeitos genéticos que afetam os fatores parácrinos e a matriz extracelular. 2B) Representação das principais proteínas envolvidas no processo de proliferação e diferenciação desses condrócitos, e defeitos genéticos que afetam vias intercelulares, que envolvem fatores de transcrição e vias de sinalização. 26
- Figura 3** – Representação esquemática da sinalização de Receptor Tirosina Quinases através da via RAS/MAPK e as proteínas essenciais/defeitos moleculares capazes de causar RASopatias. 28
- Figura 4** – Página inicial da plataforma digital criada para cadastro de pacientes com baixa estatura desenvolvido pelo Grupo de Distúrbios do Crescimento – Unidade de Endocrinologia Genética – HCFMUSP. Disponível em www.ggenes.com.br 33
- Figura 5** - Fluxo da estratégia de filtragem utilizada para selecionar as variantes com possibilidade de patogenicidade nos pacientes selecionados. 38
- Figura 6** – Resumo da estratégia de seleção da casuística 41
- Figura 7** - Procedência dos pacientes com BEI submetidos ao painel 43
- Figura 8** - Heredograma família paciente 1 83
- Figura 9** - Deleção em região regulatória do gene *SHOX* visualizada pelo CONTRA 83
- Figura 10** - Confirmação por MLPA da deleção de 3 sondas da região regulatória do gene *SHOX* 84
- Figura 11** - Radiografia de idade óssea do paciente 2 demonstrando encurtamento da falange média do 5º dedo associado a epífises cônicas 85
- Figura 12** - Heredograma com a segregação da variante no gene *IHH* na família do paciente 2 85

Figura 13 - Heredograma com a segregação da variante no gene <i>NPR2</i> na família do paciente 3	87
Figura 14 - Heredograma com a segregação da variante nos genes <i>CBL</i> , <i>SHOX</i> e <i>NPR2</i> na família do paciente 4	89
Figura 15 - Deleção em região regulatória do gene <i>SHOX</i> visualizada pelo CONTRA	89
Figura 16 - Confirmação por MLPA da deleção de 1 sonda da região regulatória do gene <i>SHOX</i>	90
Figura 17 - Heredograma com a segregação da variante no gene <i>GHSR</i> na família do paciente 5	91
Figura 18 - Heredograma com a segregação da variante no gene <i>PTPN11</i> na família do paciente 6	93
Figura 19 - Heredograma com a segregação da variante no gene <i>COL2A1</i> e <i>NF1</i> na família do paciente 7. *variante em mosaicismo	94
Figura 20 - Radiografia de coluna da paciente 7 com ausência de vértebras ovóides, alterações no acetábulo ou alargamento ou irregularidade epifisária	95
Figura 21 - Visualização no IGV de mosaicismo no gene <i>NF1</i> : desbalanço alélico na variante em heterozigose no gene <i>NF1</i>	95
Figura 22 - Heredograma com a segregação da variante no gene <i>ACAN</i> na família da paciente 8	96
Figura 23 - Duplicação do gene <i>ACAN</i> visualizada pelo CONTRA	97
Figura 24 - Rearranjo complexo (deleção-duplicação-deleção) englobando o gene <i>ACAN</i> confirmado por CMA.	98
Figura 25 - Heredograma com a segregação deleção do gene <i>SHOX</i> na família da paciente 9	99
Figura 26 - Deleção do gene <i>SHOX</i> visualizada pelo CONTRA	100
Figura 27 - Deleção englobando o gene <i>SHOX</i> e região regulatória confirmada por MLPA	100
Figura 28 - Radiografia de mãos e punhos para idade óssea com discreta triangulação da epífise distal do rádio, que pode configurar uma deformidade de madelung inicial	101
Figura 29 - Heredograma com a segregação deleção do gene <i>FGFR3</i> na família da paciente 10	102

Figura 30 - Radiografia de coluna do paciente 10 com ausência de irregularidades metafisárias, estreitamento da distância interpedicular das vértebras lombares inferiores e uma pélvis anormal com asas ilíacas pequenas e quadradas e chanfradura sacro-ilíaca	103
Figura 31 - Heredograma com a análise por exoma da família do paciente 16	104
Figura 32 - Heredograma com a análise por exoma da família do paciente 17	105
Figura 33 - Heredograma com a análise por exoma da família do paciente 18	107
Figura 34 – Visualização de duplicação pelo IGV, confirmando visualmente a variante no gene <i>IHH</i> no paciente 18 e no seu irmão	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais genes relacionados ao fenótipo de baixa estatura isolada	29
Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes com BEI submetidos ao painel	43
Tabela 3 - Variantes patogênicas e provavelmente patogênicas identificadas pelo painel de genes e análise de CNV nos pacientes com baixa estatura idiopática	45
Tabela 4 - Variações de número de cópias (CNVs) encontradas na análise do CONTRA e que foram confirmadas por outras metodologias	46
Tabela 5 - Variantes de significado incerto identificadas pelo painel de genes nos pacientes com baixa estatura idiopática	47
Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes submetidos ao estudo genético em que foram encontradas alterações genéticas P/PP pelo painel de genes	48
Tabela 7 - Variantes provavelmente patogênicas identificadas pelo exoma nos pacientes com baixa estatura idiopática	49
Tabela 8 - Características clínicas dos pacientes com variantes provavelmente patogênicas identificadas pela análise do exoma	50
Tabela 9 - Comparação das características clínicas dos pacientes com BEI com e sem diagnóstico genético	51
Tabela 10 - Estudos utilizando sequenciamento paralelo em larga escala em pacientes com baixa estatura de causa não definida	54
Tabela 11 - Características clínicas do paciente 1	82
Tabela 12 - Características clínicas do paciente 2	85
Tabela 13 - Características clínicas do paciente 3	87
Tabela 14 - Características clínicas do paciente 4	88
Tabela 15 - Características clínicas do paciente 5	91
Tabela 16 - Características clínicas do paciente 6	92
Tabela 17 - Características clínicas do paciente 7	94
Tabela 18 - Características clínicas do paciente 8	97
Tabela 19 - Características clínicas do paciente 9	99
Tabela 20 - Características clínicas do paciente 10	102
Tabela 21 - Características clínicas do paciente 16	104
Tabela 22 - Características clínicas do paciente 17	105
Tabela 23 - Características clínicas do paciente 18	106

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Genes relacionados à “baixa estatura idiopática”: condições monogênicas

Anexo B – Modelo de formulário a ser implantado em plataforma digital para recrutamento da casuística

Anexo C – Lista dos genes presentes no painel de baixa estatura versão 2

Anexo D – Endereço dos programas e ferramentas utilizados na análise de bioinformática

Anexo E – Critérios de classificação de patogenicidade dos programas *in silico* utilizados nas filtragens da VCF

Anexo F – Critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas quanto à patogenicidade

Anexo G – Normas para combinação dos critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas identificadas

Anexo H – Detalhamento dos pacientes portadores de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas associadas com baixa estatura idiopática

RESUMO

Andrade NLM. Análise genética prospectiva de uma coorte de pacientes classificados como tendo baixa estatura idiopática [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A baixa estatura é uma condição que acomete aproximadamente 2,3% da população. Embora a baixa estatura possa ser manifestação clínica de uma doença subjacente, em torno de 70% das crianças baixas encontram-se saudáveis, com avaliação clínica e laboratorial sem achados relevantes que justifiquem o distúrbio de crescimento. Essas crianças são classificadas como tendo baixa estatura idiopática (BEI). **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo determinar a frequência de causas monogênicas da baixa estatura em crianças inicialmente classificadas como tendo BEI. **Métodos:** Foram selecionadas de forma prospectiva 43 crianças com baixa estatura (escore Z de altura ≤ -2) sem causa definida após investigação clínica, laboratorial e radiográfica, como definido pelo consenso de baixa estatura idiopática para abordagem genética como parte da investigação inicial. Todos os 43 pacientes incluídos no estudo foram submetidos a um painel customizado que contém aproximadamente 100 genes relacionados a distúrbio de crescimento e análise por Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA) para o gene *SHOX* e suas regiões regulatórias. Alguns pacientes mais informativos (com baixa estatura familiar, desproporção corpórea ou algum achado esquelético inespecífico) que continuaram sem diagnóstico genético após abordagem por painel de genes, foram submetidos a análise de sequenciamento exômico. **Resultados:** Através do painel de genes, foi possível estabelecer a causa genética da baixa estatura em 10 dos 43 pacientes investigados, o que nos forneceu uma taxa diagnóstica de 23,2%. Desses, três pacientes tiveram mais de uma alteração genética patogênica ou provavelmente patogênica que justifica a causa da sua baixa estatura. Oito pacientes que continuaram sem diagnóstico genético foram submetidos a análise de exoma e foi possível diagnosticar 3 deles (37,5%). Levando em consideração a casuística total (n=43), com a abordagem genética por sequenciamento paralelo em larga escala (painel ou exoma) foi possível estabelecer um diagnóstico genético em 13 de 43 pacientes (30,2%), sendo que a abordagem por exoma conferiu um acréscimo de 7% na taxa diagnóstica. Os achados genéticos são em maioria relacionados à genes que participam diretamente da regulação da cartilagem de crescimento: *SHOX* (três deleções em heterozigose), *ACAN* (uma variante de ponto e um rearranjo complexo), *IHH* (duas variantes), *NPR2*, *FGFR3*, *COL2A1*, *LTPB3* e *ERF* (cada um com uma variante). Uma variante foi identificada no gene *GHSR* que é associado ao eixo GH-IGF1 e três variantes estão em genes relacionados à via RAS-MAPK (*CBL*, *NF1* e no *PTPN11*). Não há diferenças clínicas entre os pacientes com ou sem diagnóstico genético que pudessem orientar uma abordagem através de gene candidato. **Conclusão:** Uma abordagem de sequenciamento paralelo em larga escala pode determinar a etiologia genética de baixa estatura em 13/43 crianças (30,2%) com BEI, retirando o termo idiopático de sua classificação clínica.

Palavras-chave: Estatura/genética. Crescimento/genética. Insuficiência de crescimento. Transtornos do crescimento. Genética humana. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. Sequenciamento completo do exoma.

ABSTRACT

Andrade NLM. Prospective genetic analysis of a cohort of patients classified as having idiopathic short stature [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Introduction: Short stature is a condition that affects approximately 2.3% of the population. Although short stature may be a clinical manifestation of an underlying disease, in about 70% of children with short stature are healthy, with clinical and laboratory evaluation without relevant findings that justify the growth disorder. These children are classified as having idiopathic short stature (ISS). Objectives: This study aimed to determine the frequency of monogenic causes of short stature in children initially classified as having ISS. **Methods:** We prospectively selected 43 children with short stature (height SDS \leq -2) with no defined cause after clinical, laboratory and radiographic investigation, as defined by the idiopathic short stature consensus, for genetic approach as part of the initial investigation. All 43 patients included in the study underwent a customized panel containing approximately 100 genes related to growth disorder-related and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis for the *SHOX* gene and its regulatory regions. Some more informative patients (with familial short stature, body disproportion or nonspecific skeletal finding) who continued without a genetic diagnosis after the gene panel approach underwent to exome sequencing analysis. **Results:** Through gene panel analysis, it was possible to establish the genetic cause of short stature in 10 of the 43 patients investigated, which provided us a diagnostic yield of 23.2%. Of these, three patients had more than one pathogenic or likely pathogenic genetic alteration that justifies their short stature. Eight patients who still without a genetic diagnosis underwent to exome sequencing analysis and it was possible to diagnose 3 of them (37.5%). Considering the total cohort (n=43), with the genetic approach by next-generation sequencing (NGS) (panel or exome) it was possible to establish a genetic diagnosis in 13 of 43 patients (30.2%), and the approach by exome conferred a 7% increase in the diagnostic yield. The genetic findings are mostly related to growth plate: *SHOX* (3 heterozygous deletion), *ACAN*. (One point variant and 1 complex rearrangement, *IHH* (2 variants), *NPR2*, *FGFR3*, *COL2A1*, *LTPB3* e *ERF* (one variant each gene). One variant was identified in the *GHSR* gene that is associated with the GH-IGF1 axis and three variants are in genes related to the RAS-MAPK pathway (*CBL*, *NF1* and *PTPN11*). There are no clinical differences between patients with or without genetic diagnosis that could guide a candidate gene approach. **Conclusion:** Next-generation sequencing approach can determine the genetic etiology of short stature in 13/ 43 children (30.2%) initially classified as ISS, removing the term idiopathic from their clinical classification.

Keywords: Body height/genetics. Growth/genetics. Failure to thrive. Growth disorders. Human genetics. High-throughput nucleotide sequencing. Whole exome sequencing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 EVOLUÇÃO DA INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA BAIXA ESTATURA IDIOPÁTICA	22
1.2 VIAS DE REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO	23
1.2.1 Genes relacionados ao eixo GH-IGF1	25
1.2.2 Genes que regulam a cartilagem de crescimento	26
1.2.3 Genes relacionados a via RAS-MAPK	27
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	31
4 CASUÍSTICA	32
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	32
4.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE PACIENTES	32
4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	33
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	33
4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:	34
4.6 MÉTODOS	34
4.6.1 Extração do DNA genômico	34
4.6.2 Estudo genético	35
4.6.2.1 <i>Painel de genes</i>	35
4.6.2.2 <i>Sequenciamento do exoma</i>	36
4.6.2 Bioinformática	37
4.6.2 Identificação de CNVs dos resultados derivados do SPLE	37
4.6.5 Confirmação das deleções relacionadas ao gene <i>SHOX</i>	39
4.6.6 Confirmação de CNVs por Análise Cromossômica por Microarray	39
4.6.7 Sequenciamento Automático Tradicional	40
4.7 ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS	42
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO	42
5.2 RESULTADOS DO ESTUDO GENÉTICO	44
5.2.1 Variantes alélicas encontradas no painel de genes	44

5.2.2 Características clínicas dos pacientes com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas associadas com baixa estatura idiopática avaliados pelo painel de genes	47
5.2.3 Análise dos pacientes através de exoma	49
5.2.4 Achados genéticos encontrados pela análise de exoma	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	58
8 ANEXOS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que o crescimento longitudinal é um processo complexo, influenciado por múltiplos fatores genéticos e ambientais, que atuam com diferentes impactos ao longo da vida. Adicionalmente, o ganho estatural é relacionado ao estado de saúde da criança, desde a vida intratuterina até a fusão das cartilagens epifisárias. Dessa forma, os distúrbios de crescimento devem ser avaliados de maneira adequada e prontamente reconhecidos.

A baixa estatura é definida como altura correspondente a 2 desvios-padrão (DP) abaixo da média para idade e sexo (escore-Z da altura < -2), correspondendo a aproximadamente 2,3% da população¹. Embora a baixa estatura possa ser manifestação clínica de uma doença subjacente, aproximadamente 70% das crianças baixas encontra-se saudável, com avaliação clínica e laboratorial sem achados relevantes que justifiquem o distúrbio de crescimento, sendo rotuladas como baixa estatura idiopática (BEI)^{2,3}. O termo idiopático, apesar de amplamente utilizado como sinônimo de baixa estatura de causa desconhecida, exclui crianças com evidência de doenças sistêmicas, endócrinas, nutricionais, com anormalidades cromossômicas e aquelas nascidas pequenas para idade gestacional (PIG). No entanto, engloba a baixa estatura familiar, o que reforça ainda mais uma base genética para esta condição.

Sabe-se que a altura é uma das características humanas com maior grau de herdabilidade ($>80\%$)⁴, o que indica que a variabilidade genética é o principal determinante da estatura. Atualmente são conhecidos 12.111 polimorfismos em 7.209 *loci* associados à determinação da altura de adultos saudáveis, sendo que cada uma destas variantes comuns (frequência $\geq 5\%$) influencia 1-2 mm na altura do indivíduo⁵. Muitas destas variantes são localizadas em genes associados a distúrbios de crescimento sindrômicos e/ou genes envolvidos no desenvolvimento da cartilagem de crescimento⁶. Adicionalmente, estudos têm apontado que variantes raras (frequência $\leq 1\%$) podem exercer um efeito sobre a variabilidade de altura 10 a 20x maior (cerca de 20 mm por alelo), indicando que elas poderiam ter um maior impacto sobre o fenótipo dos indivíduos saudáveis⁷.

Embora seja aceito que a BEI possa ter uma herança poligênica, ou seja, ela seria a resultante da soma dos efeitos de várias variantes comuns, cada uma com pequeno efeito^{8,9}, estudos recentes desafiam este dogma e muitas das crianças

classificadas como BEI poderiam ter um componente monogênico, ou seja, uma variante genética rara que tenha um papel primordial na determinação do fenótipo de baixa estatura.

1.1 EVOLUÇÃO DA INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA BAIXA ESTATURA IDIOPÁTICA

O termo idiopático é usualmente utilizado para se referir a uma condição ou doença que surge espontaneamente ou sem qualquer causa conhecida¹⁰. Geralmente é um diagnóstico de exclusão, mas não está claro qual investigação mínima deve ser realizada para definir uma condição como idiopática.

A primeira descrição do uso deste termo foi em 1964, quando Soyka e col., descrevem que pacientes que não poderiam ser definidos como portadores de nanismo primordial ou constitucional, aqueles decorrentes de baixa ingestão calórica ou nascidos pequenos para idade gestacional, poderiam ser classificados como simplesmente falha de crescimento idiopática¹¹. Alguns anos após, houve nova referência por Edelman e col. sobre o termo “retardo de crescimento idiopático”, em que o autor se referia a crianças com atraso no crescimento, sem etiologia determinada¹².

Apesar do termo ser inicialmente utilizado no início da década de 1970^{13,14}, somente em 1996, após uma reunião de consenso, foi definido que crianças com BEI seriam aquelas com (1) tamanho adequado (> -2 DP) para idade gestacional; (2) sem desproporções corpóreas; (3) sem evidência de doença orgânica crônica; (4) sem doença psiquiátrica; (5) nutrição adequada; (6) sem evidência de deficiência endocrinológica¹⁵, conceitos estes que foram reforçados em 2008¹⁶ e posteriormente em 2019¹⁷. No entanto, esses consensos precederam a expansão dos estudos genéticos em distúrbios do crescimento. Atualmente, mais de 1000 artigos no PubMed abordam estudos envolvendo crianças com BEI. Várias dessas pesquisas descreveram variantes raras em genes com efeito deletério em crianças com baixa estatura sem outras características ou apenas com fenótipos leves, não sendo possível configurar uma síndrome.

Nos últimos 20 anos, a investigação de crianças com baixa estatura vem mudando consideravelmente. A abordagem genética ganhou importância e surgiu como potencial ferramenta para estabelecer a etiologia do déficit de crescimento.

Desde os anos 50, quando técnicas de citogenética, como cariótipo emergiram com a finalidade de explicar anormalidades cromossômicas como Síndrome de Down e Turner, muita coisa mudou. A análise cromossômica por microarray (CMA) tornou-se frequentemente usada devido à sua maior sensibilidade na detecção variações no número de cópia (do inglês *copy number variation*; CNVs, deleções e duplicações). CMA é capaz de detectar uma CNV patogênica em aproximadamente 10% dos distúrbios do crescimento, principalmente em crianças com baixa estatura sindrômica de causa desconhecida¹⁸. A identificação de variantes de ponto (variantes de nucleotídeo único e pequenas inserções e deleções) também tiveram um grande desenvolvimento, migrando rapidamente da técnica de Sanger para o sequenciamento de próxima geração (NGS). Esta nova tecnologia permite o sequenciamento de múltiplas regiões e genes simultaneamente e pode incluir análise de CNVs. Com este aprimoramento, vem sendo possível estabelecer uma causa monogênica associada a diversos genes relacionados a vias do crescimento, em um número significativo de crianças antes classificadas como BEI.

1.2 VIAS DE REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO

Já é bem descrito na literatura que o eixo somatotrópico tem papel determinante no crescimento. Os fatores mais importantes são o hormônio de crescimento (GH) e os fatores de crescimento similares à insulina (IGF-1 e IGF-2). Sabe-se que o sistema IGF é o determinante para o crescimento fetal, sendo o IGF-1 um dos principais reguladores do crescimento neste período. Já durante o crescimento pós natal, o eixo GH/IGF-1 passa a ter ação mais importante¹⁹ (Figura 1). Entretanto, esse sistema é apenas um dos muitos que controlam o complexo processo do crescimento. Neste cenário, vem ganhando destaque o papel da cartilagem de crescimento, que seria um dos principais órgãos efetores deste processo²⁰⁻²².

O crescimento longitudinal de um indivíduo depende da ossificação endocondral que ocorre na cartilagem de crescimento. Esse processo acontece de forma coordenada e envolve condrócitos localizados em três regiões principais: zona de repouso, zona proliferativa e zona hipertrófica. Nestas zonas, os condrócitos se multiplicam e se diferenciam, tornando-se hipertróficos. Ao mesmo tempo, ocorre produção da matriz extracelular e a invasão de vasos sanguíneos e células

precursoras dos osteoblastos, que remodelam esta cartilagem recém-formada, resultando no alongamento ósseo^{23,24} (Figura 2).

A regulação de toda a fisiologia da cartilagem de crescimento envolve uma série de fatores hormonais, parácrinos, fatores de transcrição, proteínas intracelulares e moléculas de sinalização e da matriz extracelular^{24,25}. Defeitos nos genes que codificam qualquer um desses fatores ou seus respectivos receptores podem resultar em doenças com alterações esqueléticas e distúrbio de crescimento¹. Baseado nestes achados, podemos dividir os defeitos genéticos (Figura 2):

- Defeitos genéticos que afetam os fatores parácrinos, que envolvem o sistema IHH/PTHrP (indian hedgehog/peptídeo relacionado ao paratormônio), o sistema CNP/NPR2, a sinalização dos FGFs (fatores de crescimento dos fibroblastos), em especial a via do FGFR3, e a sinalização das BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas)²⁶;

- Defeitos genéticos que afetam a matriz extracelular, que envolvem as proteínas da matriz e genes como o *ACAN*, que codifica o principal proteoglicano da cartilagem²⁷ e genes relacionados ao colágeno²⁸.

- Defeitos genéticos que afetam vias intercelulares, que envolvem fatores de transcrição (*SOX9*, *RUNX2* e *SHOX*) e vias de sinalização, como *RAS/MAPK*²⁵;

- Defeitos genéticos que afetam processos celulares fundamentais²⁹;

Com a melhora das técnicas de sequenciamento genético e através da validação em estudos funcionais, já foi possível identificar inúmeras variantes em genes que interagem neste processo^{4,30}. Inicialmente, os defeitos nestes genes foram associados a formas mais graves de baixa estatura em um contexto de displasia esquelética. Entretanto, uma parcela das crianças classificadas com tendo BEI são portadoras de mutações nestes genes.

De forma semelhante, algumas crianças com baixa estatura isolada pode apresentar variantes patogênicas em genes responsáveis por quadros sindrômicos, representando o espectro mais atenuado da variabilidade fenotípica³¹⁻³³. Por exemplo, frequentemente é descrito pacientes com BEI com variantes patogênicas no *PTPN11* associadas a síndrome de Noonan, entretanto, sem ter as características que permitem reconhecer esta condição^{33,34}.

Desta forma, genes específicos em condições monogênicas foram associados ao fenótipo de baixa estatura isolada^{35,36}. Estes genes são relacionados ao eixo GH-

IGF1, genes relacionados ao processo de ossificação endocondral na cartilagem de crescimento e genes da via RAS/MAPK.

1.2.1 Genes relacionados ao eixo GH-IGF1

O comprometimento do crescimento pode ser causado por defeitos em genes que afetam vários componentes dessa cascata, desde a síntese de GH até a ação do IGF-1. Entretanto, os indivíduos afetados podem não apresentar características clássicas da deficiência ou resistência do GH/IGF-1 nesses casos, eles seriam frequentemente classificados como tendo baixa estatura isolada. Os genes já relacionados são *GHR*³⁷, *GH1*³⁸, *IGF1R*³⁹, *IGFALS*⁴⁰, *GHSR*⁴¹, *IGF-1*⁴², *PAPP-A2*⁴³ e *STAT5B*⁴⁴ (Tabela 1, Figura 1, Anexo A).

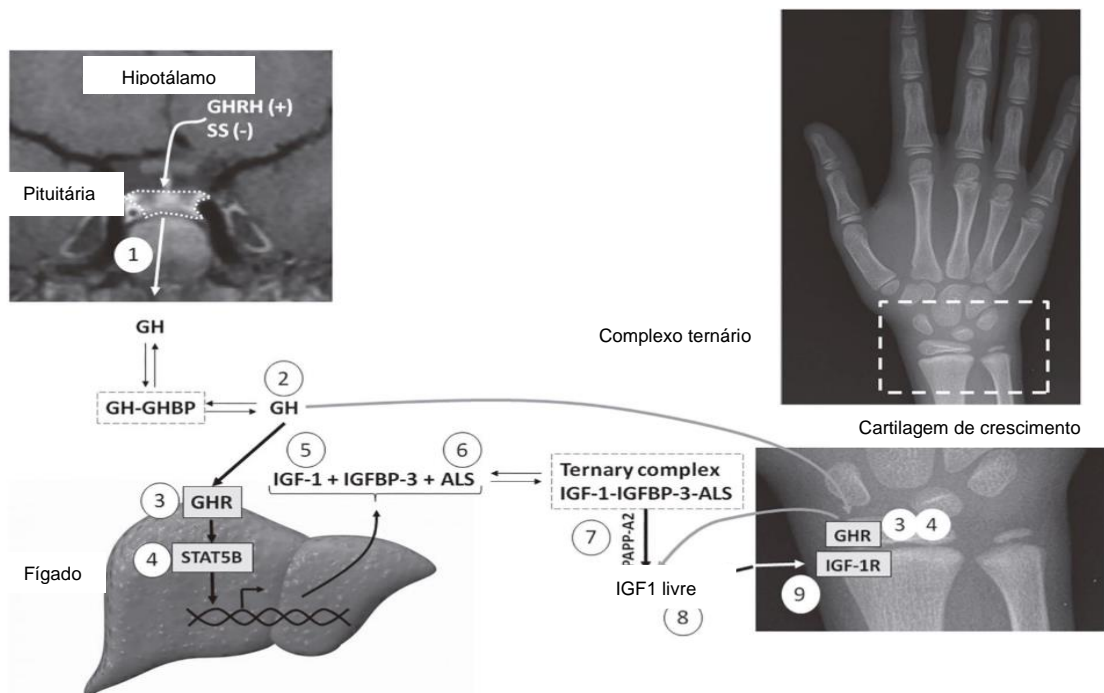
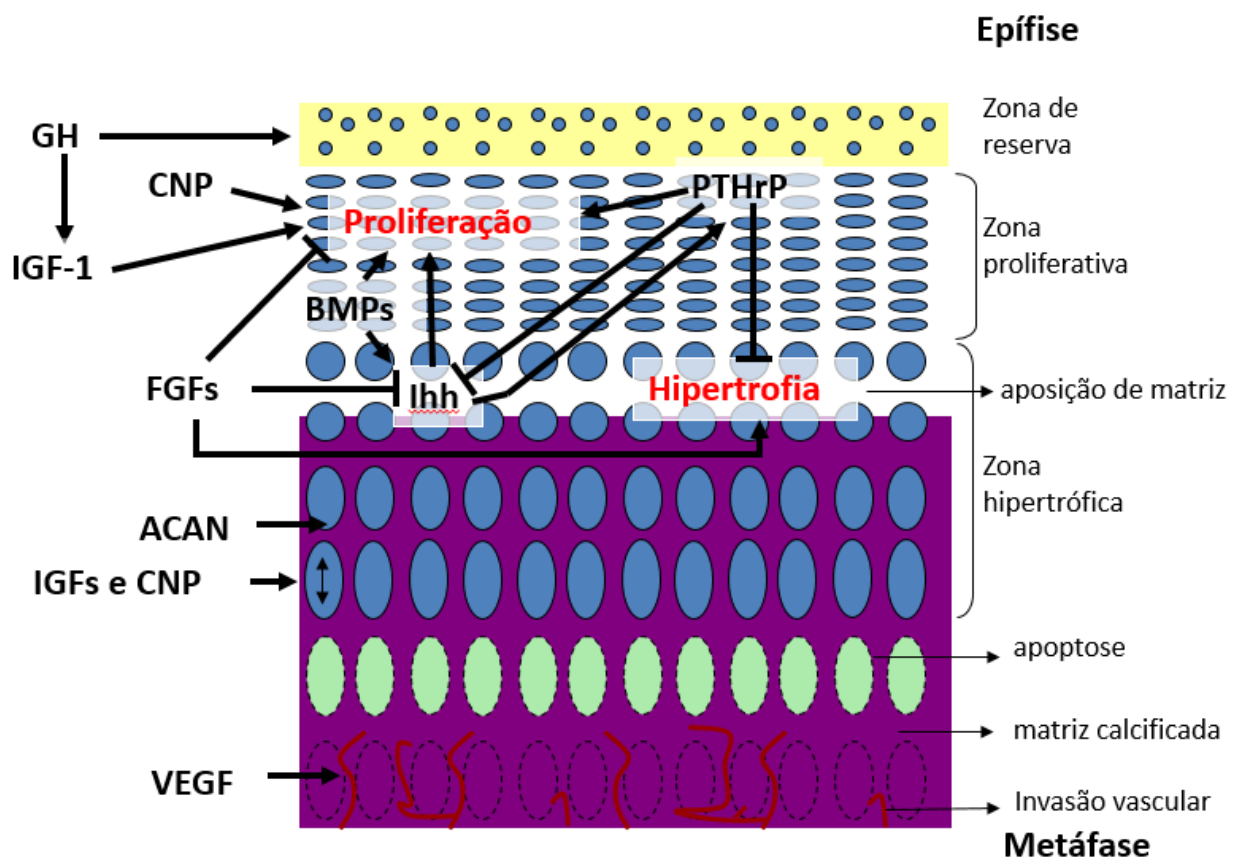


Figura 1 - Representação esquemática do eixo GH-IGF, indicando os principais distúrbios desse sistema: 1) deficiência de hormônio do crescimento (DGH); 2) GH bioinativo; 3) insensibilidade ao GH por defeitos no GHR; 4) insensibilidade ao GH por defeitos do STAT5B; 5) deficiência de IGF-1; 6) deficiência de subunidade lábil ao ácido (ALS); 7) defeitos na clivagem proteolítica de IGFBPs por deficiência de PAPP2; 8) IGF-1 bioinativo; e 9) insensibilidade ao IGF causada por defeitos no IGF1R. Adaptado de Vasques e colaboradores, 2019⁴⁵.

1.2.2 Genes que regulam a cartilagem de crescimento

Como já descrito, o processo de ossificação endocondral é um processo complexo e que envolve diversos fatores parácrinos e autócrinos. A cartilagem de crescimento vem se tornando protagonista nos estudos relacionados aos distúrbios de crescimento, principalmente pela descoberta de defeitos em diversos genes que codificam ou interrompem esses fatores⁴⁶. Os achados mais consistentes e frequentes foram aqueles que envolvem os seguintes genes da cartilagem de crescimento: *SHOX*⁴⁷, *NPR2*⁴⁸ (47), *ACAN*⁴⁹, *IHH*⁵⁰, *NPPC*⁵¹ e mais recentemente o *FGFR3*⁵² e genes relacionados ao colágeno⁵³ (Tabela 1, Figura 2, Anexo A).

2A



2B

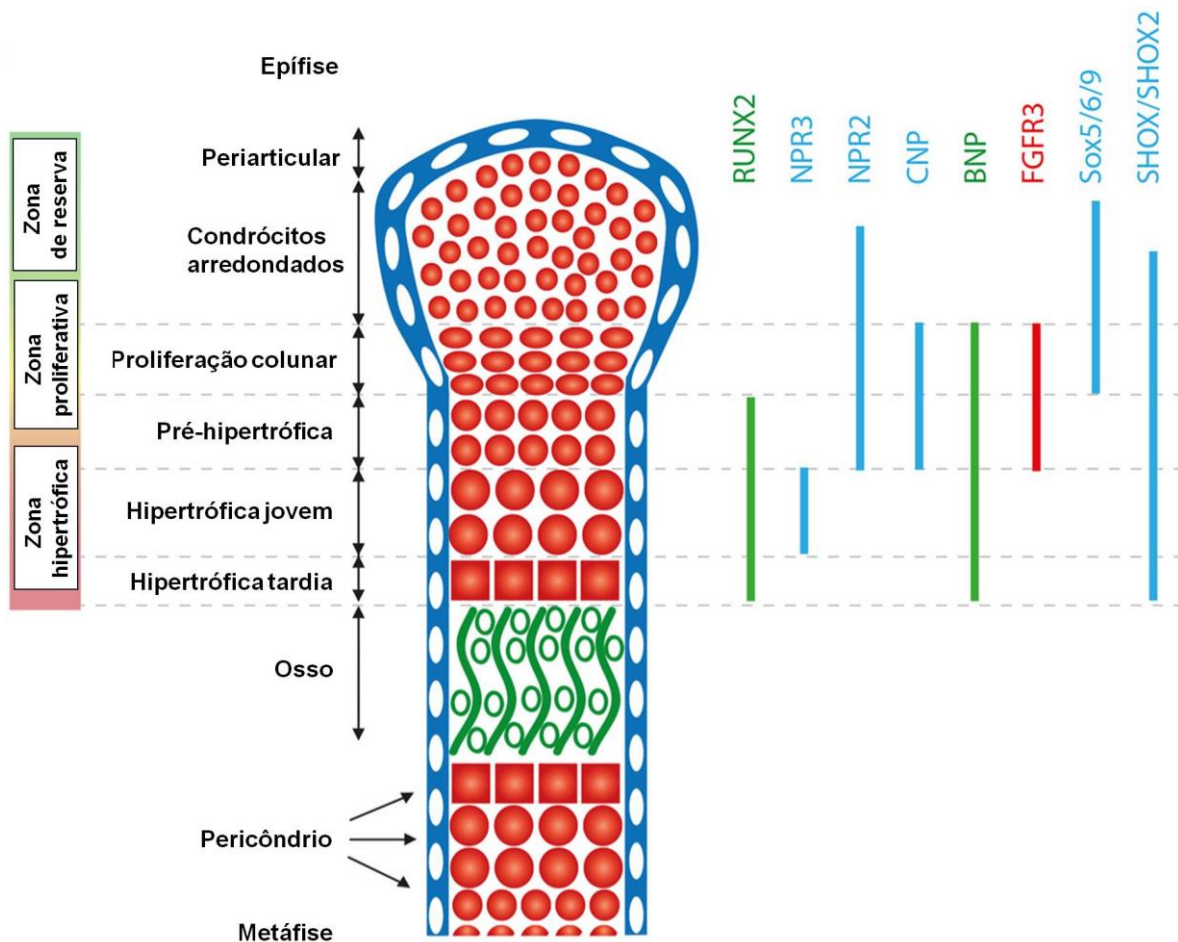


Figura 2– Representação esquemática da cartilagem de crescimento, com suas diferentes zonas. 2A) Defeitos genéticos que afetam os fatores parácrinos e a matriz extracelular Adaptado de Saad e colaboradores, 2017⁵⁴. 2B) Representação das principais proteínas envolvidas no processo de proliferação e diferenciação desses condrócitos, e defeitos genéticos que afetam vias intercelulares, que envolvem fatores de transcrição e vias de sinalização. Fonte: Adaptado de Marchini e colaboradores, 2016²⁵.

1.2.3 Genes relacionados a via RAS-MAPK

O aumento da transdução de sinal através da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (RAS-MAPK), é um mecanismo molecular comum que caracteriza um grupo heterogêneo de síndromes classificadas como RASopatias

(Tabela 1, Figura 3, Anexo A). A síndrome de Noonan é a principal representante deste grupo e que tem como um dos critérios clínicos a baixa estatura. Entretanto, existe um largo espectro de variabilidade fenotípica nos indivíduos afetados, sendo sua correlação genótipo-fenótipo não totalmente estabelecida, até na mesma família. Outro desafio no diagnóstico é que, mesmo na presença de dismorfismos faciais, eles podem sofrer mudanças ao longo da faixa etária, o que muitas vezes dificulta ainda mais o diagnóstico clínico e estas crianças podem ser classificadas como tendo baixa estatura isolada, associado ao seu espectro atenuado. Variantes patogênicas em genes relacionados a via RAS-MAPK já foram identificados em coortes de pacientes com baixa estatura isolada, como mais frequentemente os genes *PTPN11*¹³³ e *NF1*⁵⁵, muitas vezes sendo somente possível o diagnóstico através de uma abordagem genética.

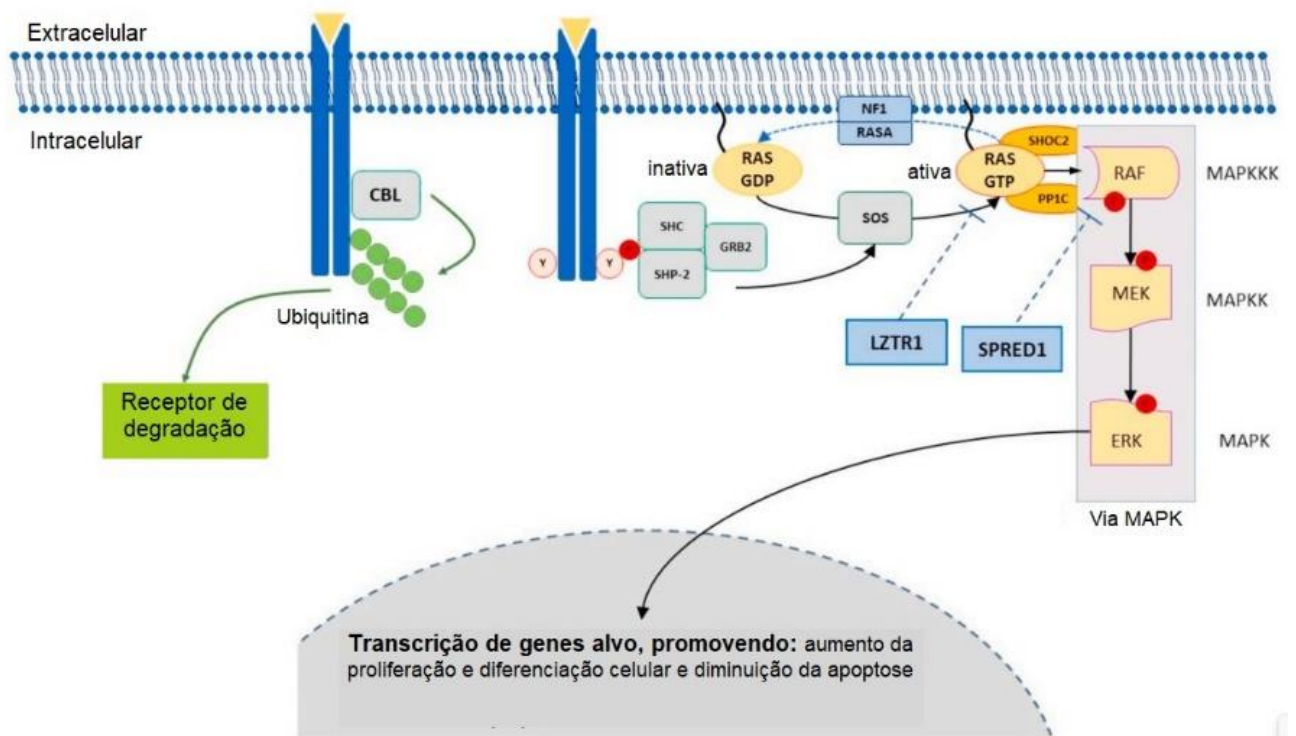


Figura 3 – Representação esquemática da sinalização de Receptor Tirocína Quinases através da via RAS/MAPK e as proteínas essenciais/defeitos moleculares capazes de causar RASopatias. Fonte: Adaptado de Malaquias et al., 2021⁵⁶.

Tabela 1 – Principais genes relacionados ao fenótipo de baixa estatura isolada

Gene	Ano do relato em paciente com BEI	Frequência em BEI (%)	Grau de evidência ¹	OMIM	Observação	Ref
<i>GHR</i>	1995	0 a 5	Limitada	600946	Laboratório sugestivo de insensibilidade parcial ao GH	37
<i>SHOX</i>	1997	2,6 (1,1 a 22,2)	Definitiva	312865	Baixa estatura com desproporcionalidade leve	46
<i>GH1</i>	2003	Sem estudo de prevalência	Limitada	139250	Baixa velocidade de crescimento e atraso da idade óssea	38
<i>IGF1R</i>	2003	1,6 a 2,0	Moderada	147370	Maioria nascido pequeno para idade gestacional e níveis elevados de IGF-1	39
<i>IGFALS</i>	2004	Sem estudo de prevalência	Limitada	601489	Deficiência grave de IGF1 e IGFBP-3 desproporcional a gravidade da baixa estatura	40
<i>GHSR</i>	2006	2,0 a 2,4	Limitada	601898	Associada a DGH e BEI na mesma família	41
<i>IGF1</i>	2012	Sem estudo de prevalência	Limitada	147440	Peso e comprimento ao nascer no limite inferior da normalidade	42
<i>NPR2</i>	2013	1,8 a 6 (13,6*)	Forte	1089616	Achados esqueléticos inespecíficos no Rx de IO	48
<i>PTPN11</i>	2013	Apenas relato de caso	Limitada	176876	Paciente com baixa estatura com fenótipo leve de síndrome de Noonan	33
<i>ACAN</i>	2014	1,4	Moderada	165800	Avanço da idade óssea e osteoartrite de início precoce	49
<i>FGFR3</i>	2015	Apenas relato de caso	Limitada	134934	Apenas uma família descrita com baixa estatura proporcional	52
<i>PAPP-A2</i>	2016	Apenas relato de caso	Limitada	602085	Níveis elevados de IGF-1 e IGFBP3	57
<i>NPPC</i>	2018	Sem estudo de prevalência	Limitada	600296	Duas famílias descritas com braquidactilia	51
<i>IHH</i>	2018	3,4	Moderada	600726	Encurtamento da falange média do 5º dedo	50
<i>STAT5B</i>	2018	Apenas relato de caso	Limitada	604260	Três famílias descritas com eczema e laboratório sugestivo de insensibilidade parcial ao GH	44
<i>NF1</i>	2019	Sem estudo de prevalência	Limitada	613113	Baixa estatura com ausência de características clínicas sugestivas de neurofibromatose	55
<i>COL2A1</i>	2021	5,7	Limitada	120140	Achados esqueléticos inespecíficos e baixa estatura desproporcional	53

1 – O grau de evidência foi calculado baseado em escore proposto por Strande et al. Muito dos genes com limitado nível de evidência decorre do número pequeno de casos publicados. * Casos familiares. Detalhamento de cada gene disponível no Anexo A.

2 JUSTIFICATIVA

Cada um desses genes é responsável por uma baixa proporção de casos de baixa estatura (1-2% ou menos), mas pode ser significativamente maior em baixa estatura familiar (57, 58). Defeitos nesses genes causam um grau variável de baixa estatura com fenótipos não específicos herdados de maneira autossômica dominante. Uma grande limitação destes estudos é que eles se basearam na análise de casuísticas retrospectivamente selecionadas, muitos incluindo também pacientes sindrômicos, e nos quais apenas um gene foi analisado por vez, não permitindo a determinação exata da importância de cada gene no cenário de investigação da BEI. A falta de características específicas em pacientes classificados como BEI impossibilita o reconhecimento sem um estudo genético molecular e dificulta a análise utilizando a estratégia de genes candidatos. Desta forma, o presente estudo avaliou de maneira prospectiva um número de crianças classificadas como tendo BEI, submetendo-as à análise de sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) como parte da investigação inicial.

3 OBJETIVOS

- Determinar de forma prospectiva, através do uso do sequenciamento paralelo em larga escala, a frequência de causas monogênicas da baixa estatura em crianças inicialmente classificadas como tendo BEI.
- Avaliar o acréscimo da taxa de diagnóstico do exoma em comparação com a análise por painel de genes em crianças com BEI.

4 CASUÍSTICA

Este estudo foi executado na Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) e na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42,), da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em colaboração com grandes centros de referência em Endocrinologia Pediátrica Nacional.

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo seguiu todos os princípios éticos e orientações contidas na declaração de Helsinki e pelos termos descritos na resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- HCFMUSP), CAAE: 37868114.3.0000.0068. Foi obtido consentimento por escrito de todos os pais/tutores e pacientes antes do início da pesquisa. Foi obtida e garantida confidencialidade dos resultados a todos os pacientes. Todos os pacientes e/ou responsáveis legais, após serem informados sobre os achados de defeitos genéticos relacionados às doenças em investigação, estão recebendo aconselhamento genético e seguimento conforme o recomendado pelo projeto Diretrizes do Conselho Federal de Medicina da Sociedade Brasileira de Genética Médica.

4.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram selecionados de forma prospectiva 43 crianças com baixa estatura sem causa definida após investigação clínico, laboratorial e radiográfica, como definido pelo consenso de baixa estatura idiopática¹⁷. Os pacientes foram recrutados entre março de 2018 a fevereiro de 2020 através de plataforma digital, disponibilizada nos principais serviços de endocrinologia pediátrica que aceitaram participar como colaboradores do presente estudo (www.ggenes.com.br) (Figura 4). Nesta plataforma foram inseridos os dados antropométricos e clínicos da criança e dos seus familiares

de primeiro grau (Anexo B) que permitiram avaliar os critérios para seleção dos pacientes.



Figura 4 – Página inicial da plataforma digital criada para cadastro de pacientes com baixa estatura desenvolvido pelo Grupo de Distúrbios do Crescimento – Unidade de Endocrinologia Genética – HCFMUSP. Disponível em www.ggenes.com.br

4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

1. Baixa estatura caracterizada por escore- Z da altura inferior a menos 2 de acordo com a curva do “Clinical Growth Charts” (CDC)⁶⁰.
2. Avaliação clínica compatível com uma criança saudável, sem sinais ou sintomas de doença crônica que justifique o distúrbio de crescimento.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Crianças nascidas prematuras (idade gestacional < 37 semanas)
2. Crianças com escore-Z do peso ao nascimento ≤ -2
3. Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e déficit intelectual de qualquer magnitude

4. Presença de dismorfismos ou malformações maiores, ou seja, aqueles que não são comumente observados na população geral e/ou que ocasiona significativa problema de saúde⁶¹. Pacientes com mais de 3 dismorfismos menores também serão excluídos⁶² (Anexo B).

5. Pacientes com suspeita de displasia esquelética devido a deformidades ósseas, achados radiográficos sugestivos de displasia esquelética ou com clara desproporção corpórea⁶³.

6. Anormalidades na avaliação laboratorial que possam justificar o déficit de crescimento dentre os exames sugeridos no consenso de baixa estatura idiopática¹⁷: hemograma, prova de atividade inflamatória, uréia, creatinina, TSH, T4L, TGO, TGP, IGF-1, albumina, ferritina, gasometria venosa, sódio, potássio, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, exame de rastreamento para doença celíaca, cariótipo (nas meninas), raio X de mãos e punhos para idade óssea. Na presença de IGF-1 baixo, é necessário afastar deficiência de GH por demonstração de pico de GH > 5µg/L em teste de liberação.

7. Ter realizado investigação genética molecular prévia para avaliação do distúrbio de crescimento.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

1. Assinatura do termo de consentimento
2. Amostra de DNA com qualidade e concentração suficiente para realização dos testes propostos

4.6 MÉTODOS

4.6.1 Extração do DNA genômico

Os pacientes selecionados e familiares tiveram amostras de DNA extraídas a partir de leucócitos de sangue periférico. O procedimento de extração de DNA foi realizado de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e

Genética Molecular da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material foi superior a 1,75. As amostras estão sendo mantidas congeladas a -20 °C em biorrepositório sob a responsabilidade do orientador principal deste estudo.

4.6.2 Estudo genético

No estudo atual utilizamos de forma preponderante para realizar a análise genética o sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) de regiões alvos. O SPLE pode ser dividida em algumas etapas: (a) o preparo das bibliotecas, (b) a amplificação clonal, (c) o sequenciamento propriamente dito, e (d) a bioinformática para análise dos dados (64). Estas etapas são comuns tanto para o sequenciamento de um painel de genes selecionados, como para o sequenciamento completo do exoma.

Todos os 43 pacientes com BEI incluídos no estudo foram submetidos ao painel customizado que contém aproximadamente 100 genes relacionados a distúrbio de crescimento (Anexo C) e análise por Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA) para o gene *SHOX* e suas regiões regulatórias. Alguns pacientes mais informativos (com baixa estatura familiar, desproporção corpórea ou algum achado esquelético inespecífico) que continuaram sem diagnóstico genético após abordagem por painel de genes, foram submetidos a análise de sequenciamento exômico. As sequências geradas permitiram a adequada análise dos genes selecionados sendo que 99,8% das regiões alvo tiveram uma cobertura ≥ 20 reads. Os protocolos utilizados para realização do painel de genes e sequenciamento do exoma serão descritos a seguir.

4.6.2.1 Painel de genes

As amostras foram submetidas ao painel customizado de genes já previamente validado por nosso grupo^{65,66}. Este painel engloba diversos genes presentes em distúrbios de crescimento (ensaio Agilent SureSelect, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA). (Anexo C). As bibliotecas foram elaboradas de acordo com o protocolo SureSelectXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com kit comercial Kit MidOutPut V2 2x150 (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A amplificação clonal e o sequenciamento foram realizados na plataforma *NextSeq500* (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA) do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da Rede PREMiUM, Multiusuário FAPESP, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As sequências foram alinhadas como referência o GRCh37/hg19. A “chamada das variantes” (variant call) foi feito através do programa Freebayes e foi liberado o arquivo em formato *.vcf (variant call format) contendo cada nucleotídeo que diferiu da sequência de referência para a etapa de bioinformática.

4.6.2.2 Sequenciamento do exoma

As etapas relacionadas ao preparo das bibliotecas, amplificação clonal e o sequenciamento propriamente dito foi realizado em serviço terceirizado com parceria já estabelecida. As bibliotecas foram elaboradas de acordo com o protocolo Twist Exome seguindo as recomendações do fabricante. A amplificação clonal e o sequenciamento foram realizados na plataforma NovaSeq (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA). O prestador de serviço realizou o alinhamento das sequências das amostras à referência do genoma humano (GRCh37/hg19), utilizando o programa BWA e foi gerado o arquivo com extensão *.bam. A partir do arquivo *.bam, foi realizada “chamada das variantes” (variant call) utilizando o programa GATK, resultando o arquivo em formato *.vcf (variant call format). O serviço terceirizado forneceu os arquivos fastq, BAM e VCF para análise pela pesquisadora.

4.6.2 Bioinformática

As análises de bioinformática correspondentes ao processamento dos dados brutos derivados do SPLE foram realizadas em colaboração com o Dr. Antônio Lerário (do Departamento de Medicina Interna da Divisão de Metabolismo, Endocrinologia e Diabetes da Universidade de Michigan). Esta etapa corresponde a geração dos arquivos analisáveis (VCF anotada, arquivo final da análise de CNVs). Para o processamento dos dados gerados a fim de se identificar as alterações de interesse de cada paciente, foi realizada a anotação dos genótipos das variantes detectadas. Utilizando o programa Annovar foi incluído para cada variante presente no arquivo VCF informações quanto: a sua localização (qual gene, se em exon ou intron, etc), frequência em bancos públicos de variantes [gnomAD⁶⁷, ABraOM⁶⁸, e banco interno do SELAdb ⁶⁹]; análise por ferramentas *in silico* para predição de efeito deletério sobre o produto do gene, etc.

As VCF anotadas foram analisadas pela pesquisadora, nas quais foram aplicados os seguintes filtros sequenciais, como frequência na população, localização da variante, predição de patogenicidade *in silico*, dentre outros, para gerar uma lista limitada de variantes potencialmente relacionadas com o fenótipo (Figura 5). Na análise do exoma, além de analisado os genes já tradicionalmente associados ao fenótipo de BEI, foi realizada análise em genes da cartilagem de crescimento e/ou eixo GH/IGF-1 que apresentaram recorrência de variantes de interesse entre os pacientes selecionados e possível genes candidatos. As variantes candidatas foram confirmadas e segregadas na família por sequenciamento tradicional e classificadas em relação à patogenicidade, seguindo o guia de classificação da ACMG-AMP⁷⁰ (70) (Anexos D, E, F e G).

4.6.2 Identificação de CNVs dos resultados derivados do SPLE

A chamada das CNVs foi realizada a partir do mesmo arquivo *.bam, utilizado para a chamada das variantes no painel de genes, e foram analisadas através do programa *COpy Number Targeted Resequencing Analysis* (CONTRA). Através deste programa, foi possível identificar a presença de deleções ou duplicações de grandes

regiões a partir da comparação da cobertura do sequenciamento do paciente como uma linha de base criada a partir da análise de cobertura de vários indivíduos normais. Para esta análise, o programa fragmenta todas as regiões sequenciadas em regiões menores e libera o resultado de cada região em log-ratio juntamente com uma análise de significância (valores de p). Na interpretação destes resultados, Log-ratios próximos de -1,0, com valores de p ajustados inferiores a 0,05; indicam a presença de uma deleção em heterozigose. No sequenciamento exômico, a avaliação das CNVs foi realizada através do programa ClinCNV que utiliza a cobertura normalizada de cada região representada no exoma.

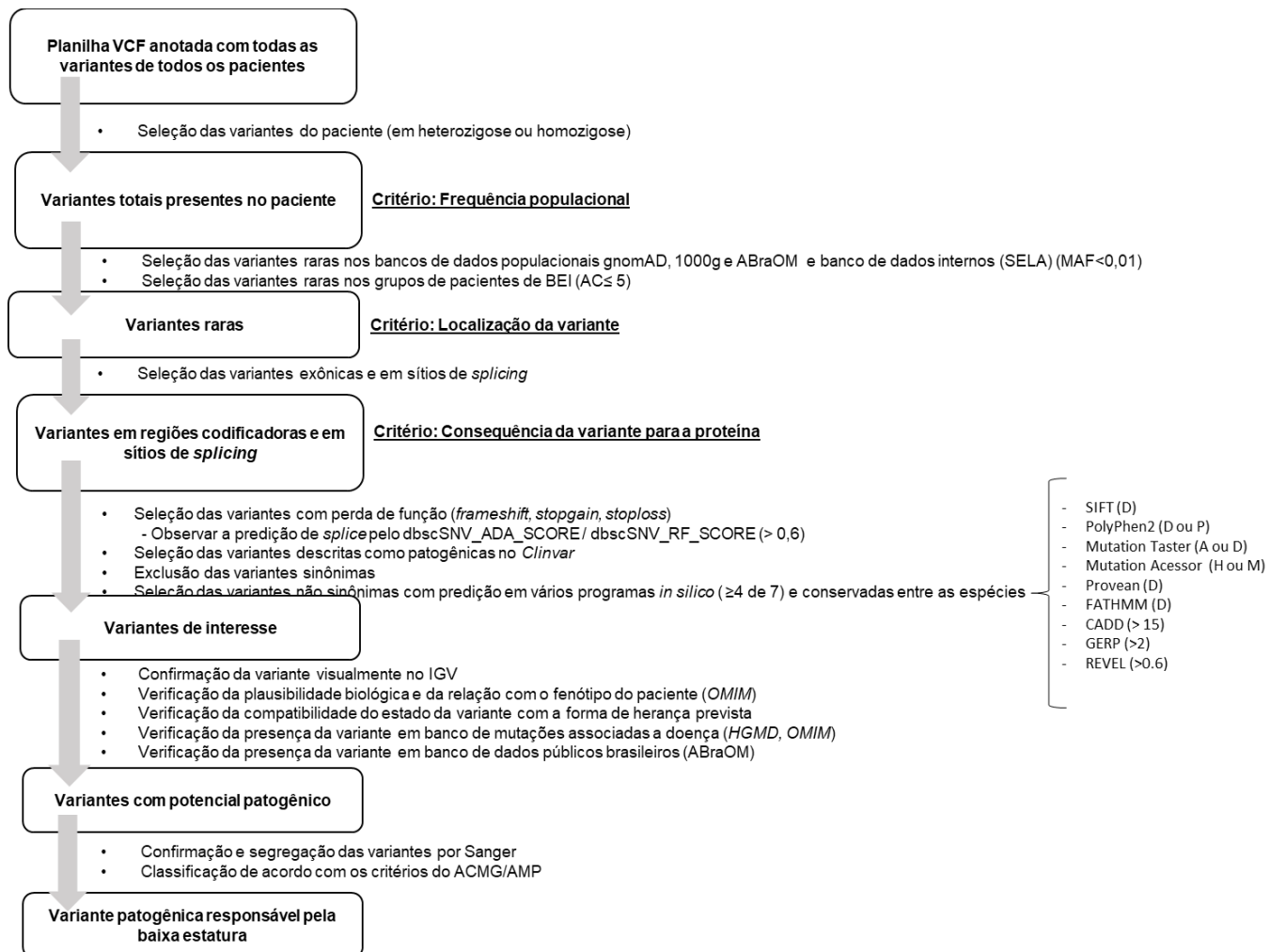


Figura 5 - Fluxo da estratégia de filtragem utilizada para selecionar as variantes com possibilidade de patogenicidade nos pacientes selecionados.

4.6.5 Confirmação das deleções relacionadas ao gene *SHOX*

As CNVs relacionadas ao *SHOX*, identificadas pela análise do CONTRA, foram posteriormente confirmadas e segregadas pela metodologia de MLPA. Todas as reações foram realizadas de acordo com as instruções do protocolo do kit SALSA MLPA P018-G1 *SHOX* (versão G01-03) (MCR Holland, Amsterdam, Holanda). Através deste kit, possibilitou-se uma análise simultânea de CNVs de 48 regiões, sendo 26 referentes à região PAR1 (incluindo o gene *SHOX* e suas regiões regulatórias), 13 referentes a diferentes regiões do cromossomo X e nove, a regiões de referências. As amostras processadas com o kit acima foram submetidas a uma eletroforese capilar no sequenciador automático ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer e analisadas pelo programa GeneMapper 5.0 (ambos Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os dados obtidos foram analisados pelo programa MCR Coffalyzer (MCR Holland, Amsterdam, Holanda), que determinou a relação das áreas dos picos de interesse com as áreas dos picos das regiões controle, considerando um pico normal quando a razão entre essas áreas esteve entre 0,7 e 1,3; deletado quando foi inferior a 0,7 e duplicado quando foi superior a 1,3. Quatro indivíduos com estatura normal foram utilizados como grupo controle para a validação da reação e análise dos pacientes.

4.6.6 Confirmação de CNVs por Análise Cromossômica por Microarray

A Análise Cromossômica por Microarray (CMA) foi realizado em apenas 1 paciente para confirmação de um achado visualizado pelo CONTRA. Após extração de DNA de leucócitos periféricos, o experimento foi conduzido de acordo com as orientações do fabricante, na plataforma de 180 K de todo o genoma para CMA (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA), com a colaboração da Dra. Ana Krepischi, do Centro de Genoma Humano (IB-USP). Os segmentos cromossômicos considerados CNVs tiveram suas coordenadas genômicas alinhadas conforme GRCh37/hg19. Em uma etapa inicial, os segmentos considerados alterados foram comparados com dados de CNVs em indivíduos normais disponíveis no Database of Genomic Variants (DGV) (<http://projects.tcag.ca/variation>). Na próxima etapa, foi

realizada a avaliação da patogenicidade da CNV encontrada, avaliando-se o padrão de herança e a segregação familiar, sobreposição da CNV às coordenadas genômicas da região que engloba o gene avaliado, e a sobreposição das alterações a desequilíbrios genômicos de outros pacientes com baixa estatura descritos em banco de dados de CNVs (DECIPHER - Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources; <http://decipher.sanger.ac.uk/>). A avaliação do conteúdo gênico das CNVs encontradas, foi cruzada com as informações dos achados disponíveis no banco do UCSC (University of California, Santa Cruz Genome Browser; <http://genome.ucsc.edu/>). A classificação final quanto a patogenicidade das CNVs encontradas seguiu as diretrizes definidas pelo Colégio Americano de Genética Médica e pela Associação de Patologia Molecular (ACMG/AMP)⁷⁰.

4.6.7 Sequenciamento Automático Tradicional

Alterações genéticas identificadas que foram consideradas novas, foram confirmadas por sequenciamento pela técnica de Sanger. Primeiramente, foi amplificada por PCR, utilizando primers flanqueando a região alvo. Foi utilizado um controle negativo para todas as amplificações. Conforme a recomendação do fabricante, os produtos amplificados foram submetidos a uma purificação enzimática com a enzima ExoSAP-IT. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1* (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA). O produto desta reação foi submetido a uma eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA). A leitura dos eletroferogramas foi realizada pela pesquisadora através do programa *Sequencher 4.10.1* (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, EUA).

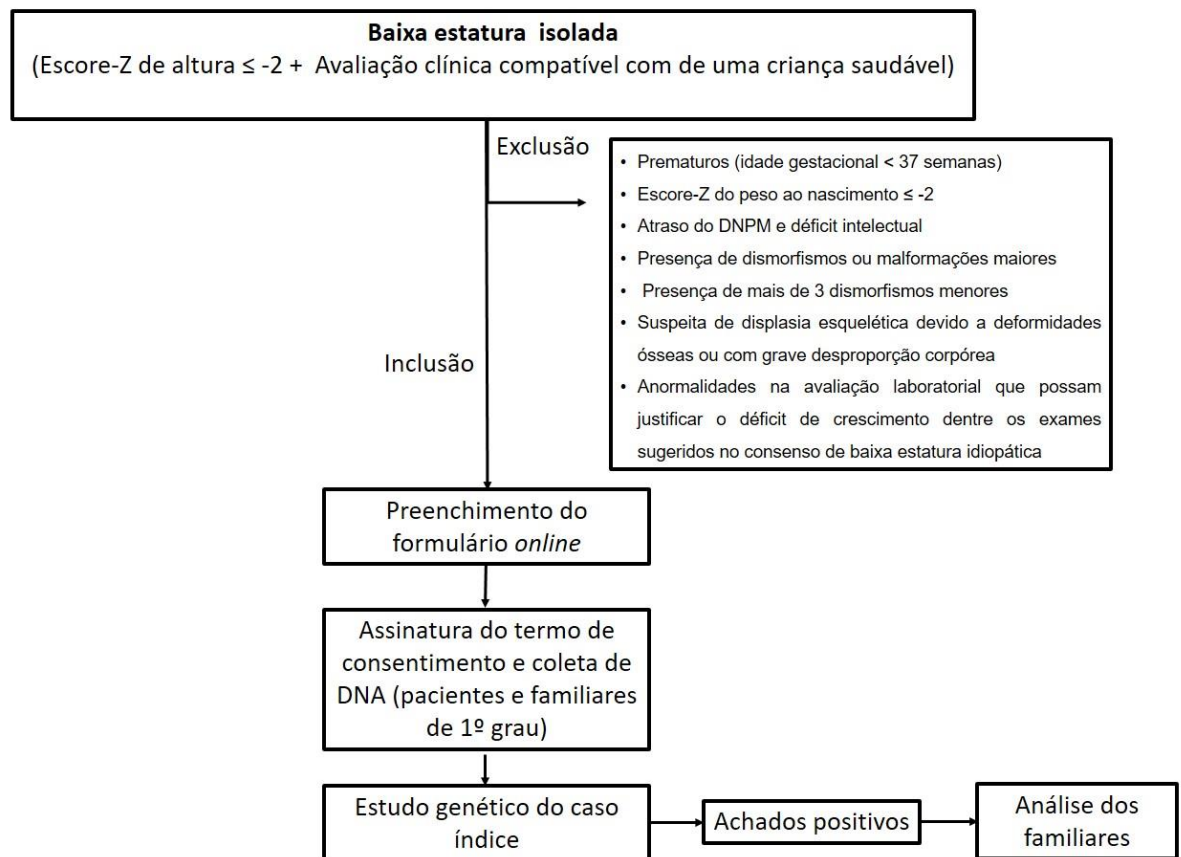


Figura 6 – Resumo da estratégia de seleção da casuística

4.7 ESTATÍSTICA

Variáveis qualitativas (nominais) foram relatadas como valores absolutos e porcentagens. Variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão. As variáveis nominais foram comparadas pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher, conforme apropriado. Para comparar as crianças com e sem diagnóstico genético, usamos teste ANOVA seguida do teste de Tukey ou Kruskal-Wallis, conforme apropriado. Um valor de $p < 0,05$ foi usado para significância estatística. Todas as análises foram feitas com o software SigmaStat (RRID:SCR_010285, versão 3.5; Systat Software, San Jose, CA).

5 RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO

Os pacientes estudados foram encaminhados por endocrinologistas pediátricos que atuam em clínicas privadas (n=13; 30,2%), serviços públicos de referência em Endocrinologia dos estados de São Paulo (n=16; 37,2%), Minas Gerais (n=5; 11,6%) e Rio de Janeiro (n=9; 21%) (Figura 7). A casuística estudada se caracteriza por um discreto predomínio de crianças do sexo feminino (53,5%). Os pacientes iniciaram o acompanhamento com 8,8 anos em média, com média do escore-Z da altura inicial de $-2,7 \pm 0,8$ sendo que 26 (60,4%) tinham escore-Z de altura $< -2,5$ e sete pacientes (16,2%) tinham baixa estatura grave (escore Z de altura $\leq -3,0$). A maioria das crianças era pré púbere na primeira avaliação (81,4%). A maioria das crianças eram eutróficas (74,4%; Escore Z do IMC ≥ -2 e ≤ 1), 14% tinham baixo IMC (Escore Z do IMC < -2) e 11,6% tinham sobrepeso (Escore Z do IMC > 1 e ≤ 2). Discreto atraso de idade óssea foi observado na maioria (diferença entre idade óssea e idade cronológica de $-1,8$ anos $\pm 1,4$).

Houve uma alta prevalência de baixa estatura familiar, já que em 19 casos (44,1%), pelo menos um dos pais tinha escore-Z da altura menor que $-2,0$ (média do escore-Z da altura alvo: $-1,3 \pm 0,9$). Baixa estatura desproporcional, definida por escore-Z da altura sentada dividida pela altura total maior que 2,0, foi encontrada em 18,6 % da casuística. Estes pacientes foram incluídos neste estudo pois se tratava de desproporção leve, imperceptível ao exame físico e sem sinais clínicos e radiográficos de displasia esquelética. As características clínicas da casuística encontram-se resumidas na Tabela 2.

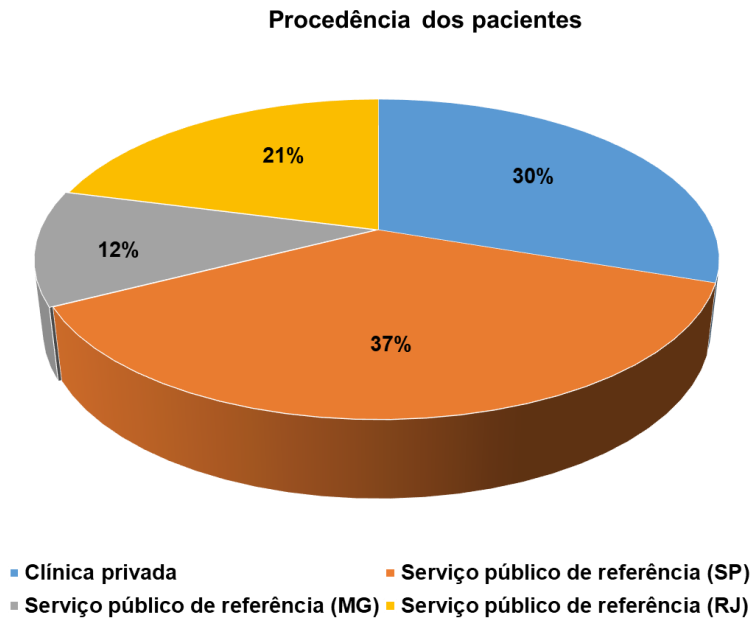


Figura 7 - Procedência dos pacientes com BEI submetidos ao painel

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes com BEI submetidos ao painel

Número de pacientes	43
História familiar de BEI	19 (44,1%)
Sexo (feminino/masculino)	23/20
Idade cronológica (anos)	8,8 ± 3,6
Idade óssea – idade cronológica (anos)	-1,8 ± 1,4
Escore Z da altura	-2,7 ± 0,8
Baixa estatura grave (Escore Z da altura ≤ 3,0)	7 (16,2%)
Escore Z do índice de massa corporal (IMC)	-0,5 ± 1,0
Escore Z da altura sentada/altura total	0,9 ± 1,3
Pacientes com desproporção corpórea (%)	8 (18,6%)
Escore Z da AS/AT dos pacientes com desproporção corpórea	2,3 ± 0,5
Escore Z da altura alvo	-1,3 ± 0,9
Pico de estímulo de GH (média ± DP)	10,6 ± 6,6
Escore Z do IGF-1	-0,92 ± 1,05
Tratamento com rhGH (%)	20 (46,5%)

5.2 RESULTADOS DO ESTUDO GENÉTICO

Todos os 43 pacientes com BEI incluídos no estudo foram submetidos ao painel de genes e análise por MLPA para o gene *SHOX* e suas regiões regulatórias.

5.2.1 Variantes alélicas encontradas no painel de genes

As variantes classificadas como patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (PP) pelo ACMG foram consideradas como achados positivos. Além destas, também foram consideradas como variantes de interesse aquelas localizadas em genes responsáveis pelo fenótipo e classificadas como de significado incerto (VUS), mas que ainda necessitam de maior elucidação para reforçar seu potencial patogênico.

No total, foram identificadas 13 variantes em heterozigose, patogênicas ou provavelmente patogênicas em 10 dos 43 pacientes (23,2%). Dessas variantes, 9 são variantes de ponto e 4 são CNVs encontradas através da análise do CONTRA. As variantes de ponto estão descritas na tabela 3 e a descrição completa das CNVs na tabela 4. Estes achados genéticos são em maioria relacionados à cartilagem de crescimento (1 no gene *IHH*, 1 no *NPR2*, 1 no *FGFR3*, 1 no *COL2A1*, 2 no *ACAN* sendo 1 variante de ponto e um rearranjo complexo envolvendo este gene, e 3 são deleções em heterozigose relacionadas ao gene *SHOX*). Uma variante foi identificada no gene *GHSR* que é associado ao eixo GH-IGF1 e três variantes estão em genes relacionados à via RAS-MAPK (1 no gene *CBL*, 1 no *NF1* e 1 no *PTPN11*). Dos 10 pacientes, 3 pacientes possuem mais de um defeito genético que poderia contribuir com o fenótipo de baixa estatura.

Adicionalmente, foram encontradas 6 variantes classificadas como variantes de significado incerto (VUS) em 6 pacientes (Tabela 5). Um paciente apresenta uma variante patogênica e uma CNV provavelmente patogênica, além de uma outra variante VUS (paciente 4). Três variantes são relacionadas a cartilagem de crescimento (2 no gene *NPR2* e 1 no *IHH*), 2 são associadas ao eixo GH-IGF1 (2 no *IGF1R*) e 1 relacionada ao gene *NF1*.

Tabela 3 – Variantes patogênicas e provavelmente patogênicas identificadas pelo painel de genes e análise de CNV nos pacientes com baixa estatura idiopática

ID	Gene	Variante	MAF ^a	Herança	Classificação ACMG/AMP ⁽⁷⁰⁾
1	ACAN	NM_001369268.1:c.5239_5248del (p.Gly1747Leufs*3)	0	Pai ^d	Patogênica PVS1, PM2, PP4
	SHOX^b	Deleção <i>SHOX</i> area ^g	-	Pai ^d	Provavelmente patogênica
2	IHH	NM_002181.4:c.366G>A (p.Trp122*)	0	Mãe ^e	Patogênica PVS1, PM2, PP1
3	NPR2	NM_003995.4:c.953G>A (p.Arg318Gln)	1,6 x 10 ⁻³	De novo	Provavelmente patogênica PM1, PM2, PM6
4	CBL	NM_005188.4:c.1111T>C (p.Tyr371His)	6,5 x 10 ⁻⁵	De novo	Provavelmente patogênica PM1, PM2, PM5, PM6, PP3, PP5
	SHOX^b	Deleção <i>SHOX</i> area ^g	-	Mãe ^d	Provavelmente patogênica
5	GHSR	NM_198407.2:c.611C>A (p.Ala204Glu)	5,3 x 10 ⁻⁵	Pai ^d	Provavelmente patogênica PS3, PP3, PP5
6	PTPN11	NM_002834.5:c.663A>G (p.Ile221Met)	0	De novo	Provavelmente patogênica PM1, PM2, PM5, PM6, PP2, PP3
7	COL2A1	NM_001844.5:c.1690G>A (p.Gly564Ser)	0	Pai ^d	Provavelmente patogênica PM1, PM2, PP2, PP3
	NF1^f	NM_000267.3:c.3827G>A (p.Arg1276Gln)	8,2 x 10 ⁻⁴	De novo ^f	Patogênica PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5
8	ACAN^c	Rearranjo complexo ^g	-	Mãe ^d	Patogênica
9	SHOX^b	Deleção <i>SHOX</i> (gene/região regulatória) ^g	-	Pai ^d	Patogênica
10	FGFR3	NM_001163213.1:c.251C>T (p.Ser84Leu)	0	Mãe ^d	Provavelmente patogênica PM2, PP1, PP2, PP4, PP5

^aMAF, menor frequência alélica baseada nos bancos de dados do gnomAD (67) e ABraOM (68). ^bAnálise de CNV pelo CONTRA, confirmado e segregado na família por MLPA. ^cAnálise de CNV pelo CONTRA, confirmado por CMA. ^dFamiliar portador da variante com baixa estatura (z score altura ≤ -2). ^eEsta variante foi de novo na mãe, e ausente nos avós maternos. ^fVariante em mosaico confirmada por segregação e visualizada pelo IGV (integrative genomics viewer). ^gDescrição molecular detalhada das CNVS disponível na tabela 6

Tabela 4 – Variações de número de cópias (CNVs) encontradas na análise do CONTRA e que foram confirmadas por outras metodologias

ID	Gene	Alteração visualizada e técnica para confirmação
		Técnica: MLPA^{1,2}
1	SHOX	Deleção em heterozigose em 03 sondas da <i>SHOX area – downstream</i> Intervalo mínimo ChrX:781167- 817779; 36612pb Intervalo máximo ChrX:751641- 828421; 76780pb
		Técnica: MLPA^{1,2}
4	SHOX	Deleção em heterozigose em 01 sonda da <i>SHOX- area – downstream</i> Intervalo mínimo ChrX:809260- 809321; 61pb Intervalo máximo ChrX:781230- 817699; 36469pb
		Técnica: CMA²
8	ACAN	Rearranjo complexo afetando segmento do braço longo do cromossomo 15, cujo tamanho completo é de 226,7 kb envolvendo deleção de região regulatória do ACAN, Estrutura do rearranjo: duplicação – deleção – duplicação: arr[GRCh37] 15q26.1(89223157_89304656)x3 + arr[GRCh37] 15q26.1(89338141_89366544)x1 + arr[GRCh37] 15q26.1(89381207_89449909)x3
		Técnica: MLPA^{1,2}
9	SHOX	Deleção em heterozigose envolvendo os genes <i>PPP2R3B, SHOX area upstream, SHOX</i> e <i>SHOX- area – downstream</i> Intervalo mínimo ChrX:307417- 1029779; 722362pb Intervalo máximo ³ ChrX:307417- 1327689;1020272pb)

1 Intervalo mínimo e máximo aproximado da deleção visualizada pelo estudo de MLPA. MLPA foi realizado através do kit comercial. P018G1SHOX (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands). 2 Todas as coordenadas estão de acordo com GHRCh37/hg19. 3 O intervalo máximo pode ser ainda maior pois o kit não possui uma sonda localizada na região “upstream” em relação a primeira sonda deletada. MLPA - Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação; CMA - análise cromossômica por microarray.

Tabela 5– Variantes de significado incerto identificadas pelo painel de genes nos pacientes com baixa estatura idiopática

ID	Gene	Variante	MAF ^a	Herança	Classificação ACMG/AMP ⁽⁷⁰⁾
4	<i>NPR2</i>	NM_003995.4:c.1922C>T (p.Ser641Leu)	9,0 x 10 ⁻⁵	Mãe ^b	VUS PM1,PM2, BP4
11	<i>IGF1R</i>	NM_000875.5:c.1139T>G (p.Leu380Arg)	0	Mãe	VUS PM2, PP2, PP3
12	<i>NF1</i>	NM_000267.3:c.169G>A (p.Gly57Ser)	7,4 x 10 ⁻³	Não disponível	VUS PP3, BS2
13	<i>IGF1R</i>	NM_000875.5:c.3932C>T (p.Ser1311Leu)	1,0 x 10 ⁻⁴	De novo	VUS PM6, PP2, BS4
14	<i>NPR2</i>	NM_003995.4:c.2644G>A (p.Val882Ile)	2,0 x 10 ⁻⁴	Não disponível	VUS PP3, PP4
15	<i>IHH</i>	NM_002181.4:c.1168C>T (p.Arg390Cys)	4,0 x 10 ⁻⁴	Pai ^b	VUS PM2, PP2, PP3

^a MAF, menor frequência alélica baseada nos bancos de dados do gnomAD (67) e ABraOM (68). ^b Familiar portador da variante com baixa estatura (z escore altura ≤ -2).

5.2.2 Características clínicas dos pacientes com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas associadas com baixa estatura idiopática avaliados pelo painel de genes

As características clínicas dos pacientes que apresentaram variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (n= 10), estão resumidas na Tabela 6 e detalhamento de cada caso no Anexo H. Sete crianças (70%) herdaram a variante de um pai com baixa estatura (escore-Z de altura de -4,2 a -2,0). Quatro pacientes tinham discreta desproporção corpórea (AS:AT >2) e avaliação radiográfica e esquelética sem achados sugestivos de displasia esquelética, e todos eles apresentavam defeitos genéticos relacionados a cartilagem de crescimento (*IHH*, *SHOX*, *ACAN*, *FGFR3*). Dois pacientes tinham achados esqueléticos inespecíficos e ambos também tinham variantes relacionadas a cartilagem de crescimento. O paciente com variante no gene *IHH* (paciente 2) tinha encurtamento da falange média do 5º dedo e epífises cônicas, identificadas pelo raio X de idade óssea. Nenhum dos pacientes que tiveram variantes (n = 3) relacionadas ao gene *SHOX* tinham deformidade de Madelung e apenas uma

menina tinha baixa estatura desproporcional. A maioria das crianças tinha idade óssea (IO) compatível com idade cronológica (IC) (70%) ou IO discretamente atrasada (20%). Considerando as 2 meninas com variantes relacionadas ao gene *ACAN*, uma delas tinha avanço de idade óssea (IC 5,4 anos; IO 7,6 anos), e a outra tinha idade óssea compatível com a idade cronológica (IC 9,3 anos; IO 8,6 anos). Os meninos com variantes patogênicas nos genes *CBL* e *PTPN11* não tinham características clínicas sugestivas de síndrome de Noonan ou outra Rasopatia. A paciente com variante no gene *NF1* não tinha nenhum achado clínico sugestivo de Neurofibromatose tipo 1 na sua primeira avaliação aos 2 anos e 7 meses. A variante encontrada neste gene foi em mosaicismo, o que pode explicar a ausência de quaisquer achados clínicos (Anexo H).

Tabela 6 – Características clínicas dos pacientes submetidos ao estudo genético em que foram encontradas alterações genéticas P/PP pelo painel de genes

ID	Gene	Sexo	Idade (anos)	IO-IC (anos)	Z da altura	Z da AS/AT	Z IMC	Z altura pai	Z altura mãe	Achados clínicos
1	<i>ACAN, SHOX</i>	F	5,4	2,3	-2,1	-0,9	0,7	-2,2 ^a	-1,4	Avanço de idade óssea
2	<i>IHH</i>	M	4,0	-0,9	-3,1	2,0	0,6	1,5	-0,9 ^a	Encurtamento da falange distal do 5º dedo no RX de IO
3	<i>NPR2</i>	M	4,8	-1,6	-2,5	0,7	-0,1	-0,3	-1,5	-
4	<i>CBL, SHOX</i>	M	12,9	-2,9	-3,2	-0,5	-2,8	-0,4	-4,2 ^{a,c}	-
5	<i>GHSR</i>	M	4,1	-0,3	-2,3	-0,5	0,3	-2,0 ^a	0,7	Fronte proeminente
6	<i>PTPN11</i>	M	4,0	-0,3	-2,6	-0,5	-0,5	1,5	0,0	Epicanto
7	<i>COL2A1, NF1</i>	F	2,7	-0,1	-3,4	-0,1	1,4	-2,5 ^{a,d}	-0,4	Clinodactilia
8	<i>ACAN</i>	F	9,3	-0,7	-3,3	3,6	0,2	-3,7	-3,9 ^a	Palato ogival, epicanto
9	<i>SHOX</i>	F	9,3	0,5	-2,3	2,2	-0,1	-2,7 ^a	-0,3	Discreta triangulação da epífise distal do rádio no RXIO.
10	<i>FGFR3</i>	M	5,1	-1,0	-2,8	2,2	-0,1	-1,5	-3,5 ^a	Epicanto discreto

^a Familiar portador de quem o filho herdou a variante; ^b Este paciente também tem uma variante VUS no gene *NPR2*; ^c Esta paciente tem apenas a variante do gene *SHOX*; ^d Este paciente tem apenas a variante do *COL2A1*. IO, idade óssea; IC, idade cronológica; A, altura ;Z, escore Z; AS, altura sentada; IMC, índice de massa corporal; RX, raio X.

5.2.3 Análise dos pacientes através de exoma

Dos 43 pacientes analisados, 33 permaneceram sem diagnóstico genético. Tivemos a oportunidade de submeter 8 deles a análise por exoma. Estes pacientes foram priorizados pela presença de baixa estatura familiar e/ou presença de desproporção corpórea. Dois pacientes foram submetidos a análise com suas respectivas mães com baixa estatura, um paciente foi analisado juntamente com o irmão também baixo e os demais 5 foram analisados isoladamente.

5.2.4 Achados genéticos encontrados pela análise de exoma

No total, foram identificadas 3 variantes em heterozigose, patogênicas ou provavelmente patogênicas em 3 dos 8 pacientes submetidos a análise do exoma (37,5%). Todos os 3 achados genéticos são relacionados a cartilagem de crescimento: 1 variante frameshift no gene *LTBP3*, 1 variante stop gain no gene *ERF* e uma CNV (duplicação) envolvendo o gene *IHH* (Tabela 7).

Tabela 7 – Variantes provavelmente patogênicas identificadas pelo exoma nos pacientes com baixa estatura idiopática

ID	Gene	Variante	MAF ^a	Herança	Classificação ACMG/AMP ⁽⁷⁰⁾
16	<i>LTBP3</i>	NM_001130144.3(NP_001123616.1):p.(Glu507Lysfs*5)	-	Mãe ^b	Provavelmente patogênica PVS1, PM2, PP1
17	<i>ERF</i>	NM_006494.4):c.697C>T: p.Arg233*	-	Mãe ^b	Patogênica PVS1,PM2,PP5,
18	<i>IHH</i>	NM_002181.4(NP_002172.2):p.(Thr104Argfs*9)	-	Mãe	Provavelmente patogênica PVS1,PM2,PP4

a MAF, menor frequência alélica baseada nos bancos de dados do gnomAD (67) e ABraOM (68). b Familiar portador da variante com baixa estatura (z escore altura ≤ -2).

5.2.5 Características clínicas dos pacientes com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas identificadas pela análise do exoma

Dois dos 3 pacientes apresentam pais com baixa estatura. A mãe do paciente 18 tem altura dentro da normalidade, mas apresenta deformidade de Madelung e hipertrofia muscular. A mesma foi analisada por MLPA para o gene *SHOX* porém teve resultado negativo. Apenas um paciente (paciente 16) tem desproporção corpórea leve ($AS/AT = 2$). Esses pacientes, mesmo tendo variantes em genes relacionados previamente a displasias esqueléticas, não apresentam quaisquer características clínica ou radiográficas sugestivas de displasia esquelética. Apenas o paciente portador da variante no gene *IHH* (paciente 18) apresenta achado de epífises cônicas e encurtamento da falange média do 5º dedo no raio X de idade óssea, assim como seu irmão que herdou a mesma variante (Tabela 8, Anexo H).

Tabela 8 - Características clínicas dos pacientes com variantes provavelmente patogênicas identificadas pela análise do exoma

ID	Gene	Sexo	Idade (anos)	IO-IC (anos)	Z da altura	Z da AS/AT	Z IMC	Z altura pai	Z altura mãe	Achados clínicos
16	<i>LTBP3</i>	M	6,7	-0,3	-2,4	2,0	0	-0,5	-2,4	Desproporção corpórea leve
17	<i>ERF</i>	M	14,8	-1,5	-2,5	1,1	-2,2	-1,4	-2,1	Epicanto
18	<i>IHH</i>	M	11,6	-1,6	-2,4	1,2	1,6	-0,7	-1,1	Leve mesomelia, braquiodactilia leve-

5.3 Comparação das características clínicas dos 43 pacientes com BEI com e sem diagnóstico genético

Comparando os grupos de pacientes sem e com diagnóstico genético, não há diferenças entre a sexo, idade cronológica, altura, IMC, proporções corpóreas, presença de história familiar de baixa estatura, altura alvo e valores de pico de GH. O grupo sem diagnóstico genético tem um maior atraso na idade óssea ($p= 0,007$) quando comparado com o grupo com diagnóstico genético (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação das características clínicas dos 43 pacientes com BEI com e sem diagnóstico genético

	Sem diagnóstico	Com diagnóstico	<i>p</i>
Número de pacientes	30/43 (69,7%)	13/43 (30,2%)	
Sexo (feminino/masculino)	15/15	9/4	0,3
Idade cronológica (anos)	8,6 ± 3,5	8,8 ± 3,6	0,5
Escore Z da altura (CDC)	-2,6 ± 0,9	-2,8 ± 0,5	0,3
Escore Z índice de massa corporal (IMC)	-0,4 ± 1,0	-0,1 ± 1,2	0,2
Escore Z da altura sentada/altura total	0,8 ± 1,2	0,9 ± 1,3	0,4
Pacientes com desproporção corpórea	4 (13,3%)	4 (30,7%)	1,0
Escore Z AS/AT dos pacientes com desproporção corpórea	2,5 ± 0,2	2,7 ± 0,6	0,7
BE familiar	13 (43,3%)	9 (69,2%)	1,0
Escore Z altura alvo	-1,2 ± 0,8	-1,4 ± 1,0	0,2
Idade óssea – idade cronológica	-1,9 ± 1,4	-0,7 ± 1,2	0,007
Z escore de IGF-1	-1,2 ± 1,1	-1,4 ± 0,9	0,5
Pico de GH	8,8 ± 6,3 (n=20)	13,7 ± 7,0 (n=7)	0,4
Em uso de rhGH até o momento	14 (46,6%)	7 (53,8%)	1,0

6 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi estabelecer o diagnóstico molecular numa coorte de pacientes com baixa estatura idiopática através de uma investigação sistemática e sequencial, utilizando um painel customizado de genes. Com essa metodologia, foi possível estabelecer a causa genética da baixa estatura em 10 dos 43 pacientes investigados, o que nos forneceu uma taxa diagnóstica de 23,2%. Oito pacientes que continuaram sem diagnóstico genético foram submetidos a análise de exoma e foi possível diagnosticar 3 deles (37,5%). Levando em consideração a casuística total (n=43), com a abordagem genética por sequenciamento paralelo em larga escala (painel ou exoma) foi possível estabelecer um diagnóstico genético em 13 de 43 pacientes (30,2%), sendo que a abordagem por exoma conferiu um acréscimo de 7% na taxa diagnóstica.

A frequência de diagnóstico observada em nosso estudo foi acima da média relatada em estudos anteriores que usaram uma abordagem de sequenciamento multigênica para avaliar crianças com baixa estatura idiopática (taxa média de diagnóstico de 12,5%, variando de 8,7 a 19,5%; revisado por Sentchordi Montané e col⁷¹). No entanto, vários desses estudos não foram restritos a pacientes com BEI e incluíram pacientes que nasceram PIG, com quadros sindrômicos, distúrbios do neurodesenvolvimento e/ou displasia esquelética. Adicionalmente, dois destes estudos não utilizaram exoma e optaram por analisar um número limitado de genes contidos em um painel (Tabela 10).

Em um importante estudo, Hauer e col.³⁴ avaliaram 200 crianças com baixa estatura por sequenciamento exômico e o diagnóstico genético foi obtido em 19 (14,2%) das 134 crianças inicialmente classificadas como baixa estatura idiopática. Porém, este estudo englobava crianças nascidas PIG ou com características sindrômicas. Em um outro estudo recente, Fan e col.⁷² analisaram 561 pacientes com baixa estatura por exoma. Em um subgrupo de 257 pacientes classificados como tendo baixa estatura isolada devido à ausência de malformação(ões) de órgão associada(s) ou outra evidência clínica de envolvimento multissistêmico, o diagnóstico genético foi obtido em 11,3%. No entanto, entre os resultados positivos, mutações em genes associados com hipopituitarismo, displasia esquelética, doenças crônicas e distúrbios metabólicos foram relatados, tornando improvável que todos os pacientes

investigados tenham preenchido os critérios do BEI⁷². Em outro estudo, Sentchordi-Montané e col.⁷¹ avaliaram 108 crianças com baixa estatura e pequenas anomalias esqueléticas com um painel de genes relacionados a displasia esquelética. Embora a maioria dessas crianças tenham preenchido os critérios para BEI, cerca de um terço nasceu PIG. Além disso, defeitos no *SHOX* foram descartados antes que os pacientes fossem incluídos no estudo. A acurácia diagnóstica foi de 11,1%, considerando apenas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (Tabela 10).

Com objetivo de avaliar a eficácia diagnóstica da abordagem por painel de genes em uma maior coorte de crianças, compilamos esses dados de 43 pacientes com outros 59 pacientes que haviam sido analisados por abordagem pelo mesmo painel de genes para a tese da Mariana Funari⁷³. Em um total de 102 crianças analisadas, foi possível estabelecer o diagnóstico em 17 de 102 crianças, com uma acurácia diagnóstica de 16.7%⁷⁴. Mesmo aumentando o número de pacientes submetidos à mesma análise genética, o rendimento diagnóstico foi semelhante e não houve diferença estatística na comparação entre os dois grupos (10/43 vs 7/59, $p = 0,333$). Estes dados foram recentemente publicados⁷⁴.

Podemos atribuir o maior rendimento diagnóstico de nosso estudo em parte pela análise sistemática de CNVs, que auxiliou no diagnóstico de 4 pacientes (3 deleções do gene *SHOX* e 1 rearranjo envolvendo o gene *ACAM*). Essa análise também incluiu a avaliação do gene *SHOX* e suas regiões regulatórias, cuja haploinsuficiência é uma causa bem conhecida de baixa estatura em pacientes com BEI⁷⁵. Três pacientes tiveram CNVs relacionadas ao gene *SHOX*, correspondendo a 7% da nossa coorte. Além disso, nossa coorte foi enriquecida de casos familiares, o que pode estar associado a uma maior possibilidade de identificar um causa genética autossômica dominante para baixa estatura^{55,76}. Como nosso protocolo não pré-selecionou os pacientes com base na altura dos pais dos pacientes, levantamos a hipótese de que houve um viés de encaminhamento de casos familiares para nosso ambulatório em um centro terciário. Apesar de em nossos dados publicados com 102 crianças a gravidade da baixa estatura (escore Z de altura < -3) ter sido a única variável significativamente associada a uma maior taxa de diagnóstico, neste estudo, envolvendo 43 pacientes, não houve nenhuma variável significativamente associada a uma maior taxa de diagnóstico.

Tabela 10 - Estudos utilizando sequenciamento paralelo em larga escala em pacientes com baixa estatura de causa não definida

Referência	Coorte	Metodologia	Acurácia diagnóstica (total)	Acurácia diagnóstica (BEI)	Discussão
Wang e col. (2013) ³³	192 (14) ¹	Painel de genes contendo 1077 genes	4/192 (2%)	3/14 (21,4%)	Incluiu apenas baixa estatura sindrômica
Guo e col. (2014) ⁷⁷	14 (3) ¹	Exoma	5/14 (35,7%)	0	Apenas genes relacionados a baixa estatura sindrômica
Hattori e col. (2017) ⁷⁸	86 (86) ¹	Painel de genes com apenas 10 genes	18 (20,9%)	18 (20,9%)	Excluiu PIG e crianças sindrômicas
Hauer e col. (2018) ³⁴	200 (13) ¹	Exoma	38/200 (19%)	11/13 (84,6%)	134 crianças inicialmente classificadas como BEI mas incluiu crianças PIG e com características sindrômicas
Freire e col. (2019) ⁶⁶	179 (55) ¹	Painel /exoma	8/55 (14,5%)	8/55 (14,5%)	Incluiu apenas crianças com baixa estatura isolada nascidas PIG
Perchard e col. (2020) ⁷⁹	263 (18) ¹	Painel de genes	27/263 (10%)	5/18 (27,8%)	Incluiu crianças com deficiência de GH e características dismórficas
Fan e col. (2021) ⁷²	561 (257) ¹	Exoma	135/561 (24%)	11.3% (29/257)	Incluiu genes associados com hipopituitarismo, displasia esquelética, doenças crônicas e metabólicas no resultado final do grupo com BEI.
Sentchordi-Montané e col (2021) ⁷¹	108 (108) ¹	Painel de genes	21/108 (19.4%)	12/108 (11.1%)	Painel de displasia esquelética e alterações relacionadas ao gene <i>SHOX</i> foram excluídos. Incluiu também crianças nascidas PIG.
Andrade et al (2022) ⁷⁴	102 (102) ¹	Painel de genes	17/102 (16,7%)	17/102 (16,7%)	Apenas crianças classificadas como BEI

1 Número de pacientes que foram classificados como BEI

A maioria dos defeitos genéticos encontrados em nossa coorte de BEI (80%) foram identificados em genes relacionados à placa de crescimento (*ACAN*, *IHH*, *SHOX*, *NPR2*, *COL2A1*, *FGFR3*), da mesma forma que o encontrado em estudos anteriores^{34,53,66}. Este estudo enfatiza o papel dos defeitos na ossificação endocondral, processo que leva ao fenótipo BEI. Crianças com defeitos nesses genes herdaram o defeito genético de um dos pais com baixa estatura (7 de 10 casos); tinham leve desproporção corpórea (4 de 10) e/ou achados esqueléticos inespecíficos (3 de 10). No entanto, esses achados não permitem uma diferenciação entre pacientes com alterações entre os genes *IHH*, *NPR2*, *ACAN* ou *SHOX*. Além disso, quatro crianças que carregam defeitos em genes relacionados a cartilagem de crescimento tiveram proporção corporal normal e sem achados esqueléticos; e duas crianças com mutações germinativas de novo tiveram pais com altura normal. Assim, dados clínicos e radiológicos podem ser insuficientes para orientar uma abordagem de gene candidato devido a sua não especificidade. Mesmo comparando os grupos de pacientes sem e com diagnóstico genético, não é possível diferenciar estes pacientes pelas suas características clínicas (Tabela 9).

Três crianças apresentaram variantes genéticas relacionadas com a via RAS-MAPK. Todas são mutações de novo, incluindo uma detectada em mosaicismo (paciente 7). Essas crianças podem ter uma apresentação leve de um espectro de fenótipos causados por defeitos nesses genes. Outros estudos utilizando a abordagem genômica em pacientes com baixa estatura também identificaram *NF1* e *PTPN11* mutações em pacientes sem as características clínicas típicas^{33,34,72,79,80}. Esses dados destacam a importância do diagnóstico genético, pois desempenham impacto no acompanhamento clínico e na decisão de iniciar tratamento com hormônio de crescimento.

Três pacientes têm mais de uma alteração genética que explica o fenótipo de baixa estatura. Múltiplos diagnósticos genéticos podem ocorrer entre 1,4-7,2% dos pacientes com distúrbios mendelianos⁸¹. Além disso, dois diagnósticos genéticos não sobrepostos foram descritos anteriormente em pacientes sindrômicos com distúrbios do crescimento^{34,72,82}. O papel exato de cada variante no fenótipo destes pacientes ainda não foi bem estabelecido. No entanto, em um caso dos casos (paciente 7), podemos especular que o fenótipo de baixa estatura mais grave pode ser secundária

a uma segunda alteração em mosaïcismo. Ainda assim, o reconhecimento desta só é possível quando uma abordagem de sequenciamento multigênica é aplicada.

Comparando a frequência diagnóstica do uso de painel versus exoma, ambos são capazes de identificar os genes já descritos relacionados com baixa estatura isolada. Entretanto, apesar da análise por painel permitir uma análise mais detalhada das regiões regulatórias relacionadas ao gene *SHOX*, o exoma trouxe informações adicionais em 3 pacientes (7%), sendo capaz de aumentar a frequência diagnóstica com uma melhor cobertura das regiões exônicas e com benefício adicional de possível reanálise dos dados, o que pode auxiliar na descoberta de novos genes.

Dos pacientes que continuaram sem diagnóstico genético (30 pacientes), pode se justificar provavelmente a um gene ainda não classicamente associado a baixa estatura isolada, a um efeito poligênico ou de herança multifatorial, sendo que este já foi sugerido previamente²². Neste caso, uma casuística maior e a sua comparação com pacientes com altura normal ou até alta estatura poderia permitir uma avaliação genética através de um escore de risco em um contexto poligênico, em que vários polimorfismos contribuiriam para perda de altura em milímetros e que quando combinados, determinariam a altura do indivíduo.

Em resumo, uma abordagem de sequenciamento multigênico é capaz de determinar uma etiologia genética de baixa estatura em até uma em cada 6 crianças com BEI, removendo o termo idiopático de sua classificação clínica⁷⁶. Conhecer a base genética da baixa estatura desses pacientes pode permitir aconselhamento genético preciso e acompanhamento clínico. Este conhecimento é particularmente relevante para crianças portadoras de variantes na via RAS-MAPK. Além disso, o uso da terapia com rhGH na BEI é controverso e, em algum momento, os estudos genéticos podem apoiar o uso dessa terapia. É aceito que crianças com haploinsuficiência *SHOX* melhoram sua altura adulta com terapia de rhGH^{83,84}. Alguns dados preliminares já associaram uma boa resposta a curto prazo ao tratamento com rhGH em pacientes com variantes no *IHH*⁵⁰, *NPR2*⁸⁵ e *ACAN*⁸⁶. O conhecimento da base genética da BEI tem o potencial de desencadear o desenvolvimento de protocolos de tratamento incluindo o uso de rhGH, análogos de peptídeos natriuréticos e/ou moduladores de puberdade. Com base na redução significativa e progressiva dos custos dos estudos genéticos e sua crescente melhora em acurácia diagnóstica,

esperamos chegar ao momento em que essa ferramenta diagnóstica será oferecida rotineiramente na avaliação de crianças com BEI.

7 CONCLUSÃO

- A avaliação genética de crianças com baixa estatura inicialmente classificada como idiopática estabeleceu um diagnóstico etiológico em 23,2% dos pacientes utilizando um painel de genes.
- A análise de exoma aumentou a taxa diagnóstica em 7% (3 pacientes que não haviam sido diagnosticados pelo painel)
- Levando em consideração a casuística total (n=43), a abordagem genética por sequenciamento paralelo em larga escala (painel ou exoma) foi possível determinar uma prevalência de condição monogênica em 30,2% das crianças com baixa estatura inicialmente classificadas como idiopática.

8 ANEXOS

Anexo A - Genes relacionados à “baixa estatura idiopática”: condições monogênicas

A1) Genes relacionados ao eixo GH-IGF1

A1.1) *GH1*

Além da dificuldade inerente em descartar a deficiência de GH em crianças com baixa estatura, o papel das moléculas bioativas de GH tem sido postulado há muito tempo^{87,88}. Mutações específicas no gene *GH1* tornam o GH incapaz de ativar seu receptor, mas mantém sua capacidade em ser detectado por ensaios de dosagem de GH. Poucos pacientes com GH biologicamente inativo foram descritos na literatura⁸⁹⁻⁹². Os pacientes geralmente apresentam baixa estatura pós-natal grave (escore Z de altura < - 3) sem dismorfismos significativos. A avaliação laboratorial desses pacientes demonstrou um pico de GH normal a elevado em testes de estimulação e níveis baixos de IGF-1 e IGFBP-3. A melhora da velocidade de crescimento e o aumento do IGF-1 durante a terapia de curto a longo prazo com rhGH diferencia essas crianças daquelas com insensibilidade ao GH⁹¹. Apesar de representarem uma forma extrema de baixa estatura, esses pacientes podem ser classificados como BEI, e apenas a identificação da variante genética no *GH1* permite a determinação correta da etiologia do distúrbio de crescimento³⁸.

A1.2) *GHR*

Classicamente, mutações bialélicas no receptor de GH (*GHR*) causa insensibilidade completa ao GH (GHI) ou síndrome de Laron, uma inabilidade severa de responder ao GH endógeno ou exógeno, particularmente em relação ao crescimento e efeitos metabólicos⁹³. Pacientes com o fenótipo de GHI clássico tem baixa estatura pós-natal grave, elevação basal e estimulado de GH e níveis extremamente baixos de IGF-1/IGFBP-3 que não aumentam após o uso de rhGH. Estudos nos anos 90 sugeriram que crianças classificadas como portadoras de BEI poderiam ter formas de GHI, com baixos valores de IGF-1 e proteínas ligadoras de GH (GHBP) e valores altos ou na média em 12 horas de GH⁹⁴. Em humanos, GHBP

é gerado e clivado pelo *GHR* encontrado na superfície celular e assim refletiria a expressão deste receptor. Ao longo dos anos, tem ficado claro que a insensibilidade ao GH ocorre em um amplo espectro de gravidade⁹⁵. Em 1994, uma mutação no *GHR* foi relatada pela primeira vez em pacientes classificados como BEI³⁷. Neste estudo, os autores avaliaram o *GHR* em 14 crianças com BEI com baixos valores de GHBP e identificaram três pacientes heterozigotos e outro com variantes heterozigóticas compostas no *GHR*. Seguindo este estudo, vários outros pacientes foram descritos com BEI e variantes heterozigóticas no *GHR*. No entanto, muitas dessas variantes não seriam classificadas como patogênicas sob os critérios atuais para análise de variantes⁷⁰. Como a haploinsuficiência do *GHR* causa uma leve redução na altura (cerca de 4 cm)⁹⁶, apenas variantes com efeito dominante negativo podem ser relacionadas com baixa estatura com herança autossômica dominante⁹⁷.

A1.3) *GHSR*

A grelina é um peptídeo cérebro-intestinal que atua ligando-se ao hormônio receptor de secretagogo de GH (*GHSR*)⁹⁸. Além de sua ação no metabolismo e regulação energética do apetite, esse peptídeo também foi relacionado à formação óssea e à liberação do hormônio do crescimento. A forma ativa do *GHSR* é expressa predominantemente na hipófise e no hipotálamo. Estudos sugerem que a grelina regula a secreção de GH, por meio do *GHSR*, em uma via endócrina distinta do GHRH e da somatostatina e contribui para o controle pulsátil da liberação de GH⁹⁹, com alto grau de atividade constitutiva *in vitro*. Em 2006, Pantel e col. relataram uma variante missense no *GHSR* em duas famílias não relacionadas com baixa estatura, demonstrando que esse defeito resultou na diminuição da expressão do receptor e seletivamente prejudicou a atividade constitutiva do *GHSR*, enquanto preservou a capacidade da resposta à grelina⁴¹. Defeitos homozigóticos e heterozigóticos no gene *GHSR* foram associados com BEI e com deficiência de GH de gravidade e penetrância variáveis. Ambos os fenótipos foram até descritos na mesma família⁴¹. Além disso, defeitos heterozigóticos no *GHSR* foram também relacionados ao atraso constitucional no crescimento e puberdade¹⁰⁰. Essa heterogeneidade na apresentação clínica pode ser parcialmente explicada porque defeitos genéticos podem resultar em alterações que afetam a afinidade de ligação à grelina e a atividade

constitutiva do próprio receptor. Mas o papel das variantes do *GHSR* nos distúrbios do crescimento ainda é motivo de debate.

A1.4) *STAT5B*

O transdutor de sinal e ativador da transcrição 5B (*STAT5B*) é uma importante proteína citoplasmática na via de sinalização *GHR*. *STAT5B* é responsável pelo aumento na expressão de vários genes estimulados pelo *GHR*, como o *IGF1*, sua proteína de ligação (IGFBP-3) e a subunidade ácido lábil (ALS)¹⁰¹. Uma mutação inativadora em homozigose no gene *STAT5B* foi descrito pela primeira vez em 2003, como uma causa rara de insensibilidade ao hormônio do crescimento em paciente com baixa estatura grave e imunodisfunção¹⁰². Indivíduos heterozigotos para mutações de perda de função na *STAT5B* têm um impacto negativo médio de 3,9 cm em sua altura, mas geralmente resultando em estatura dentro da faixa normal¹⁰³. Colaborando com a ideia de um espectro de efeito na altura, em 2018, três mutações em heterozigose na *STAT5B* com efeito dominante-negativo foram descritos em onze indivíduos de três famílias. Os probandos tinham um grau variável de baixa estatura, avaliação laboratorial sugestivo de GHI leve, IgE elevada e eczema⁴⁴. Esses dados fizeram do *STAT5B* um gene que pode ser associado a BEI.

A1.5) *IGF-1* e *IGF1R*

O IGF-1 é essencial no crescimento intrauterino e pós-natal, atuando por meio de um receptor tirosina quinase, *IGF1-R*. Pacientes com mutações homozigóticas de perda de função no *IGF1* ou *IGF1R* têm deficiência de crescimento de início pré-natal, falha de crescimento, microcefalia e atraso no desenvolvimento¹⁰⁴. Enquanto os pacientes com defeitos no *IGF1* têm níveis extremamente baixos de IGF-1, aqueles com defeitos no *IGF1R* mostram uma elevação desse hormônio. Ambos os defeitos genéticos causam altas concentrações de GH basal e estimulado¹⁰⁴. Defeitos em heterozigose no *IGF1* ou *IGF1R* tem uma apresentação clínica muito mais variável. Com o aumento dos casos de defeitos nesses genes, alguns pacientes podem ser rotulados como BEI. Alguns casos de mutações em heterozigose de perda de função no *IGF-1* foram descritas. Esses pacientes tinham um grau variável de retardo de crescimento pré e pós-natal com IGF-1 sérico no limite inferior da faixa normal devido

à haploinsuficiência de IGF1⁴². Embora a maioria dos pacientes se enquadre na classificação de crianças nascidos pequenos para a idade gestacional (PIG) com microcefalia associada, alguns pacientes podem se enquadrar na classificação BEI. Mutações heterozigóticas no *IGF1R* foram mais frequentes do que em seu ligante, mas mostrou ampla variabilidade clínica similar^{105,106}. Alguns pacientes afetados nascem com peso e comprimento no limite inferior, porém dentro dos limites de referência e desenvolvem baixa estatura na infância, com valores basais de IGF-1 normais a elevados, que sobe acima dos valores de referência durante o tratamento com GH^{107,108}. Assim, defeitos heterozigóticos no *IGF1* ou *IGF1R* pode estar presente em crianças classificadas como BEI, sendo mais provável nos casos em que o peso ou comprimento ao nascer está no limite inferior da normalidade.

A1.6) Defeitos no complexo ternário (*IGFALS* e *PAPP-A2*)

A maior parte do IGF-1 circulante é encontrada em um complexo ternário, ligado ao IGFBP-3 e ALS (subunidade ácido lábil). Este complexo é importante para prolongar a meia-vida sérica do IGF-1, diminuindo sua biodisponibilidade no nível tecidual¹⁰⁹. Defeitos homozigóticos ou heterozigóticos compostos no *IGFALS* causam deficiência de subunidade ácido lábil em humanos (ALS). Esta condição causa um fenótipo leve de GHI, caracterizado por moderado comprometimento do crescimento pós-natal, atraso puberal, GH normal ou mesmo aumentado e uma acentuada redução nos níveis de IGF-1 e IGFBP-3, que permanecem baixos após o tratamento com GH^{40,109}. Os portadores heterozigotos de mutações no gene *IGFALS* têm uma deficiência parcial de ALS, resultando em menos de 1,0 DP de perda de altura e geralmente não causando baixa estatura¹¹⁰. Um estudo mostrou que a frequência de variantes raras no *IGFALS* em crianças com BEI é 3 vezes maior do que em controles de altura normal, sugerindo que defeitos na heterozigosidade neste gene podem contribuir para baixa estatura e baixos níveis de IGF-1 em algumas crianças com BEI¹¹¹.

Também relacionada ao complexo ternário, a proteína plasmática A2 associada à gravidez (PAPP A2) é uma protease sérica e tecidual responsável pela proteólise de IGFbps, liberando IGF-1 do complexo ternário¹¹². PAPP-A2 cliva especificamente IGFBP-3 e -5, então a perda da função PAPP-A2 leva ao aumento das concentrações séricas de IGFBP-3, IGFBP-5, e concentrações totais de IGF-1, diminuindo o IGF-1

bioativo. Até agora, poucas famílias com mutações homozigóticas em perda de função no PAPP2 foram descritas^{43,113}. Além de um grau variável de baixa estatura, alguns pacientes tinham microcefalia, ossos longos finos, ossos com baixa densidade mineral e resistência à insulina. Eles também apresentaram níveis acentuadamente elevados de concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3. Como os achados clínicos são relativamente inespecíficos, alguns pacientes com defeitos PAPP2 podem ser classificados como BEI se uma análise mais detalhada da avaliação hormonal não é realizada¹¹².

A2) Genes relacionados a cartilagem de crescimento

A2.1) *SHOX*

SHOX está localizado na região pseudoautossômica dos cromossomos sexuais e é expresso em condrócitos hipertróficos na placa de crescimento. O *SHOX* é um fator de transcrição que aumenta o NPPB e inibe a expressão do FGFR3, estimulando e coordenando a proliferação e diferenciação dos condrócitos. Também tem papel importante na síntese da matriz da cartilagem de crescimento por meio da interação com o trio SOX (genes SOX9, SOX5 e SOX6)²⁵. Desde sua primeira descrição em 1997, a haploinsuficiência do gene *SHOX* tornou-se a principal causa monogênica de baixa estatura (1-10% dos casos não sindrômicos de baixa estatura)^{25,47}. Sabe-se que defeitos nesse gene compreendem uma enorme variabilidade fenotípica, desde a baixa estatura isolada com ou sem desproporção corporal leve até a discondrosteose de Leri-Weill (DLW), uma displasia esquelética caracterizada por mesomelia e deformidade de Madelung¹¹⁴. Apesar de reconhecida, sua variabilidade fenotípica ainda precisa ser melhor compreendida. A maioria dos defeitos genéticos relacionados ao gene *SHOX* (> 70%) são deleções envolvendo todo o gene ou suas regiões reguladoras. Embora a correlação genótipo-fenótipo ainda seja uma questão de debate, deleções em regiões de enhancers do *SHOX* têm sido associadas a um fenótipo mais leve (grau variável de baixa estatura, com desproporções corporais mais leves e ausência de deformidade de Madelung)⁶⁵. O comprometimento do crescimento na haploinsuficiência *SHOX* é variável, mas estudos de acompanhamento longitudinais sugerem a presença de retardo de crescimento no início da vida com comprimento ao nascer na faixa inferior da

normalidade, crescimento pré-púbere relativamente bem preservado, com estirão de crescimento puberal atenuado e frequente estatura adulta baixa. A perda do potencial de crescimento observada nesses pacientes sugere um efeito adicional dos estrogênios na presença de defeitos *SHOX*, que levam à fusão prematura da placa de crescimento. Alguns estudos sugerem que a terapia com hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) (com ou sem tratamento com análogo de GnRH) pode melhorar a altura adulta de pacientes com haploinsuficiência *SHOX* em até 1 SDS de altura^{83,84,115,116}.

A2.2) *NPR2* e *NPPC*

Nos últimos 10 anos, o sistema do peptídeo natriurético tipo C (CNP) e seu receptor (NPR-B), codificados pelos genes *NPPC* e *NPR2*, respectivamente, foram identificados como importantes reguladores do processo de ossificação endocondral. O sistema CNP/NPR-B estimula a proliferação e diferenciação de condrócitos e a síntese da matriz da placa de crescimento de forma autócrina e parácrina. Essa ação é parcialmente explicada pela inibição da via do FGFR3. Apenas duas famílias, com fenótipo de baixa estatura e mãos pequenas, foram descritas com mutações heterozigóticas no *NPPC*⁵¹. Em contraste, foram descritas numerosas descrições de pacientes com defeitos homozigóticos no *NPR2*. Mutações bialélicas no *NPR2* levam à displasia acromesomelica tipo Maroteaux, uma displasia esquelética caracterizada por baixa estatura com mesomelia severa e anormalidades em falanges e metacarpos¹¹⁷. Mutações heterozigóticas no *NPR2* foram descritas em coortes de crianças com baixa estatura idiopática (frequência variando de 1,8-13,6%)¹¹⁰. Esses pacientes têm um grau variável de déficit de altura e baixa estatura progressiva com perda crescente do potencial estatural com a idade¹¹⁸. Além da baixa estatura, os pacientes também podem apresentar desproporção corporal leve e achados esqueléticos inespecíficos, como metacarpos curtos^{48,119}. O tratamento com rhGH promove ganho de altura a curto prazo, mas dados sobre a altura final em pacientes tratados ainda não estão disponíveis⁸⁵.

A2.3) *ACAN*

O aggrecan, codificado pelo gene *ACAN*, é o principal componente proteoglicano da matriz extracelular da placa de crescimento e da cartilagem articular. Defeitos bialélicos no *ACAN* causam displasia espondiloepimetáfisária, enquanto alterações em heterozigose correspondem por um fenótipo menos grave e mais variável²⁷. Desde 2014, mais de 100 variantes foram descritas no gene *ACAN*^{49,86,120-122}. Geralmente, esses pacientes têm uma baixa estatura proporcional severa a leve com idade óssea avançada no período pré-púbere, o que leva à parada prematura do crescimento após o início da puberdade, causando um déficit na altura adulta. A maturação prematura de condrócitos hipertróficos e a invasão precoce da placa de crescimento por vasos sanguíneos e osteoblastos são mecanismos propostos para idade óssea avançada, fusão epifisária precoce e parada prematura do crescimento em pacientes com mutações *ACAN*⁴⁹. Apesar de ser uma característica marcante, não é encontrada em todos os pacientes¹²³. Devido à sua presença na cartilagem articular, os pacientes também podem apresentar osteoartrite de início precoce, mais comum na quarta década de vida, afetando principalmente os joelhos, com grau de gravidade variável¹²². Os poucos dados sobre padrões de crescimento mostram que o estirão puberal pode ser prejudicado devido ao avanço da idade óssea e levar a uma baixa estatura adulta. Assim, esses pacientes poderiam se beneficiar do bloqueio da puberdade e da terapia com rhGH^{86,124}.

A2.4) *IHH*

O gene Indian hedgehog (*IHH*) é expresso nos condrócitos pré-hipertróficos da cartilagem e coordena a proliferação e diferenciação dos condrócitos durante o desenvolvimento ósseo endocondral⁵⁰. Defeitos no gene *IHH* já foram reconhecidos como causa de displasias esqueléticas em homozigose (displasia acrocapitofemoral) e em heterozigose (braquidactilia tipo A1, BDA1)¹¹⁷. Mais recentemente, mutações heterozigóticas do *IHH* têm sido relatadas como uma causa muito frequente de baixa estatura (frequência de 3,4%), com leve desproporção corporal e anormalidades esqueléticas inespecíficas, como Braquimesofalangia-V (BMP-V, encurtamento da falange do quinto dedo em grau variável). Apesar de frequente na população geral (12,1%), o BMP-V foi um achado muito comum (64,3%) em radiografias de mão de indivíduos com mutações heterozigóticas no *IHH*¹²⁵. Enquanto as mutações *IHH* responsáveis por BDA1 são sempre missense e no mesmo domínio da proteína, as

mutações que causam BEI estão distribuídas ao longo do gene e também podem ser LoF, sugerindo um mecanismo de haploinsuficiência. Boa resposta a curto prazo ao rhGH foi descrita nesses pacientes¹²⁵.

A2.5) *FGFR3*

A via do receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos (*FGFR3*) atua como um regulador negativo da condrogênese da placa de crescimento. Mutações heterozigóticas de ganho de função no *FGFR3* são reconhecidas como causadoras de acondroplasia e hipocondroplasia. A acondroplasia é clinicamente caracterizada por baixa estatura desproporcional grave com rizomelia¹²⁷. Por outro lado, a hipocondroplasia geralmente é menos grave e apresenta maior variabilidade fenotípica¹²⁸. Embora a desproporção corporal seja esperada em pacientes com hipocondroplasia, algumas crianças podem não ser diagnosticadas na primeira avaliação. Essas crianças podem ainda não apresentar achados radiográficos sugestivos de defeito esquelético e/ou podem apresentar uma leve desproporção corporal, que só pode ser reconhecida pela relação altura sentada/altura total. Por isso, muitas vezes são classificados como baixa estatura idiopática, demonstrando o espectro variável do fenótipo¹²⁹. Corroborando essa hipótese, um estudo recente identificou uma mutação ativadora do *FGFR3* causando baixa estatura familiar autossômica proporcional sem outros achados específicos⁵².

A2.6) *COL2A1* e outros genes relacionados ao colágeno

Os colágenos são os principais componentes estruturais da matriz extracelular, sendo o colágeno tipo II o principal colágeno sintetizado pelos condrócitos. Esse tipo de colágeno é encontrado no humor vítreo, orelha interna, núcleo pulposo e principalmente na cartilagem de crescimento, sendo essencial para o processo de ossificação endocondral. Mutações no gene *COL2A1* interferem no agrupamento das moléculas de colágeno tipo II, causando graus variados de displasia esquelética e alguns tipos de distúrbios oculares. Mais de 16 condições sindrômicas foram associadas a defeitos no gene do colágeno²⁸. Alguns destes podem apresentar baixa estatura e alterações esqueléticas inespecíficas. No entanto, devido à grande variabilidade e fenótipo sobreposto, principalmente em distúrbios relacionados a

COL2A1, *COL11A1* e *COL11A2*, algumas mutações nos genes do colágeno já foram relatadas em coortes de BEI^{29,71,80,130,131}. Em um estudo recente, Plachy e col. encontraram 9 variantes dos genes do colágeno (*COL2A1*, *COL11A1*) em 17 pacientes (11,5%) em uma coorte de baixa estatura familiar que foram tratados com hormônio de crescimento, reforçando o papel desses genes nas causas genéticas de baixa estatura geralmente classificada como idiopática⁵³.

A2.7) *LTPB3*

Os fatores transformadores de crescimento (TGFs) beta-1 (190180), beta-2 (190220), beta-3 (190230) e outros têm efeitos estimuladores e inibitórios sobre o crescimento de diferentes tipos de células e desempenham um papel na produção e degradação da matriz extracelular¹³². Os achados sugerem um papel importante para a transcrição mediada por *LTPB3* no desenvolvimento do esqueleto axial, causando um quadro de displasia esquelética. As displasias acromélicas são um grupo de displasias esqueléticas caracterizadas por baixa estatura, braquidactilia, flexão limitada das articulações e espessamento da pele. O grupo inclui a displasia acromicrica (DA) (MIM102370), displasia geleofísica (DG) (MIM614185, MIM231050), síndrome de Myhre (MIM139210) e síndrome de Weill-Marchesani (MIM277600, MIM608328, MIM614819). Essas condições se sobrepõem radiologicamente, com encurtamento de ossos tubulares, braquidactilia, idade óssea atrasada e epífises cônicas. No entanto, eles também podem ter características clínicas distintas e genética heterogênea¹³³⁻¹³⁵. Apesar de ser um gene com ampla descrição em displasias esqueléticas, temos encontrado um crescente número de variantes raras neste gene em crianças com um fenótipo mais leve classificadas como BEI. Estes pacientes apresentam geralmente apenas baixa estatura, com ou sem leve desproporção corpórea, sem outros achados esqueléticos, se tornando então um possível novo gene candidato associado a BEI.

A2.8) *ERF*

Os membros da família ETS são fatores de transcrição, como *ERF*, que regulam a proliferação e diferenciação celular. Mutações no gene *ERF*, que codifica o fator repressor ETS2, são responsáveis por duas condições distintas: Síndrome

Chitayat (OMIM 617180) e Craniossinostose tipo 4 (OMIM 600775) com heranças autossômico dominante¹³⁶. A descrição dos casos de craniossinostose não engloba pacientes com baixa estatura, entretando, na síndrome de Chitayat, além do hiperfalangismo, fâcies características com hipertelorismo ocular e hálux valgo, há relato de casos de mais de um paciente com parâmetros de crescimento entre percentil 5-10, o que sugere que esta síndrome também está relacionada a baixa estatura¹³⁷. Apesar de ainda não haver descrição de casos de baixa estatura isolada por este gene, possivelmente pacientes que possuem um espectro fenotípico mais leve, poderia ser classificado como baixa estatura idiopática, da mesma forma que outras condições sindrômicas, tais como a Síndrome de Noonan.

A3) Genes relacionados a via RAS-MAPK

A3.1) *PTPN11*

O gene proteína tirosina fosfatase não receptora Tipo 11 (*PTPN11*) codifica a proteína tirosina fosfatase 2 (SHP2) contendo o domínio não receptor Src-homologia 2 (SH2). SHP2 participa de múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo a cascata Ras/MAPK. Mutações heterozigóticas no *PTPN11* causam a síndrome de Noonan (SN), caracterizada por crescimento pós-natal reduzido, cardiopatia congênita e dismorfismos faciais¹³⁸. Normalmente, as crianças também podem apresentar níveis séricos baixos de IGF-1, o que reflete algum grau de insensibilidade ao GH⁵⁶. Embora a maioria das crianças portadoras de variantes no *PTPN11* apresente algumas características clínicas da síndrome de Noonan, há uma ampla variabilidade na apresentação clínica, mesmo em pacientes com a mesma variante genética¹²⁰. Além disso, algumas mutações têm um efeito menos intenso (hipomórfico) e, portanto, um fenótipo mais discreto¹³⁹. Com base nisso, variantes no *PTPN11* têm sido cada vez mais descritas em estudos avaliando múltiplos genes em BEI, em crianças sem outros critérios clínicos da síndrome de Noonan^{33,55,71,79}. Isso pode ser parcialmente explicado pela importante mudança nas características craniofaciais com a idade, que às vezes pode tornar um diagnóstico clínico de SN desafiador. Crianças com variantes no *PTPN11* na extremidade mais branda do espectro fenotípico da SN também podem ser classificadas como BEI. A identificação de uma variante patogênica no *PTPN11*

em uma criança com baixa estatura isolada tem evidentes impactos no seguimento e tratamento.

A3.2) *NF1*

A neurofibromina 1 (*NF1*) é um gene relacionado à via RAS-MAPK que codifica a neurofibromina, uma proteína ativadora da guanosina trifosfatase (GTPase) específica do RAS que converte o RAS ligado ao GTP ativo em RAS ligado ao GDP inativo. A inativação da neurofibromina leva à hiperativação do SRA e contribui por meio de outros mediadores para a proliferação celular e do crescimento, relacionada à formação de tumores. A apresentação clássica de pacientes portadores de variantes no gene *NF1* inclui manchas café com leite, neurofibromas cutâneos e/ou plexiformes e nódulos de Lisch na íris. Deficiência intelectual, vasculopatias, gliomas ópticos, risco aumentado de tumores do sistema nervoso e baixa estatura podem estar presentes, o que muitas vezes pode sugerir um fenótipo semelhante a Noonan¹⁴⁰. Devido à mesma variabilidade fenotípica e ao fato de que as características clínicas podem mudar durante a infância, variantes no *NF1* foram encontradas em coortes de crianças com BEI, tornando-se um gene a ser incluído na investigação genética de pacientes com fenótipo isolado⁵⁵. Além disso, esses dados destacam a importância do diagnóstico genético, pois tem grande impacto no acompanhamento clínico, bem como na decisão de iniciar a terapia com hormônio de crescimento nesses pacientes.

A3.3) *CBL*

O *CBL* (Casitas B-cell lymphoma), é uma E3 ubiquitina-proteína ligase envolvida na sinalização celular e ubiquitinação de proteínas na via RAS-MAPK. O *CBL* controla a sinalização proliferativa regulando negativamente do receptor do fator de crescimento. Variantes missense no gene *CBL* já foram associadas à leucemia mielóide aguda, várias outras neoplasias mieloproliferativas e leucemia mielomonocítica juvenil (LMJ)¹⁴¹. Este mesmo quadro, também foi associado a outras RASopatias como Neurofibromatose tipo 1 e Síndrome de Noonan¹⁴². Estudos sugerem que mutações constitucionais no *CBL* levam a uma constelação de defeitos do desenvolvimento leves e variáveis e predisposição para LMJ, que poderia ser descrito provisoriamente “síndrome *CBL*”¹⁴³. Nem todas as crianças descritas

apresentam o quadro hematológico e a gravidade e risco de recidiva já tem algumas descrições de correlações genótipo-fenótipo¹⁴⁴. Já a correlação relacionando a baixa estatura ainda não se encontra totalmente estabelecido na literatura, variando entre crianças com ou sem baixa estatura, com diferentes graus de gravidade em relação ao crescimento^{142,144}.

Anexo B - Modelo de formulário implantado em plataforma digital para recrutamento da casuística

Identificação do médico responsável:

Nome:

Instituição:

Telefone:

Email:

Identificação do paciente

Nome:

Registro da instituição:

Data de Nascimento:

Sexo () masculino / () feminino

Dados antropométricos atuais

Data: ___ / ___ / ___

Idade cronológica na avaliação _____ (anos e meses)

Peso: ___ (kg) Altura _____ (cm) Altura sentada _____ (cm)

Envergadura _____ (cm)

Perímetro cefálico _____ (cm)

Estádio puberal: _____

Dismorfismos: () ausentes () presentes * Se presentes, descrição:

Antecedentes:

Idade gestacional: _____ (>37 sem) Peso ao nascer: ___ (g) Comprimento ao nascer ___ (cm)

Perímetro cefálico: _____ (cm) APGAR:

Intercorrências neonatais: () ausentes () presentes * Se presentes, descrição:

Doenças prévias ou atuais significantes () ausentes () presentes * Se presentes, descrição: _____

Uso de glicocorticoide () nunca () uso crônico (> 6 meses) atual ou no passado *
Se positivo descrever: _____

DNPM: () adequado () atrasado * Se atrasado descrição:

Análise laboratorial inicial:

	Normal	Alterado	Se alterado descreva
Hemograma			
PCR/VHS			
Uréia			
Creatinina			
TSH			
TGO			
TGP			
IGF-1			
Pico de GH			
Albumina			
Ferritina			
Gasometria venosa			
Sódio			
Potássio			
Cálcio			
Fósforo			
Fosfatase alcalina			
Dça Celíaca			

Rx de mãos e punhos

Data da realização:

Idade óssea:

Achados na radiografia:

Avaliação de familiares:

Consanguinidade dos pais ()sim ()não

História de baixa estatura de demais membros da família com baixa estatura: ()
sim () não

Altura do pai: _____ (cm) Peso _____ (Kg) Altura sentada _____ (cm)
 Envergadura _____ (cm)

Altura da mãe: _____ (cm) Peso _____ (Kg) Altura sentada _____ (cm)
 Envergadura _____ (cm)

Irmãos:

1) Altura _____ (cm) Peso _____ (Kg) Altura sentada _____ (cm)
 Envergadura _____ (cm)

2) Altura _____ (cm) Peso _____ (Kg) Altura sentada _____ (cm)
 Envergadura _____ (cm)

3) Altura _____ (cm) Peso _____ (Kg) Altura sentada _____ (cm)
 Envergadura _____ (cm)

Observações complementares:

Orientações complementares:

Orientações quanto a presença de dismorfismos ou malformações:

NÃO PREENCHE CRITÉRIO PARA O ESTUDO :

- PACIENTES QUE TIVEREM DISMORFISMOS MAIORES.
- PACIENTES COM MAIS DE 3 DISMORFISMOS MENORES.

Dismorfismos maiores: aqueles que não são comumente observados na população geral e/ou que ocasiona significativa problema de saúde.

Exemplos de anomalias maiores isolados:

Anencefalia	Cardiopatía congênita	Luxação congênita do quadril
Fenda labial	Estenose pilórica	Pé torto
Fenda palatina	Mielomeningocele	
Fissura palatina	Hidrocefalia	

Dismorfismos menores: aqueles que são de pouca importância clínica. Como regra, cada um é encontrado em menos de 4% dos indivíduos normais. Um único defeito menor pode ser diagnosticado em até 13% dos recém-nascidos, dependendo do observador. Menos de 1% dos bebês normais têm duas anomalias menores não relacionadas, e talvez 1 em 2000 tenha três. Embora geralmente não tenham

significado clínico para o paciente, podem ser úteis pistas diagnósticas, especialmente quando várias são encontradas no mesmo paciente. A maioria dos bebês com três ou mais anomalias menores tem uma síndrome dismórfica.

Exemplos de anomalias menores comuns:

<p>Crânio</p> <p>Forame parietal Bossa parietal Testa proeminente</p>	<p>Pescoço</p> <p>Remanescentes do arco branquial</p>	<p>Pele</p> <p>Nevos pigmentados isolados Nevos vasculares pequenos Proeminência sacral</p>
<p>Orelhas</p> <p>Fenda pré auricular Apêndices préauriculares Anomalias da cartilagem auricular</p>	<p>Peitoral</p> <p>Mamilos supranumerários</p>	<p>Cabelo</p> <p>Linha posterior dos cabelos invertida Nascimento dos cabelos em espiral Anomalias da haste capilar (Cabelo "elétrico") "Topete" branco (cabelo logo acima da testa)</p>
<p>Olhos</p> <p>Heterocromia da íris Coloboma da íris</p>	<p>Abdome</p> <p>Artéria umbilical única Hérnia umbilical</p>	<p>Unhas</p> <p>Baqueteamento digital Ranhuras</p>
<p>Nariz</p> <p>Columela curta Ponta nasal bulbosa</p>	<p>Genitália</p> <p>Aderências labiais Hidrocele Hipospádia leve Criptorquidia</p>	<p>Articulações</p> <p>Genu varo</p>
<p>Zona perioral</p> <p>Fenda medial achatada Contorno labial avermelhado Fossetas da comissura labial</p>	<p>Ânus e períneo</p> <p>Protuberâncias no canal anal Estenose anal</p>	<p>Mãos</p> <p>Clinodactilia de quintos dedos Sindactilia</p>

Boca	Costas	Pés
Cavidades palatinas Torus palatino Incisivos laterais hipoplásicos Frênulo da língua curto	Fosseta sacral	Sindactilia Quarto metatarso curto

Anexo C – Lista dos genes presentes no painel de baixa estatura versão 2

<i>ACAN</i>	<i>FGF8</i>	<i>IGF2BP2</i>	<i>OBSL1</i>	<i>SHOC2</i>
<i>ADAMTS10</i>	<i>FGFR1</i>	<i>IGFALS</i>	<i>OTX2</i>	<i>SHOX</i>
<i>ADAMTS17</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IGSF1</i>	<i>PAPPA2</i>	<i>SHOX2</i>
<i>ARNT2</i>	<i>GDF5</i>	<i>IGSF10</i>	<i>PAX6</i>	<i>SIX3</i>
<i>BMP2</i>	<i>GH1</i>	<i>IHH</i>	<i>PITX2</i>	<i>SMO</i>
<i>BMPR1B</i>	<i>GHR</i>	<i>KAL1</i>	<i>PNPLA6</i>	<i>SOS1</i>
<i>BRAF</i>	<i>GHRH</i>	<i>KMT2D</i>	<i>POU1F1</i>	<i>SOS2</i>
<i>CBL</i>	<i>GHRHR</i>	<i>KRAS</i>	<i>PRKG2</i>	<i>SOX2</i>
<i>CCDC53</i>	<i>GHSR</i>	<i>LHX3</i>	<i>PROKR2</i>	<i>SOX3</i>
<i>CCDC8</i>	<i>GLI2</i>	<i>LHX4</i>	<i>PROP1</i>	<i>SOX5</i>
<i>CDH2</i>	<i>GNAS</i>	<i>LZTR1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SOX6</i>
<i>CDON</i>	<i>GPR161</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SOX9</i>
<i>COL2A1</i>	<i>HDAC6</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>RAB3IP</i>	<i>SRCAP</i>
<i>COMP</i>	<i>HESX1</i>	<i>MEF2C</i>	<i>RAF1</i>	<i>STAT5B</i>
<i>CREBBP</i>	<i>HHIP</i>	<i>NF1</i>	<i>RASA2</i>	<i>TCF7L1</i>
<i>CUL7</i>	<i>HMGA2</i>	<i>NPPB</i>	<i>RIT1</i>	<i>TGIF1</i>
<i>DGCR8</i>	<i>HOXA9</i>	<i>NPPC</i>	<i>RNPC3</i>	<i>WNT5A</i>
<i>DMXL2</i>	<i>HRAS</i>	<i>NPR2</i>	<i>ROR2</i>	<i>ZIC2</i>
<i>EP300</i>	<i>IGF1</i>	<i>NRAS</i>	<i>RUNX2</i>	<i>Regiões regulatórias SHOX</i>
<i>FBN1</i>	<i>IGF1R</i>	<i>NSUN2</i>	<i>SHH</i>	

Anexo D - Endereço dos programas e ferramentas utilizados na análise de bioinformática

Programa/ferramenta	Endereço
Agilent SureDesign 2.0	https://earray.chem.agilent.com/suredesign/
1000 Genomes Project	http://www.internationalgenome.org/
ExAC	http://exac.broadinstitute.org/
ABraOM	http://abraom.ib.usp.br/
dbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
BWA	http://bio-bwa.sourceforge.net/
Annovar	http://www.openbioinformatics.org/annovar/
Freebayes	https://www.msi.umn.edu/sw/freebayes/
IGV	http://software.broadinstitute.org/software/igv/
Sequencher 4.10.1	http://www.genecodes.com/sequencher
Human splicing finder	http://www.umd.be/HSF3/
BDGP splice site prediction	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
CONTRA	http://contra-cnv.sourceforge.net/

Anexo E - Critérios de classificação de patogenicidade dos programas *in silico* utilizados nas filtragens da VCF

Modelo de predição para alteração do sítio de splice			
Ferramenta	Classificação	Critérios patogênicos	Endereço
<i>dbscSNV_ADA_SC ORE e dbscSNV_RF_SCO RE</i>	Entre 0 e 1	≥0,6	https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
Modelo de predição de patogenicidade			
Ferramenta	Classificação	Critérios patogênicos	Endereço
	T: tolerado; D: deletério	D	http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html
<i>CADD</i>	Numérico	≥15	http://cadd.gs.washington.edu/
<i>Mutation Acessor</i>	L: efeito leve; M: moderado; H:alto	M e H	http://mutationassessor.org/
<i>Mutation Taster</i>	N e P: não deletério/ polimorfismo; A e D: deletério	A e D	http://www.mutationtaster.org/
<i>PROVEAN</i>	N: neutro; D: deletério	D	http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php
<i>Polyphen2</i>	B: benigno; P: possivelmente patogênico; D: deletério	P e D	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
<i>FATHMM</i>	T: tolerado; D: deletério	D	http://fathmm.biocompute.org.uk/
Modelo para grau de conservação do aminoácido envolvido			
Ferramenta	Classificação	Critérios patogênicos	Endereço
<i>GERP</i>	Entre -12.3 a 6.17	≥ 2	http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/

Fonte: Adaptado de Richards e colaboradores, 2015⁷⁰.

Anexo F - Critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas quanto à patogenicidade

Critério muito forte para patogenicidade

PVS1 Variante *nonsense*, *frameshift*, em sítios de splice canônicos ± 1 ou 2, códon de iniciação ou deleção de 1 ou vários exons (*null variant*) em um gene no qual variantes com perda de função (*LoF*) são mecanismos conhecidos de doença

Critérios fortes para patogenicidade

PS1 Troca de aminoácido já estabelecida como patogênica, independente da troca do nucleotídeo

PS2 Variante *de novo* em um paciente com doença sem história familiar (com paternidade confirmada)

PS3 Presença de estudos funcionais (*in vitro* ou *in vivo*) bem estabelecidos que suportem o efeito prejudicial no gene ou sua proteína

PS4 A prevalência da variante nos indivíduos afetados é significativamente maior quando comparada com a prevalência em controles

Critérios moderados para patogenicidade

PM1 Variante localizada em uma região *hotspot* para mutações e/ou região importante já estabelecida com um domínio funcional da proteína, sem variantes descritas como benignas

PM2 Variante ausente nos bancos de dados populacionais (*1000Genomes*, *ExAC*) (ou presente em frequência extremamente baixa, para os casos recessivos)

PM3 Variante detectada em *trans* com uma variante patogênica para as doenças recessivas

PM4 Modificação no tamanho da proteína causada por deleções ou inserções *in-frame* em região não repetitiva ou por variantes que perdem o códon de parada (tipo *stop-loss*)

PM5 Nova variante *missense* em um aminoácido em que uma variante *missense* diferente já foi estabelecida como patogênica

PM6 Variante considerada de novo, sem confirmação da paternidade

Critérios moderados para patogenicidade

PP1 Segregação da variante (em um gene conhecido como causador de doença) com a doença em uma família com vários membros afetados

PP2 Variante *missense* em um gene com uma baixa taxa de mutações *missense* benignas e no qual esse tipo de variante é considerado um mecanismo comum de doença

PP3 Várias ferramentas computacionais suportam a evidência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no *splicing* etc)

PP4 O fenótipo do paciente ou a história da família são bastante específicos de uma doença monogênica

PP5 Variante recém-publicada como patogênica, porém o laboratório não apresenta condições de fazer um estudo funcional independente.

Critérios fracos para benignidade

BP1 Variante *missense* em um gene no qual variantes com perda de função (*LoF*) são mecanismos conhecidos de doença

BP2 Variante detectada em *trans* com uma variante patogênica dominante com penetrância completa ou observada em *cis* com uma variante patogênica em qualquer tipo de herança

BP3 Deleções ou inserções *in-frame* em região repetitiva sem função conhecida

BP4 Várias ferramentas computacionais sugerindo ausência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no *splicing* etc)

BP5 Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para doença

BP6 Variante recém-publicada como benigna, porém o laboratório não apresenta condições de fazer um estudo funcional independente.

BP7 Variante sinônima cujas ferramentas de predição de *splicing* não predizem impacto na sequência consenso de *splice* nem a criação de um novo sítio, e o nucleotídeo não é conservado

Critérios fortes para benignidade

BS1	A frequência do alelo é maior que a esperada para a doença
BS2	Variante para doença recessiva (em homozigose), dominante (em heterozigose) ou ligada ao X (hemizigose), com penetrância completa e de início precoce, observada em indivíduo adulto saudável
BS3	Presença de estudos funcionais (<i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>) bem estabelecidos mostrando ausência de efeito prejudicial para a proteína ou <i>splicing</i>
BS4	Ausência de segregação nos indivíduos afetados da família

Critério benigno por si só

BA1	Frequência alélica maior que 5% nos bancos de dados populacionais (<i>1000Genomes</i> , ExAC)
------------	--

Fonte: Adaptado de Richards e colaboradores, 2015⁷⁰. PVS: critério muito forte para patogenicidade; PS: critério forte para patogenicidade; PM: critério moderado para patogenicidade; PP: critério fraco para patogenicidade; BA: critério benigno por si só; BS: critério forte para benignidade; BP: critério fraco para benignidade. Lof: perda de função (de loss of function); 1000Genomes:1000Genomes Project; ExAC: Exome Aggregation Consortium

Anexo G – Normas para combinação dos critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas identificadas

Classificação	Combinação dos critérios
Variante patogênica	(I) 1 critério muito forte para patogenicidade (PVS1) e (a) ≥ 1 critérios fortes para patogenicidade (PS1-PS4) ou (b) ≥ 2 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) ou (c) 1 critério moderado para patogenicidade (PM1-PM6) e 1 critério fraco para patogenicidade (PP1-PP5) ou (d) ≥ 2 PP (PP1-PP5) (II) ≥ 2 critérios fortes para patogenicidade (PS1-PS4) ou (III) 1 critério forte para patogenicidade (PS1-PS4) e (a) ≥ 3 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) ou (b) 2 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 2 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5) ou (c) 1 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 4 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5)
Variante provavelmente patogênica	(I) 1 critério muito forte para patogenicidade (PVS1) e 1 critério moderado para patogenicidade (PM1-PM6) ou (II) 1 critério forte para patogenicidade (PS1-PS4) e 1 ou 2 critérios moderado para patogenicidade (PM1-PM6) ou (III) 1 critério forte para patogenicidade (PS1-PS4) e ≥ 2 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5) ou (IV) ≥ 3 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) ou (V) 2 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 2 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5) ou (VI) 1 critério moderado para patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 4 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5)
Variante benigna	(I) 1 critério benigno por si só (BA1) ou (II) ≥ 2 critérios fortes para benignidade (BS1-BS4)
Variante provavelmente benigna	(I) 1 critério forte para benignidade (BS1-BS4) e 1 critério fraco para benignidade (BP1-BP7) ou (II) ≥ 2 critérios fracos para benignidade (BP1-BP7)
Variante de significado incerto	(I) outra combinação de critérios não mencionada acima ou (II) critérios para benignidade e patogenicidade contraditórios

Fonte: Adaptado de Richards e colaboradores, 2015⁷⁰. PVS: critério muito forte para patogenicidade; PS: critério forte para patogenicidade; PM: critério moderado para patogenicidade; PP: critério fraco para patogenicidade; BP: critério fraco para benignidade; BS: critério forte para benignidade; BA: critério benigno por si só.

Anexo H – Detalhamento dos pacientes portadores de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas associadas com baixa estatura idiopática

H1) Paciente 1: Gene *ACAN* e *SHOX*

Este achado foi encontrado em uma menina, encaminhada do Rio de Janeiro. Ela iniciou acompanhamento aos 5 anos e 4 meses, já em uso de hormônio de crescimento desde os 2 anos e 4 meses de idade. Na avaliação clínica, apresentava baixa estatura proporcional e avanço de idade óssea notado desde o início do acompanhamento, durante período pré puberal. A variante do gene *ACAN* foi vista pelo painel e a do gene *SHOX* visualizada pelo CONTRA e pelo IGV. Ambas as variantes foram segregadas e ambas vindas do pai, também com baixa estatura proporcional. Não foi possível expandir a avaliação na família pois ele é adotado.

Tabela 11 - Características clínicas do paciente 1

Paciente 1	
Altura do pai (cm; Z)	160; -2,2
Altura da mãe (cm; Z)	154; -1,4
História de consanguinidade	Não
Outros membros da família com baixa estatura	Não
Sexo	Feminino
Idade gestacional (semanas)	38
Peso ao nascimento (g; Z)	3065; -0,2
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	46; -2,1
Idade cronológica (anos)	5,4
Idade óssea (anos)	7,6
Altura (cm; Z)	100,6; -2,2
Envergadura (cm)	NR
Z da altura sentada/altura total	-0.9
Z do perímetro cefálico	2,3
IMC (kg/m²; Z)	14,6; 0,7
IGF-1 (ng/ml; Z)	40,2; -2,33 ^a
Pico de GH	Não realizado
Achados adicionais	Avanço de idade óssea

^aMedida realizada aos 2 anos e 4 meses antes de iniciar tratamento com rhGH.

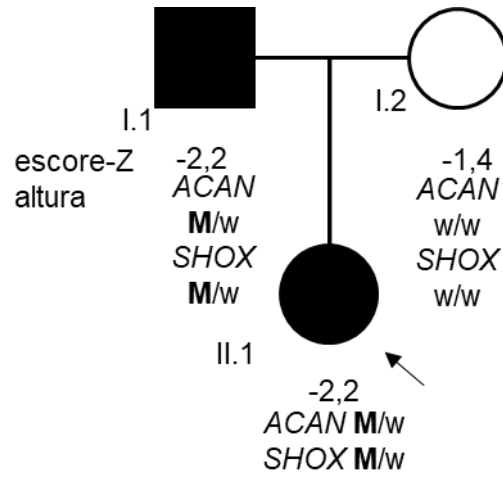


Figura 8 - Heredograma família paciente 1

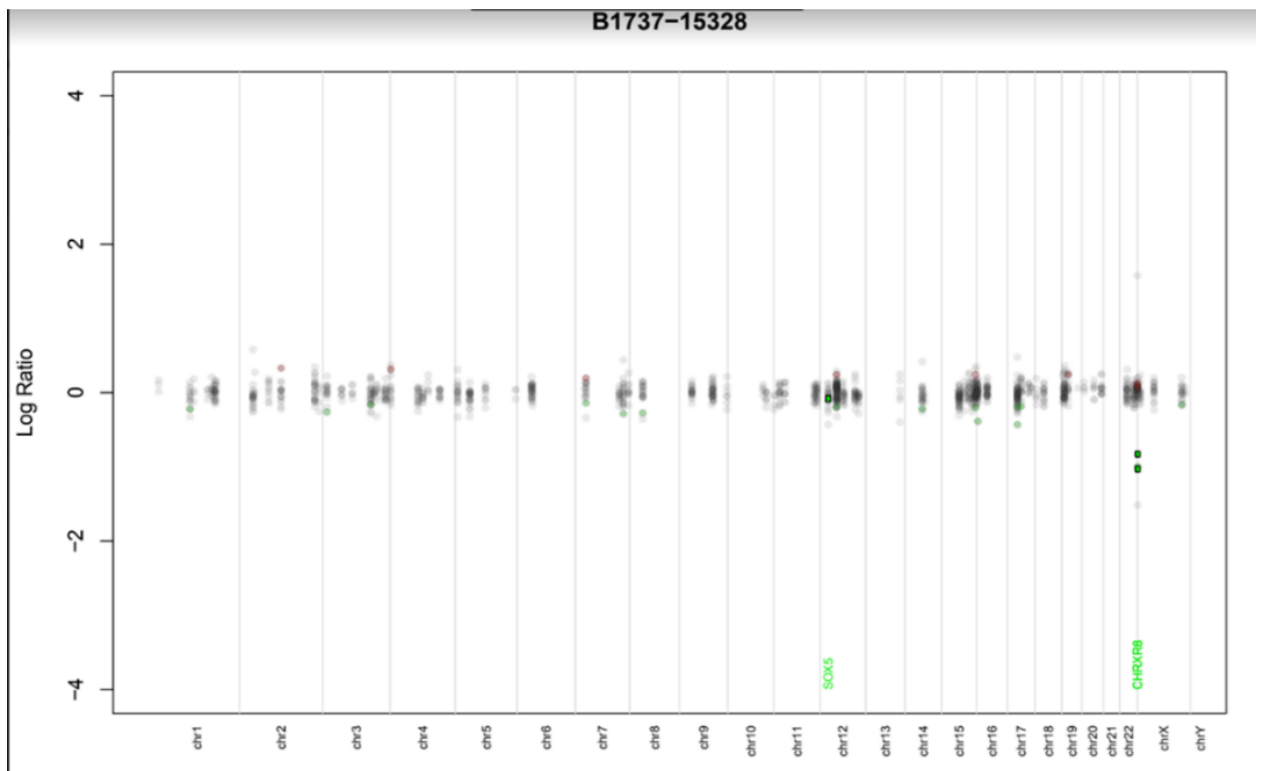


Figura 9 - Deleção em região regulatória do gene *SHOX* visualizada pelo CONTRA

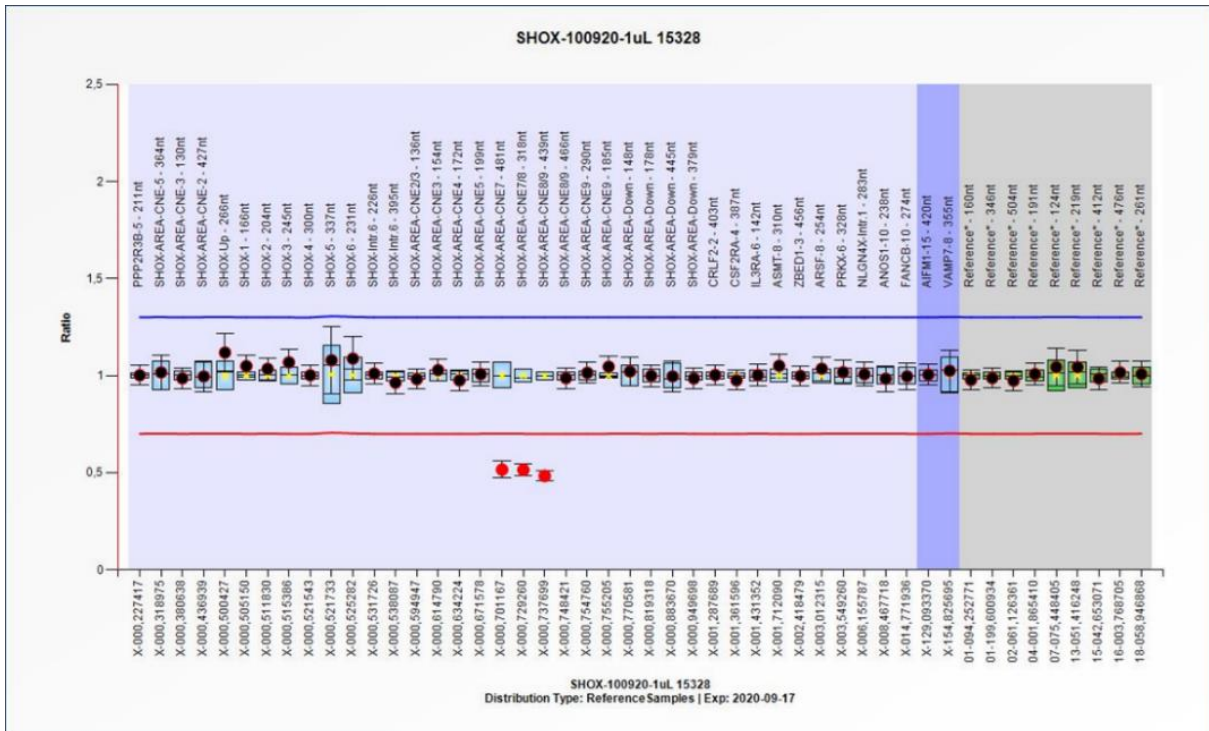


Figura 10 - Confirmação por MLPA da deleção de 3 sondas da região regulatória do gene *SHOX*

H2) Paciente 2: Gene *IHH*

Este achado foi encontrado em um menino, encaminhado de um serviço de referência de São Paulo. Na avaliação, apresentava baixa estatura desproporcional e raio X de idade óssea com encurtamento da falange média do 5º dedo associado a epífises cônicas. A variante foi segregada nos pais e foi herdada da mãe de altura normal. Após este achado, expandimos a análise com a segregação da variante na família e foi identificada que a variante foi um achado de novo na mãe.



Figura 11 - Radiografia de idade óssea do paciente 2 demonstrando encurtamento da falange média do 5º dedo associado a epífises cônicas

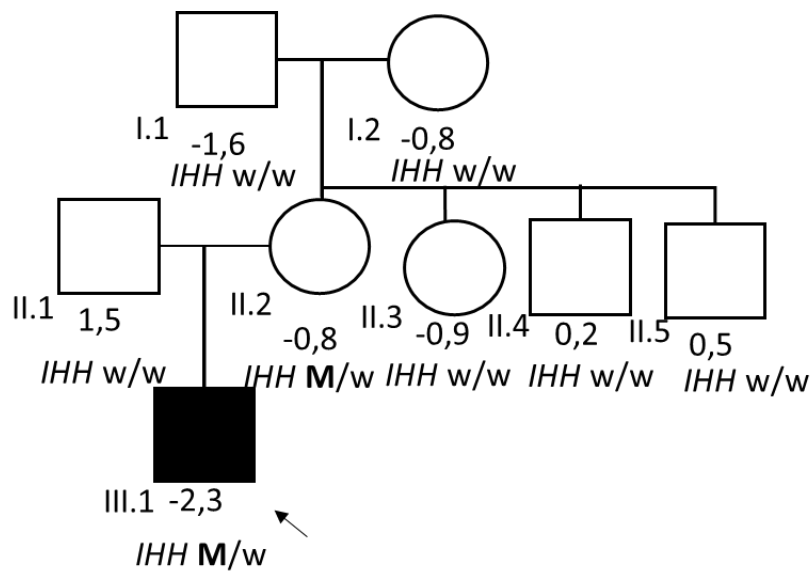


Figura 12 - Heredograma com a segregação da variante no gene *IHH* na família do paciente 2

Tabela 12 – Características clínicas do paciente 2

Paciente 2	
Sexo	Masculino
Idade cronológica (anos)	4,0
Idade óssea (anos)	3,0
Altura (cm; Z)	89,3; -3,1
Envergadura (cm)	83
Z da altura sentada/altura total	2,0
Z do perímetro cefálico	0,75
IMC (kg/m²; Z)	16,3; 0,6
Idade gestacional (semanas)	39,0
Peso ao nascimento (g; Z)	3480; 0,3
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	50; -0,4
Altura do pai (cm; Z)	185;1,5
Altura da mãe (cm; Z)	157,4; -0,9
História de consanguinidade	Não
Outros membros da família com baixa estatura	Não
IGF-1 (ng/mL; Z)	107; 0
Pico de GH	9,7
Achados adicionais	mãos pequenas, fronte proeminente, leve rizomelia

H3) Paciente 3: Gene *NPR2*

Este achado foi encontrado em um menino, encaminhado de serviço de referência do estado de São Paulo. Apresentava baixa estatura proporcionada. A variante no gene *NPR2* foi segregada nos pais e a variante encontrada foi de novo.

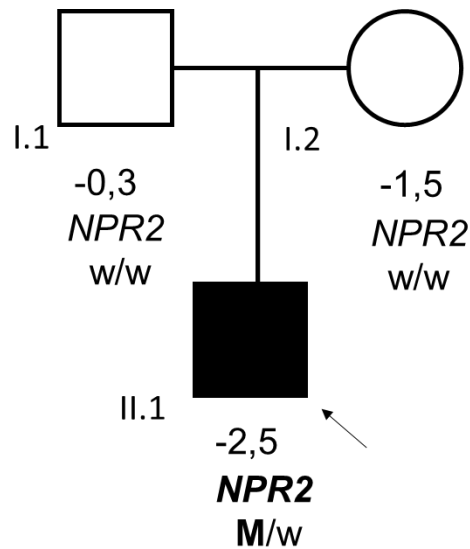


Figura 13 - Heredograma com a segregação da variante no gene *NPR2* na família do paciente 3

Tabela 13 - Características clínicas do paciente 3

Paciente 3	
Sexo	Masculino
Idade cronológica (anos)	4,8
Idade óssea (anos)	3,2; -1,6
Altura (cm; Z)	96; -2,5
Envergadura (cm)	86,5
Z da altura sentada/altura total	0,7
Z do perímetro cefálico	-0,21
IMC (kg/m²; Z)	15,4; 0
Idade gestacional (semanas)	38
Peso ao nascimento (g; Z)	2600; -1,3
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	47; -1,6
Altura do pai (cm; Z)	173; -0,3
Altura da mãe (cm; Z)	153,3; -1,5
História de consanguinidade	não
Outros membros da família com baixa estatura	não
IGF-1 (ng/mL; Z)	72; -1,7
Pico de GH	29,7
Achados adicionais	orelhas discretamente proeminentes

H4) Paciente 4: Gene *CBL* e *SHOX*

Estes achados foram encontrados em um menino encaminhado de serviço de referência de Minas Gerais. Apresentava baixa estatura severa (escore Z altura -3,2) proporcionada. A variante do gene *CBL* é uma variante de novo. A variante do gene *SHOX* foi herdada da mãe também baixa, sem desproporção corpórea e sem deformidade de Madelung. Esta mesma deleção relacionada ao gene *SHOX* também está presente na avó materna que não tem baixa estatura, desproporção corpórea ou deformidade de Madelung. Adicionalmente, foi encontrado uma variante de significado incerto no gene *NPR2*, que está presente na mãe e no avô materno com baixa estatura e sem desproporção corpórea.

Tabela 14 - Características clínicas do paciente 4

Paciente 4	
Sexo	Masculino
Idade cronológica (anos)	12,9
Idade óssea (anos)	10
Altura (cm; Z)	127; -3,2
Envergadura (cm)	NR
Z da altura sentada/altura total	-0,5
Z do perímetro cefálico	NR
IMC (kg/m²; Z)	14; -2,8
Idade gestacional (semanas)	42
Peso ao nascimento (g; Z)	2630; -1,8
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	49; -1,3
Altura do pai (cm; Z)	172; -0,4
Altura da mãe (cm; Z)	137; -4,2
História de consanguinidade	não
Outros membros da família com baixa estatura	avô materno
IGF-1 (ng/mL; Z)	125; -1,5
Pico de GH	14
Achados adicionais	-

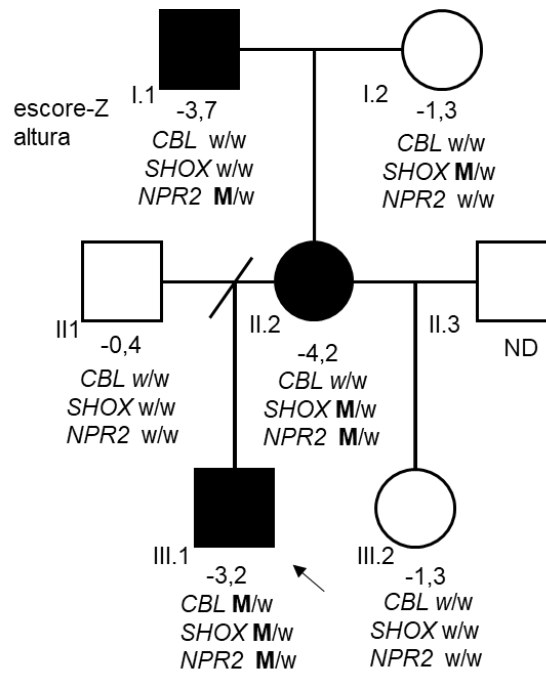


Figura 14 - Heredograma com a segregação da variante nos genes *CBL*, *SHOX* e *NPR2* na família do paciente 4

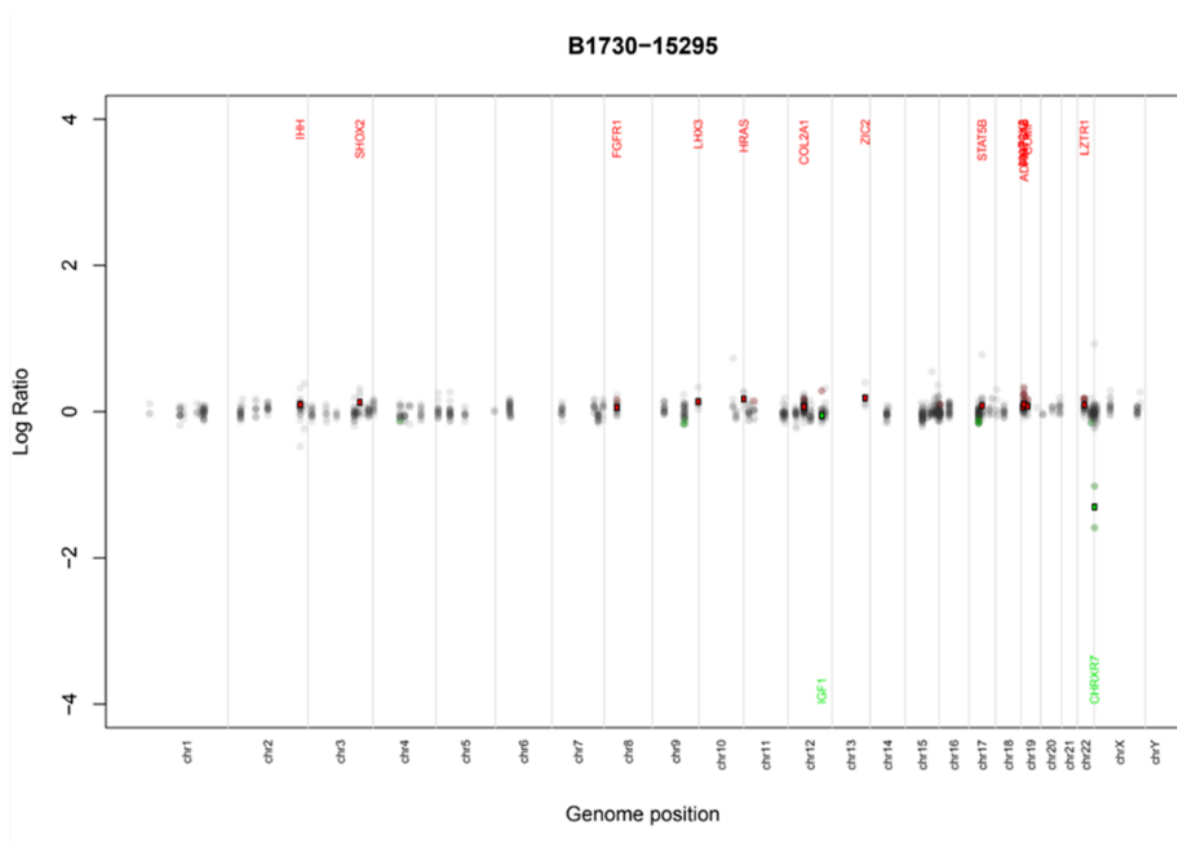


Figura 15 - Deleção em região regulatória do gene *SHOX* visualizada pelo CONTRA

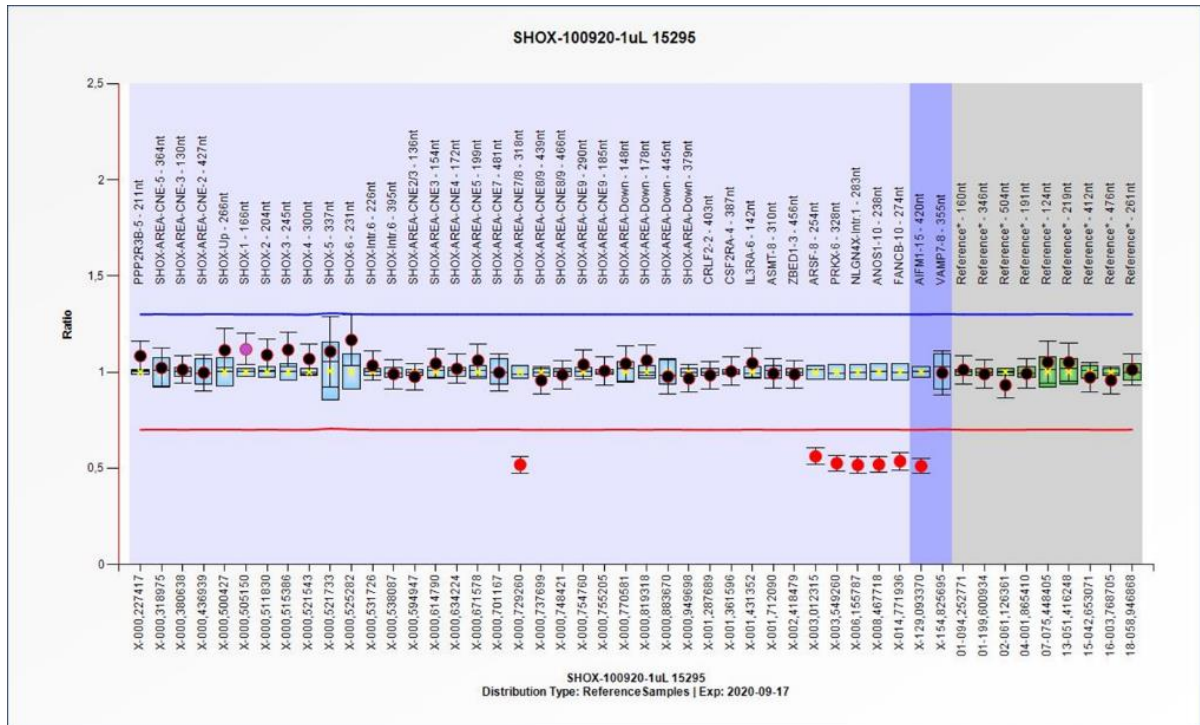


Figura 16 - Confirmação por MLPA da deleção de 1 sonda da região regulatória do gene *SHOX*

H5) Paciente 5: Gene *GHSR*

Este achado foi encontrado em paciente encaminhado de consultório privado. O paciente apresentava baixa estatura proporcional e herdou uma variante no gene *GHSR* do pai com baixa estatura e desproporção corpórea (AS/AT: 2,0). Ainda não há dados relacionados a puberdade devido idade precoce que o paciente foi avaliado, porém, há história familiar de atraso puberal em outros membros da família paterna (tios e primos paternos).

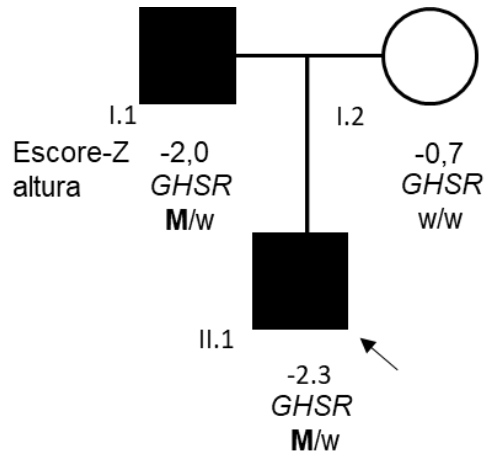


Figura 17- Heredograma com a segregação da variante no gene *GHSR* na família do paciente 5

Tabela 15 - Características clínicas do paciente 5

Paciente 5	
Sexo	Masculino
Idade cronológica (anos)	4,1
Idade óssea (anos)	2,8
Altura (cm; Z)	93,3; -2,3
Envergadura (cm)	96
Z da altura sentada/altura total	-0,5
Z do perímetro cefálico	1,8
IMC (kg/m ² ; Z)	15,9; 0,3
Idade gestacional (semanas)	39
Peso ao nascimento (g; Z)	2965; -0,9
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	45; -3,0
Altura do pai (cm; Z)	161,6; -2,0
Altura da mãe (cm; Z)	166,2; 0,7
História de consanguinidade	não
Outros membros da família com baixa estatura	não
IGF-1 (ng/mL; Z)	43,6; -2,16
Pico de GH	NR
Achados adicionais	fronte proeminente

H6) Paciente 6: Gene *PTPN11*

Este achado foi encontrado em um paciente encaminhado de consultório privado do estado do Pará. A hipótese inicial do encaminhamento foi Síndrome de Laron (insensibilidade ao hormônio de crescimento). Foi avaliado em nosso serviço com baixa estatura proporcional, sem nenhum achado clínicos ou laboratoriais que pudessem sugerir insensibilidade ao hormônio do crescimento. Esta variante foi segregada na família e foi um achado de novo. Apesar do gene *PTPN11* estar relacionado a síndrome de Noonan, o paciente não apresentava critérios clínicos para esta condição.

Tabela 16 - Características clínicas do paciente 6

Paciente 6	
Sexo	Masculino
Idade cronológica (anos)	4,0
Idade óssea (anos)	3,6
Altura (cm; Z)	91,3; -2,6
Envergadura (cm)	91
Z da altura sentada/altura total	-0,5
Z do perímetro cefálico	-1,9
IMC (kg/m²; Z)	15,1; -0,5
Idade gestacional (semanas)	39,2
Peso ao nascimento (g; Z)	3150; -0,6
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	48; -1,1
Altura do pai (cm; Z)	163,9; 1,5
Altura da mãe (cm; Z)	162,4; 0
História de consanguinidade	Não
Outros membros da família com baixa estatura	Não
IGF-1 (ng/mL; Z)	45; -2,1
Pico de GH	18,5
Achados adicionais	Epicanto

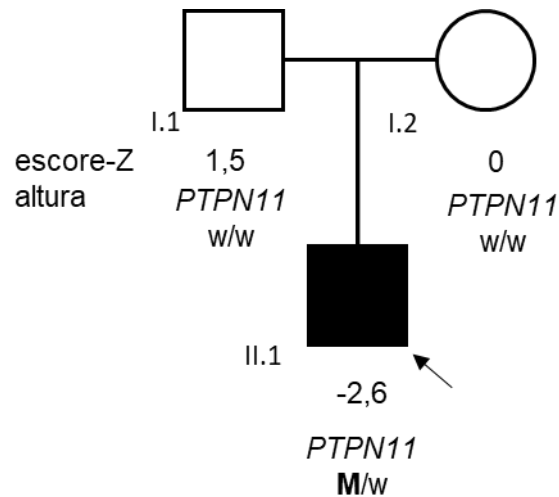


Figura 18 - Heredograma com a segregação da variante no gene *PTPN11* na família do paciente 6

H7) Paciente 7: Gene *COL2A1* e *NF1*

Estes achados foram encontrados em uma menina encaminhada por serviço público de São Paulo. Apresentava baixa estatura grave (z escore altura:-3,4) proporcional. Ambos achados foram segregados na família e a variante do *COL2A1* foi herdada do pai portador de baixa estatura. A variante no gene *NF1* é de novo e foi confirmada por Sanger de sangue e mucosa e devido desbalanço alélico evidenciado pelo IGV. Ela não apresenta nenhum achado esquelético ou sinais clínicos sugestivos de collagenopatias ou Neurofibromatose tipo 1.

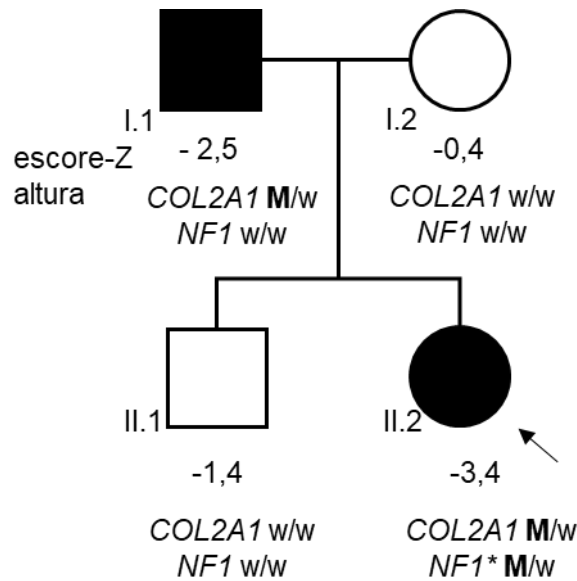


Figura 19 - Heredograma com a segregação da variante no gene *COL2A1* e *NF1* na família do paciente 7. *variante em mosaicismo

Tabela 17 - Características clínicas do paciente 7

Paciente 7	
Sexo	Feminino
Idade cronológica (anos)	2,7
Idade óssea (anos)	2,6
Altura (cm; Z)	79; -3,4
Envergadura (cm)	91
Z da altura sentada/altura total	-0,1
Z do perímetro cefálico	0,8
IMC (kg/m ² ; Z)	17,9; 1,4
Idade gestacional (semanas)	40
Peso ao nascimento (g; Z)	3150; -0,7
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	42,5; -4,6
Altura do pai (cm; Z)	158; -2,5
Altura da mãe (cm; Z)	160; -0,4
História de consanguinidade	não
Outros membros da família com baixa estatura	não
IGF-1 (ng/mL; Z)	81; -0,96
Pico de GH	27,9
Achados adicionais	clinodactilia

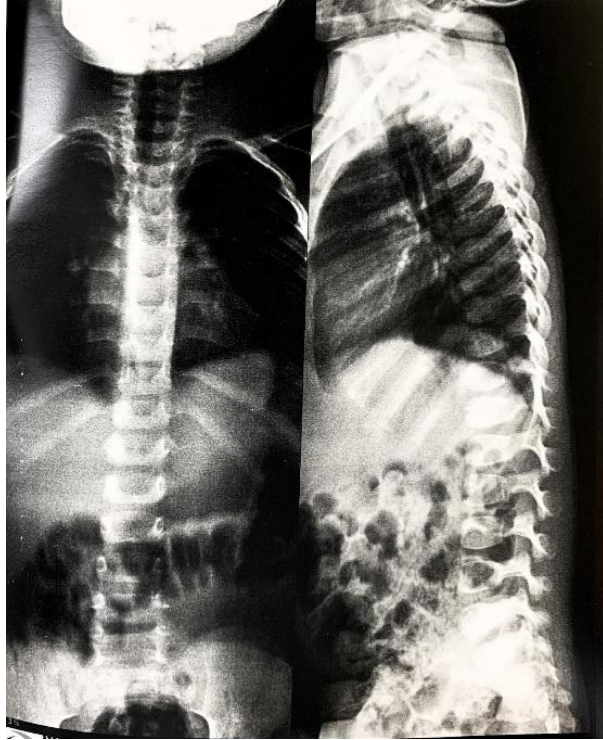


Figura 20- Radiografia de coluna da paciente 7 com ausência de vértebras ovóides, alterações no acetábulo ou alargamento ou irregularidade epifisária

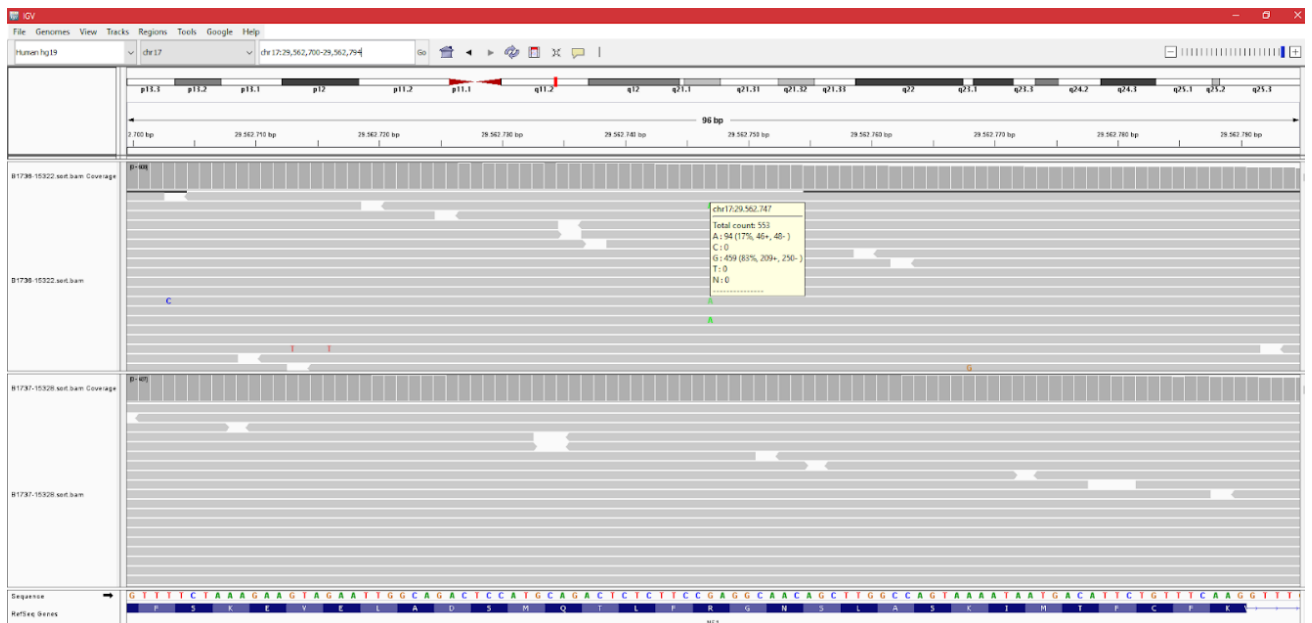


Figura 21- Visualização no IGV de mosaicism no gene *NF1*: desbalanço alélico na variante em heterozigose no gene *NF1*

H8) Paciente 8: Gene *ACAN*

Este achado foi encontrado em uma menina, encaminhada de um serviço público de São Paulo. Apresentava baixa estatura desproporcional, imperceptível a inspeção clínica, notada apenas através do cálculo do escore Z de altura sentada/altura total. A variante no gene *ACAN* foi visualizada no CONTRA como uma duplicação, porém, foi realizado CMA para confirmação deste achado e fechado diagnóstico que se tratava de um rearranjo complexo envolvendo o gene *ACAN*. Este mesmo achado foi herdado da mãe com baixa estatura desproporcional (escore z de AS/AT: 3,4) e também está presente na meia irmã materna também com baixa estatura desproporcional (escore z de AS/AT: 2,6) e na tia avó materna com baixa estatura sem desproporção corpórea.

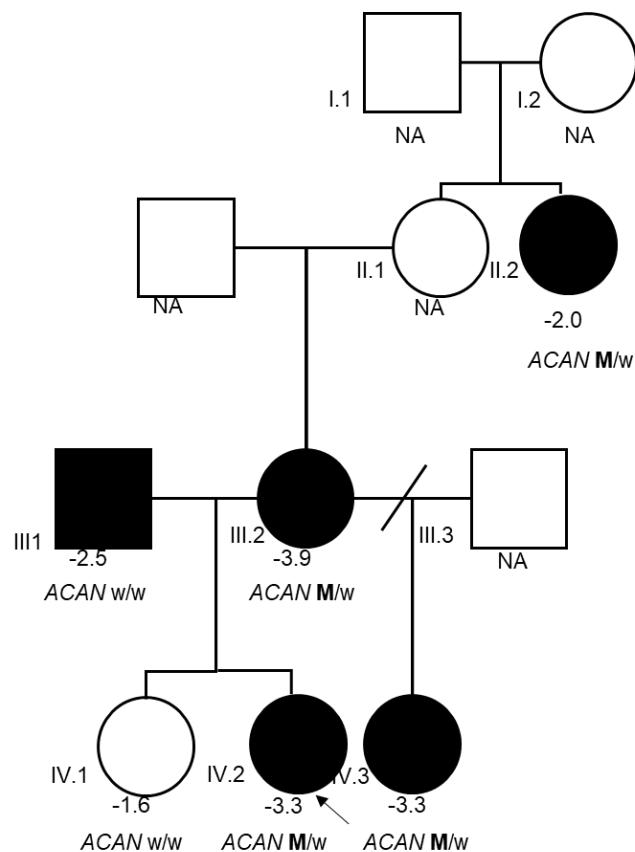
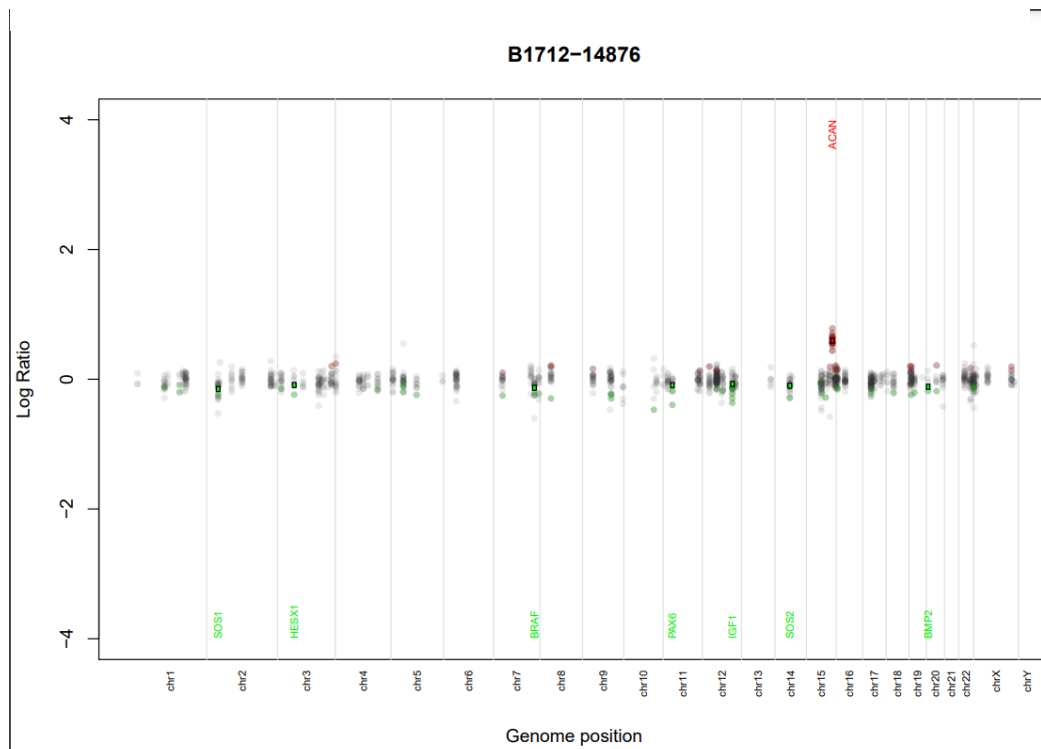


Figura 22 - Heredograma com a segregação da variante no gene *ACAN* na família da paciente 8

Tabela 18 - Características clínicas do paciente 8

Paciente 8	
Sexo	Feminino
Idade cronológica (anos)	9,3
Idade óssea (anos)	8,6
Altura (cm; Z)	112,1; -3,3
Envergadura (cm)	112,5
Z da altura sentada/altura total	3,6
Z do perímetro cefálico	-1,2
IMC (kg/m ² ; Z)	16,9; 0,2
Idade gestacional (semanas)	39,2
Peso ao nascimento (g; Z)	3000; -0,9
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	48,5; -1,2
Altura do pai (cm; Z)	150; -3,7
Altura da mãe (cm; Z)	138,6; -3,9
História de consanguinidade	não
Outros membros da família com baixa estatura	Sim
IGF-1 (ng/mL; Z)	149; -0,49
Pico de GH	6,15
Achados adicionais	Palato ogival, epicanto

Figura 23 - Duplicação do gene *ACAN* visualizada pelo CONTRA

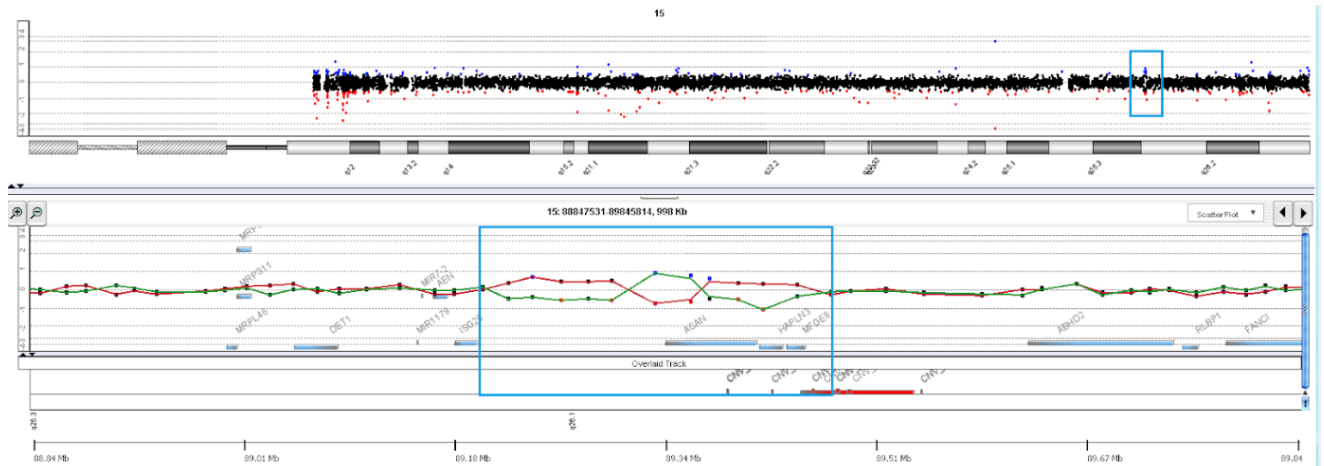


Figura 24 - Rearranjo complexo (deleção-duplicação-deleção) englobando o gene *ACAN* confirmado por CMA

H9) Paciente 9: Gene *SHOX*

Este achado foi encontrado em uma menina encaminhada de consultório privado. Apresentou-se com baixa estatura desproporcional, sem deformidade de madelung clinicamente. Na radiografia de idade óssea, apresentava discreta triangulação da epífise distal do rádio, que pode configurar uma deformidade de madelung inicial, mas que já havia sido avaliada anteriormente por dois outros profissionais. Na avaliação do CONTRA foi visualizada deleção relacionada ao gene *SHOX*. Este achado foi confirmado por MLPA e fechado diagnóstico de uma deleção de todo o gene e parte de sua região regulatória. A deleção também foi encontrada no pai, que também apresenta baixa estatura desproporcional (escore z de AS/AT: 3,4), sem deformidade de Madelung e no avô paterno sem baixa estatura, desproporção corpórea ou deformidade de Madelung.

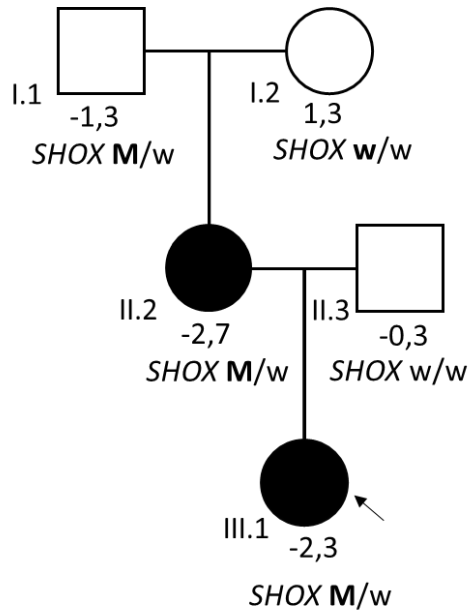


Figura 25 - Heredograma com a segregação deleção do gene *SHOX* na família da paciente 9

Tabela 19 - Características clínicas do paciente 9

Paciente 9	
Sexo	Feminino
Idade cronológica (anos)	9,3
Idade óssea (anos)	10
Altura (cm; Z)	120,4; -2,3
Envergadura (cm)	116
Z da altura sentada/altura total	2,2
Z do perímetro cefálico	0,84
IMC (kg/m ² ; Z)	16,3; -0,1
Idade gestacional (semanas)	38
Peso ao nascimento (g; Z)	2430; -1,8
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	45; -2,7
Altura do pai (cm; Z)	156,5; -2,7
Altura da mãe (cm; Z)	160,2; -0,3
História de consanguinidade	Não
Outros membros da família com baixa estatura	Não
IGF-1 (ng/mL; Z)	168; -0,17
Pico de GH	NR
Achados adicionais	discreta triangulação da epífise distal do rádio no RXIO.

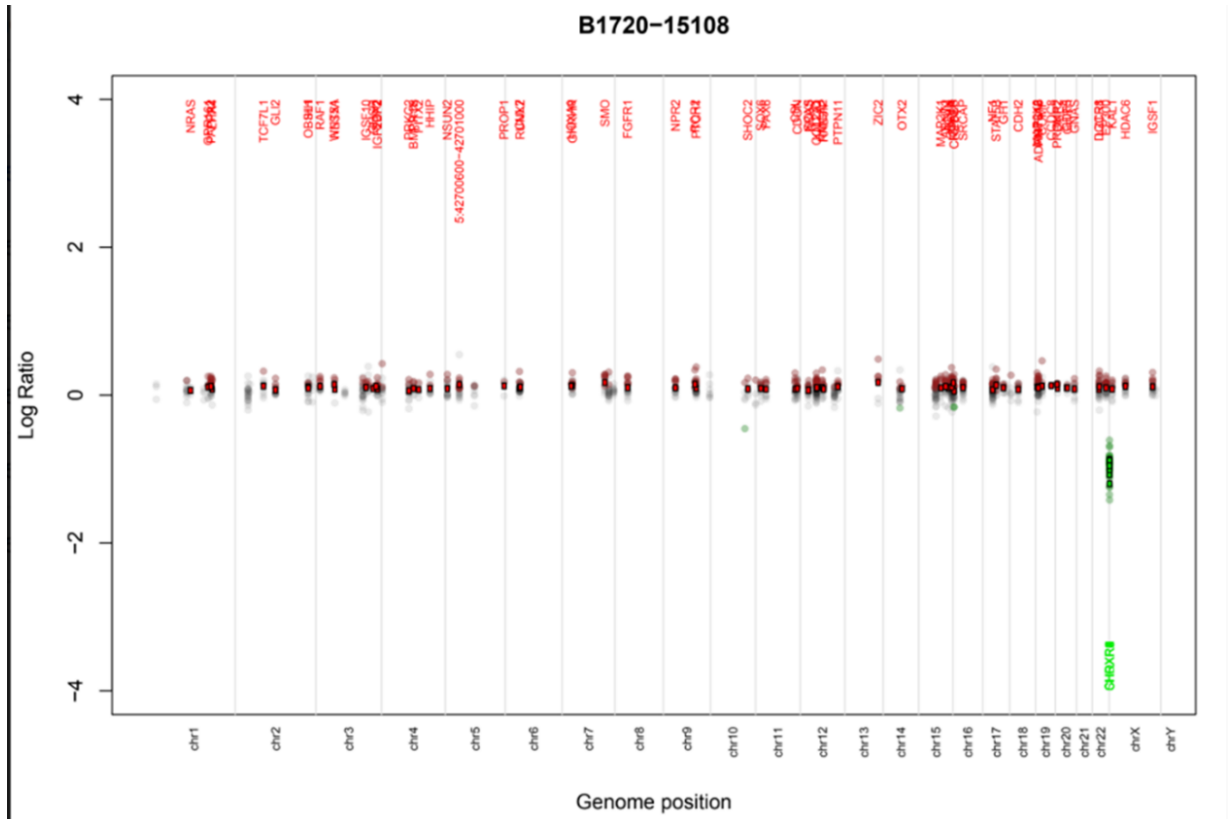


Figura 26 - Deleção do gene *SHOX* visualizada pelo CONTRA

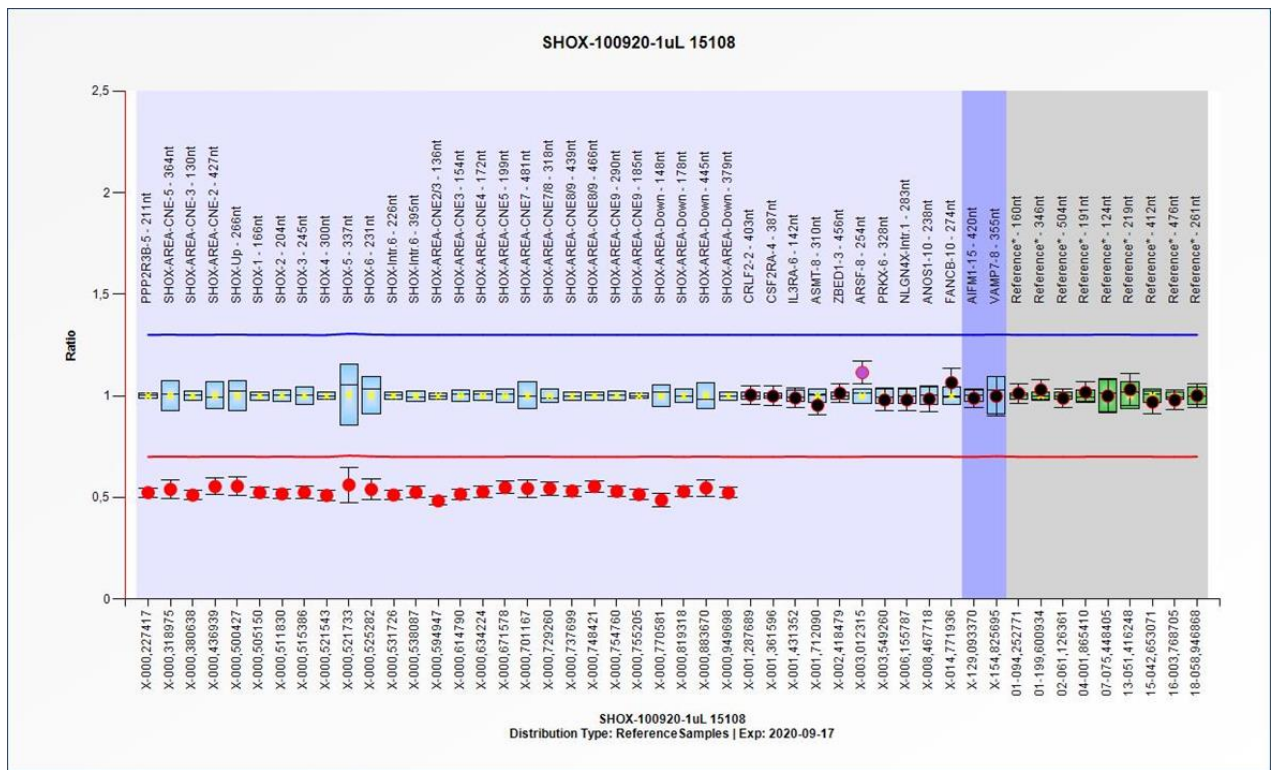


Figura 27 - Deleção englobando o gene *SHOX* e região regulatória confirmada por MLPA

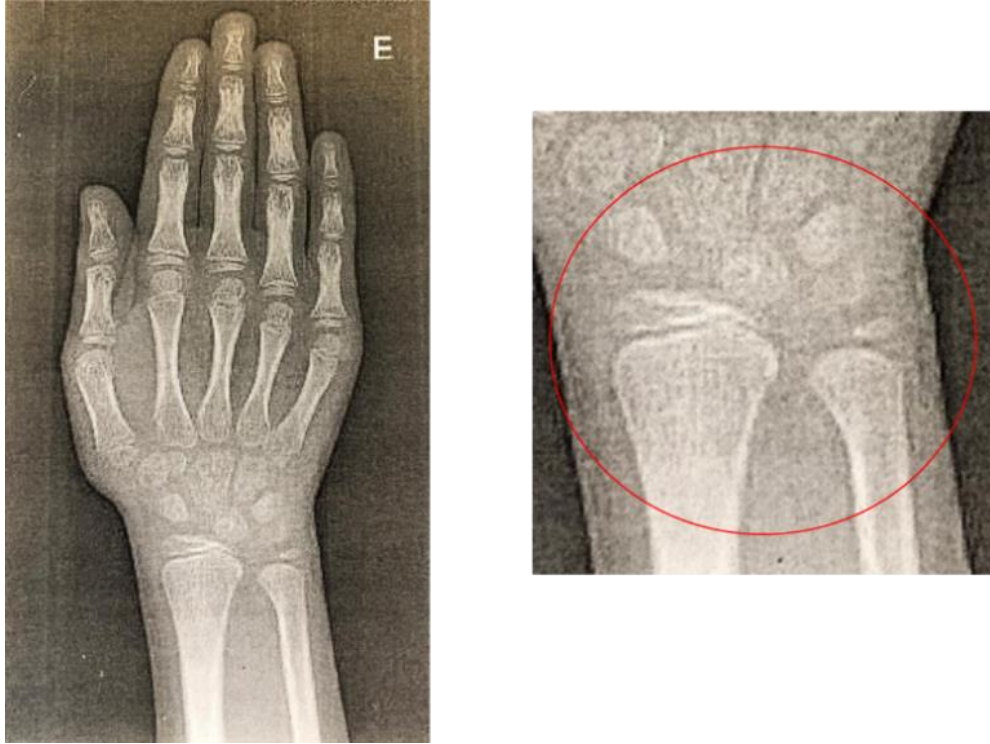


Figura 28 - Radiografia de mãos e punhos para idade óssea com discreta triangulação da epífise distal do rádio, que pode configurar uma deformidade de madelung inicial

H10) Paciente 10: Gene *FGFR3*

Este achado foi encontrado em paciente encaminhado por serviço público de São Paulo. Apresentava baixa estatura desproporcional. A variante foi segregada na família e foi herdada da mãe com baixa estatura desproporcional (escore z de AS/AT: 4,83), com história de ser a mais baixa da família. Apesar da variante ser relacionada a hipocondroplasia, aos 5,1 anos quando foi avaliado, não apresentava sinais clínicos ou radiográficos de displasia esquelética.

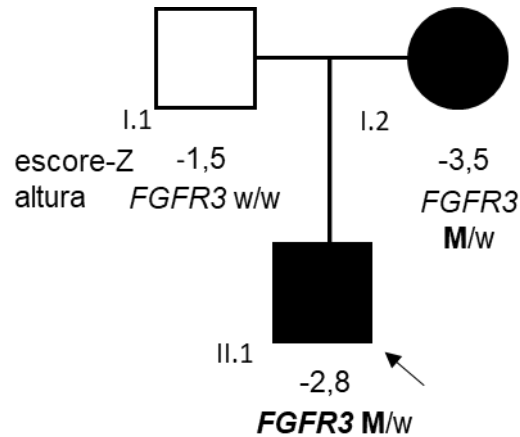


Figura 29 - Heredograma com a segregação deleção do gene *FGFR3* na família da paciente 10

Tabela 20 - Características clínicas do paciente 10

Paciente 10	
Sexo	Masculino
Idade cronológica (anos)	5,1
Idade óssea (anos)	4
Altura (cm; Z)	96,4; -2,8
Envergadura (cm)	92,3
Z da altura sentada/altura total	2,2
Z do perímetro cefálico	-0,37
IMC (kg/m²; Z)	15,3; -0,1
Idade gestacional (semanas)	39
Peso ao nascimento (g; Z)	2880; -1,1
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	45; -3,0
Altura do pai (cm; Z)	165; -1,5
Altura da mãe (cm; Z)	141,1; -3,5
História de consanguinidade	não
Outros membros da família com baixa estatura	não
IGF-1 (ng/mL; Z)	normal
Pico de GH	NR
Achados adicionais	epicanto discreto

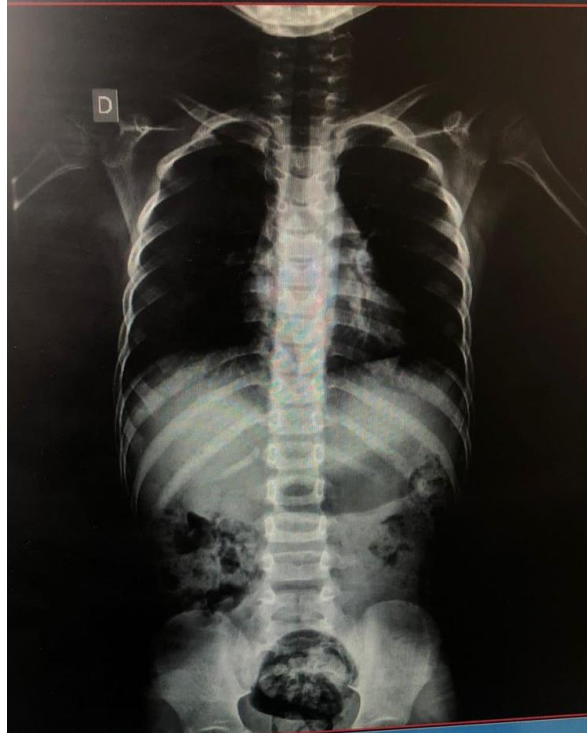


Figura 30 - Radiografia de coluna do paciente 10 com ausência de irregularidades metafisárias, estreitamento da distância interpedicular das vértebras lombares inferiores e uma pélvis anormal com asas ilíacas pequenas e quadradas e chanfradura sacro-ilíaca

H11) Paciente 16: Gene *LTBP3*

Este achado foi encontrado em um menino com baixa estatura desproporcional, encaminhado de um consultório privado. Foi realizado exoma do caso índice e da mãe portadora de baixa estatura também desproporcional. A variante, em heterozigose, não foi encontrada anteriormente pois este gene não havia sido incluído para análise neste painel. Apesar deste gene ser relacionado a displasia geolofísica, tivemos em nossa casuística interna um maior número de variantes relacionadas a esse gene comparado ao banco de dado populacional (Abraom), o que sugere um possível novo gene candidato associado a baixa estatura isolada.

Tabela 21- Características clínicas do paciente 16

Paciente 16	
Sexo	Masculino
Idade cronológica (anos)	6,7
Idade óssea (anos)	6,0
Altura (cm; Z)	107,3; -2,4
Envergadura (cm)	105
Z da altura sentada/altura total	2,0
Z do perímetro cefálico	0,18
IMC (kg/m ² ; Z)	15,5; 0
Idade gestacional (semanas)	38,3
Peso ao nascimento (g; Z)	2650; -1,4
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	46; -1,6
Altura do pai (cm; Z)	171,6; -0,46
Altura da mãe (cm; Z)	148; -2,35
História de consanguinidade	não
Outros membros da família com baixa estatura	sim
IGF-1 (ng/mL; Z)	130; 0,14
Pico de GH	NR
Achados adicionais	-

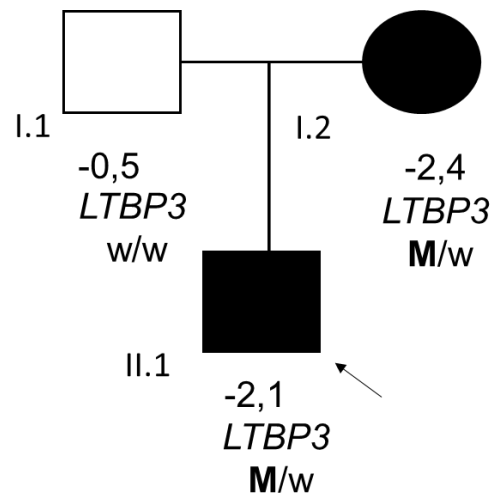


Figura 31 - Heredograma com a análise por exoma da família do paciente 16

H12) Paciente 17: Gene *ERF*

Este achado foi encontrado em um menino com baixa estatura desproporcional, encaminhado de um consultório privado. Foi realizado exoma do caso índice e encontrado variante no gene *ERF*, em heterozigose. Esta variante não foi encontrada anteriormente pois este gene não havia sido incluído para análise neste painel. Apesar deste gene ser relacionado a displasia esquelética, acreditamos que este paciente possa ter um fenótipo. A variante foi segregada na mãe que apresenta fenótipo muito semelhante ao filho.

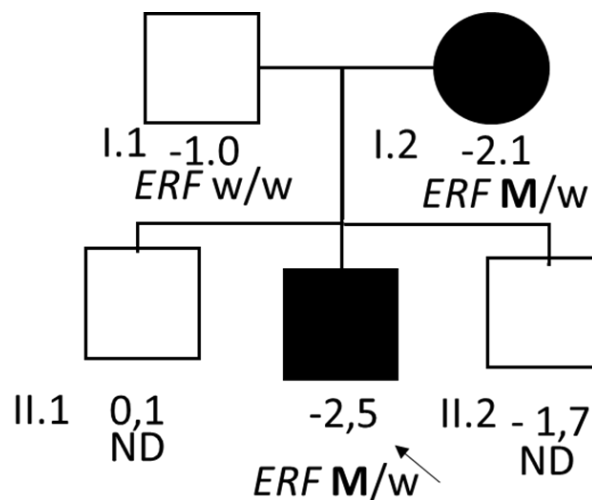


Figura 32 - Heredograma com a análise por exoma da família do paciente 17

Tabela 22 - Características clínicas do paciente 17

Paciente 17	
Sexo	Masculino
Idade cronológica (anos)	14,8
Idade óssea (anos)	13
Altura (cm; Z)	147,7; -2,5
Envergadura (cm)	144,5
Z da altura sentada/altura total	1,1
Z do perímetro cefálico	1,55

IMC (kg/m ² ; Z)	15,6; -2,2
Idade gestacional (semanas)	38,1
Peso ao nascimento (g; Z)	2550; -1,5
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	45,1; -2,6
Altura do pai (cm; Z)	168; -1,0
Altura da mãe (cm; Z)	149,5; -2,1
História de consanguinidade	Não
Outros membros da família com baixa estatura	Não
IGF-1 (ng/mL; Z)	363; 1,5
Pico de GH	NR
Achados adicionais	Epicanto

H13) Paciente 18: Gene *IHH*

Este achado foi encontrado em um paciente que já estava em acompanhamento em nosso serviço. Foi submetido o irmão mais novo, também portador de baixa estatura, desproporcional, para análise de exoma, foi visualizada pela análise de CNV (Delly) uma duplicação no gene *IHH*. Retornamos novamente para VCF do painel e foi visualizada a presença da variante pelo IGV, que possivelmente não foi detectada pelo painel por baixa cobertura apenas desta região.

Tabela 23 - Características clínicas do paciente 18

	Paciente 18	Irmão paciente 18
Sexo	Masculino	Masculino
Idade cronológica (anos)	11,6	10,3
Idade óssea (anos)	10	9
Altura (cm; Z)	132; -2,3	127,5; -2,0
Envergadura (cm)	122,5	125
Z da altura sentada/altura total	1,2	2,5
Z do perímetro cefálico	0,4	2,0
IMC (kg/m ² ; Z)	22,7; 1,6	23,9
Idade gestacional (semanas)	39	39
Peso ao nascimento (g; Z)	3335; -0,1	3280; -0,2
Comprimento ao nascimento (cm; Z)	46; -2,5	49; -0,5
Altura do pai (cm; Z)	164,4; -1,5	164,4; -1,5
Altura da mãe (cm; Z)	153,4; -1,5	153,5; -1,5

História de consanguinidade	Não	não
Outros membros da família com baixa estatura	Sim	sim
IGF-1 (ng/mL; Z)	117;-1,6	127;1,5
Pico de GH	4,69	NR
Achados adicionais	Discreta braquidactilia, Epífises cônicas ao Raio X de idade óssea	hipertrofia muscular, discreta acentuação discreta da lordose lombar

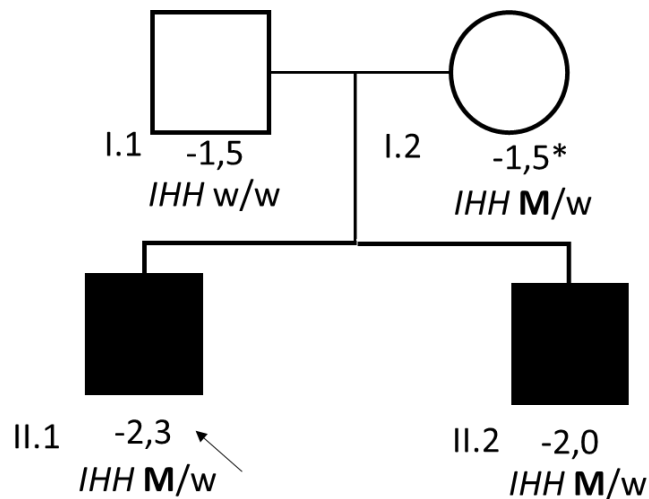


Figura 33 - Heredograma com a análise por exoma da família do paciente 18

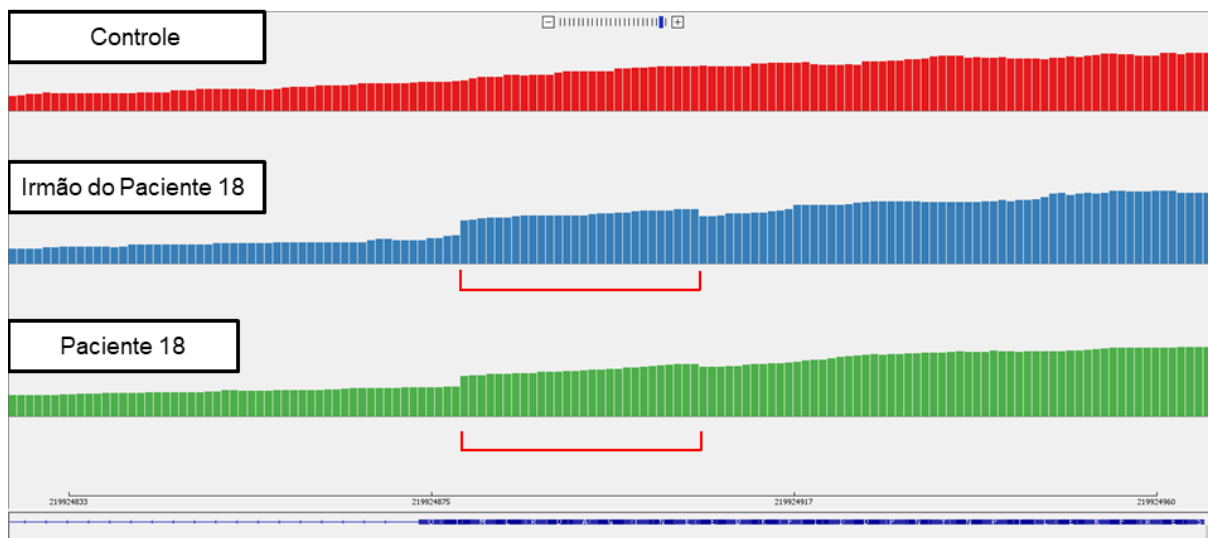


Figura 34– Visualização de duplicação pelo IGV, confirmando visualmente a variante no gene *IHH* no paciente 18 e no seu irmão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Visscher PM. Commentary: Height and Mendel's theory: the long and the short of it. *Int J Epidemiol*. 2013;42(4):944-5.
2. Lindsay R, Feldkamp M, Harris D, Robertson J, Rallison M. Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr*. 1994;125(1):29-35.
3. Voss LD, Mulligan J, Betts PR, Wilkin TJ. Poor growth in school entrants as an index of organic disease: the Wessex growth study. *BMJ*. 1992;305(6866):1400-2.
4. Silventoinen K, Sammalisto S, Perola M, Boomsma DI, Cornes BK, Davis C, et al. Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Res*. 2003;6(5):399-408.
5. Yengo L, Vedantam S, Marouli E, Sidorenko J, Bartell E, Sakaue S, et al. A saturated map of common genetic variants associated with human height. *Nature*. 2022;610(7933):704-12.
6. Andrade AC, Jee YH, Nilsson O. New Genetic Diagnoses of Short Stature Provide Insights into Local Regulation of Childhood Growth. *Horm Res Paediatr*. 2017;88(1):22-37.
7. Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, Lo KS, Wood AR, Kjaer TR, et al. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature*. 2017;542(7640):186-90.
8. Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, et al. VIEWPOINT Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(6):446-50.
9. Grunauer M, Jorge AAL. Genetic short stature. *Growth Horm IGF Res*. 2018;38:29-33.
10. Oxford University Press. 2010. idiopathic. In *Concise Medical Dictionary*. : Oxford University Press.
11. Soyka LF, Ziskind A, Crawford JD. Treatment of Short Stature in Children and Adolescents with Human Pituitary Growth Hormone (Raben). *N Engl J Med*. 1964;271:754-64.
12. Edelmann CM, Jr., Houston IB, Rodriguez Soriano J, Boichis H, Stark H. Renal excretion of hydrogen ion in children with idiopathic growth retardation. *J Pediatr*. 1968;72(4):443-51.
13. Spiegel RN, Sather AH, Hayles AB. Cephalometric study of children with various endocrine diseases. *Am J Orthod*. 1971;59(4):362-75.
14. Grunt JA, Enriquez AR, Daughaday WH. Acute and long term responses to hGH in children with idiopathic small-for-dates dwarfism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1972;35(1):157-68.
15. Ranke MB. Towards a consensus on the definition of idiopathic short stature. *Horm Res*. 1996;45 Suppl 2:64-6.
16. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, et al. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4210-7.
17. Collett-Solberg PF, Ambler G, Backeljauw PF, Bidlingmaier M, Biller BMK, Boguszewski MCS, et al. Diagnosis, Genetics, and Therapy of Short Stature in

Children: A Growth Hormone Research Society International Perspective. *Horm Res Paediatr.* 2019;92(1):1-14.

18. Homma TK, Krepischi ACV, Furuya TK, Honjo RS, Malaquias AC, Bertola DR, et al. Recurrent Copy Number Variants Associated with Syndromic Short Stature of Unknown Cause. *Horm Res Paediatr.* 2018;89(1):13-21.

19. Leal AeC, Canton AP, Montenegro LR, Coutinho DC, Arnhold IJ, Jorge AA. [Mutations in insulin-like growth factor receptor 1 gene (IGF1R) resulting in intrauterine and postnatal growth retardation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011;55(8):541-9.

20. Provot S, Schipani E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(3):658-65.

21. Gluckman PD, Harding JE. Fetal growth retardation: underlying endocrine mechanisms and postnatal consequences. *Acta Paediatr Suppl.* 1997;422:69-72.

22. Baron J, Savendahl L, De Luca F, Dauber A, Phillip M, Wit JM, et al. Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(12):735-46.

23. Wood AR, Esko T, Yang J, Vedantam S, Pers TH, Gustafsson S, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet.* 2014;46(11):1173-86.

24. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003;423(6937):332-6.

25. Marchini A, Ogata T, Rappold GA. A Track Record on SHOX: From Basic Research to Complex Models and Therapy. *Endocr Rev.* 2016;37(4):417-48.

26. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, et al. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development.* 2001;128(22):4523-34.

27. Gibson BG, Briggs MD. The aggrecanopathies; an evolving phenotypic spectrum of human genetic skeletal diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):86.

28. Deng H, Huang X, Yuan L. Molecular genetics of the COL2A1-related disorders. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2016;768:1-13.

29. Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M, van Duyvenvoorde HA, Ruivenkamp CA, Kant SG. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(4):R145-73.

30. Sisley S, Trujillo MV, Khoury J, Backeljauw P. Low incidence of pathology detection and high cost of screening in the evaluation of asymptomatic short children. *J Pediatr.* 2013;163(4):1045-51.

31. Dauber A, Stoler J, Hechter E, Safer J, Hirschhorn JN. Whole exome sequencing reveals a novel mutation in CUL7 in a patient with an undiagnosed growth disorder. *J Pediatr.* 2013;162(1):202-4 e1.

32. de Bruin C, Finlayson C, Funari MF, Vasques GA, Lucheze Freire B, Lerario AM, et al. Two Patients with Severe Short Stature due to a FBN1 Mutation (p.Ala1728Val) with a Mild Form of Acromicric Dysplasia. *Horm Res Paediatr.* 2016;86(5):342-8.

33. Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, Miller TC, Moon JE, Derr MA, et al. Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1428-37.

34. Hauer NN, Popp B, Schoeller E, Schuhmann S, Heath KE, Hisado-Oliva A, et al. Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genet Med.* 2018;20(6):630-8.

35. Kang MJ. Novel genetic cause of idiopathic short stature. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;22(3):153-7.

36. Murray PG, Clayton PE, Chernausek SD. A genetic approach to evaluation of short stature of undetermined cause. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018.
37. Goddard AD, Covello R, Luoh SM, Clackson T, Attie KM, Gesundheit N, et al. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. The Growth Hormone Insensitivity Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333(17):1093-8.
38. Millar DS, Lewis MD, Horan M, Newsway V, Easter TE, Gregory JW, et al. Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. *Hum Mutat*. 2003;21(4):424-40.
39. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, et al. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med*. 2003;349(23):2211-22.
40. Domene HM, Bengolea SV, Martinez AS, Ropelato MG, Pennisi P, Scaglia P, et al. Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene. *N Engl J Med*. 2004;350(6):570-7.
41. Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, et al. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest*. 2006;116(3):760-8.
42. Batey L, Moon JE, Yu Y, Wu B, Hirschhorn JN, Shen Y, et al. A novel deletion of IGF1 in a patient with idiopathic short stature provides insight into IGF1 haploinsufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(1):E153-9.
43. Dauber A, Muñoz-Calvo MT, Barrios V, Domené HM, Klopperpris S, Serra-Juhé C, et al. Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF-I availability. *EMBO Mol Med*. 2016;8(4):363-74.
44. Klammt J, Neumann D, Gevers EF, Andrew SF, Schwartz ID, Rockstroh D, et al. Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. *Nat Commun*. 2018;9(1):2105.
45. Vasques GA, Andrade NLM, Correa FA, Jorge AAL. Update on new GH-IGF axis genetic defects. *Arch Endocrinol Metab*. 2019;63(6):608-17.
46. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res*. 2005;64(4):157-65.
47. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet*. 1997;16(1):54-63.
48. Vasques GA, Amano N, Docko AJ, Funari MF, Quedas EP, Nishi MY, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):E1636-44.
49. Nilsson O, Guo MH, Dunbar N, Popovic J, Flynn D, Jacobsen C, et al. Short stature, accelerated bone maturation, and early growth cessation due to heterozygous aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):E1510-8.
50. Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, Aza-Carmona M, Sentchordi-Montane L, Barraza-Garcia J, et al. IHH Gene Mutations Causing Short Stature With Nonspecific Skeletal Abnormalities and Response to Growth Hormone Therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(2):604-14.
51. Hisado-Oliva A, Ruzafa-Martin A, Sentchordi L, Funari MFA, Bezanilla-Lopez C, Alonso-Bernaldez M, et al. Mutations in C-natriuretic peptide (NPPC): a novel cause of autosomal dominant short stature. *Genet Med*. 2018;20(1):91-7.
52. Kant SG, Cervenkova I, Balek L, Trantirek L, Santen GW, de Vries MC, et al. A novel variant of FGFR3 causes proportionate short stature. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(6):763-70.

53. Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, Petruzelkova L, Elblova L, Kolouskova S, et al. Familial Short Stature-A Novel Phenotype of Growth Plate Collagenopathies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(6):1742-9.
54. Saad MJA, Maciel RMdB, Mendonça BBd. *Endocrinologia: princípios e práticas.* 2017.
55. Plachy L, Strakova V, Elblova L, Obermannova B, Kolouskova S, Snajderova M, et al. High Prevalence of Growth Plate Gene Variants in Children With Familial Short Stature Treated With GH. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(10):4273-81.
56. Malaquias AC, Jorge AAL. Activation of the MAPK pathway (RASopathies) and partial growth hormone insensitivity. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;519:111040.
57. Dauber A, Munoz-Calvo MT, Barrios V, Domene HM, Kloverpris S, Serra-Juhe C, et al. Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF-I availability. *EMBO Mol Med.* 2016;8(4):363-74.
58. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(9):3080-92.
59. Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, Edmund AB, Robinson JW, Olney RC, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat.* 2015;36(4):474-81.
60. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data.* 2000(314):1-27.
61. Hoyme HE. Minor malformations. Significant or insignificant? *Am J Dis Child.* 1987;141(9):947.
62. Leppig KA, Werler MM, Cann CI, Cook CA, Holmes LB. Minor malformations: significant or insignificant. *Am J Dis Child.* 1988;142(12):1274.
63. Fredriks AM, van Buuren S, van Heel WJ, Dijkman-Neerincx RH, Verloove-Vanhorick SP, Wit JM. Nationwide age references for sitting height, leg length, and sitting height/height ratio, and their diagnostic value for disproportionate growth disorders. *Arch Dis Child.* 2005;90(8):807-12.
64. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46.
65. Funari MFA, de Barros JS, Santana LS, Lerario AM, Freire BL, Homma TK, et al. Evaluation of SHOX defects in the era of next-generation sequencing. *Clin Genet.* 2019;96(3):261-5.
66. Freire BL, Homma TK, Funari MFA, Lerario AM, Vasques GA, Malaquias AC, et al. Multigene Sequencing Analysis of Children Born Small for Gestational Age With Isolated Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(6):2023-30.
67. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434-43.
68. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* 2017;38(7):751-63.
69. Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, Funari MFA, Nishi MY, Narcizo AM, et al. SELAdb: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics (Sao Paulo).* 2020;75:e1913.
70. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.

71. Sentchordi-Montané L, Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Díaz-González F, Modamio-Høybjør S, de la Torre C, et al. High prevalence of variants in skeletal dysplasia associated genes in individuals with short stature and minor skeletal anomalies. *Eur J Endocrinol*. 2021.
72. Fan X, Zhao S, Yu C, Wu D, Yan Z, Fan L, et al. Exome sequencing reveals genetic architecture in patients with isolated or syndromic short stature. *J Genet Genomics*. 2021;48(5):396-402.
73. Funari MF. Investigação genético-molecular da baixa estatura isolada através de sequenciamento paralelo em larga escala: Faculdade de Medicina; 2019.
74. Andrade NLM, Funari MFA, Malaquias AC, Collett-Solberg PF, Gomes N, Scalco R, et al. Diagnostic yield of a multigene sequencing approach in children classified as idiopathic short stature. *Endocr Connect*. 2022;11(12).
75. Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Liborio DC, Kim CA, et al. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;66(1):130-5.
76. Dauber A. Genetic Testing for the Child With Short Stature-Has the Time Come To Change Our Diagnostic Paradigm? *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(7):2766-9.
77. Guo MH, Shen Y, Walvoord EC, Miller TC, Moon JE, Hirschhorn JN, et al. Whole exome sequencing to identify genetic causes of short stature. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(1):44-52.
78. Hattori A, Katoh-Fukui Y, Nakamura A, Matsubara K, Kamimaki T, Tanaka H, et al. Next generation sequencing-based mutation screening of 86 patients with idiopathic short stature. *Endocr J*. 2017;64(10):947-54.
79. Perchard R, Murray PG, Payton A, Highton GL, Whatmore A, Clayton PE. Novel Mutations and Genes That Impact on Growth in Short Stature of Undefined Aetiology: The EPIGROW Study. *J Endocr Soc*. 2020;4(10):bvaa105.
80. Yang L, Zhang C, Wang W, Wang J, Xiao Y, Lu W, et al. Pathogenic gene screening in 91 Chinese patients with short stature of unknown etiology with a targeted next-generation sequencing panel. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):212.
81. Narayanan DL, Udyawar D, Kaur P, Sharma S, Suresh N, Nampoothiri S, et al. Multilocus disease-causing genomic variations for Mendelian disorders: role of systematic phenotyping and implications on genetic counselling. *Eur J Hum Genet*. 2021;29(12):1774-80.
82. Correa FA, França MM, Fang Q, Ma Q, Bachega TA, Rodrigues A, et al. Growth hormone deficiency with advanced bone age: phenotypic interaction between GHRH receptor and CYP21A2 mutations diagnosed by sanger and whole exome sequencing. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61(6):633-6.
83. Blum WF, Cao D, Hesse V, Fricke-Otto S, Ross JL, Jones C, et al. Height gains in response to growth hormone treatment to final height are similar in patients with SHOX deficiency and Turner syndrome. *Horm Res*. 2009;71(3):167-72.
84. Dantas NCB, Funari MFA, Vasques GA, Andrade NLM, Rezende RC, Brito V, et al. Adult Height of Patients with SHOX Haploinsufficiency with or without GH Therapy: A Real-World Single-Center Study. *Horm Res Paediatr*. 2022;95(3):264-74.
85. Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, Petruzekova L, Zemkova D, Elblova L, et al. NPR2 Variants Are Frequent among Children with Familial Short Stature and Respond Well to Growth Hormone Therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(3).
86. Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, Crocker M, Douglas J, Dunbar N, et al. Clinical Characterization of Patients With Autosomal Dominant Short Stature due to Aggrecan Mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):460-9.

87. Kowarski AA, Schneider J, Ben-Galim E, Weldon VV, Daughaday WH. Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978;47(2):461-4.
88. Mauras N, Walton P, Nicar M, Welch S, Rogol AD. Growth hormone stimulation testing in both short and normal statured children: use of an immunofunctional assay. *Pediatr Res.* 2000;48(5):614-8.
89. Takahashi Y, Kaji H, Okimura Y, Goji K, Abe H, Chihara K. Brief report: short stature caused by a mutant growth hormone. *N Engl J Med.* 1996;334(7):432-6.
90. Takahashi Y, Shirono H, Arisaka O, Takahashi K, Yagi T, Koga J, et al. Biologically inactive growth hormone caused by an amino acid substitution. *J Clin Invest.* 1997;100(5):1159-65.
91. Besson A, Salemi S, Deladoey J, Vuissoz JM, Eble A, Bidlingmaier M, et al. Short stature caused by a biologically inactive mutant growth hormone (GH-C53S). *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2493-9.
92. Petkovic V, Miletta MC, Boot AM, Losekoot M, Fluck CE, Pandey AV, et al. Short stature in two siblings heterozygous for a novel bioinactive GH mutant (GH-P59S) suggesting that the mutant also affects secretion of the wild-type GH. *Eur J Endocrinol.* 2013;168(3):K35-43.
93. Laron Z. Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958-2003. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(3):1031-44.
94. Attie KM, Carlsson LM, Rundle AC, Sherman BM. Evidence for partial growth hormone insensitivity among patients with idiopathic short stature. The National Cooperative Growth Study. *J Pediatr.* 1995;127(2):244-50.
95. David A, Hwa V, Metherell LA, Netchine I, Camacho-Hubner C, Clark AJ, et al. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity. *Endocr Rev.* 2011;32(4):472-97.
96. Zoledziewska M, Sidore C, Chiang CWK, Sanna S, Mulas A, Steri M, et al. Height-reducing variants and selection for short stature in Sardinia. *Nat Genet.* 2015;47(11):1352-6.
97. Vairamani K, Merjaneh L, Casano-Sancho P, Sanli ME, David A, Metherell LA, et al. Novel Dominant-Negative GH Receptor Mutations Expands the Spectrum of GHI and IGF-I Deficiency. *J Endocr Soc.* 2017;1(4):345-58.
98. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402(6762):656-60.
99. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 1996;273(5277):974-7.
100. Pugliese-Pires PN, Fortin JP, Arthur T, Latronico AC, Mendonca BB, Villares SM, et al. Novel inactivating mutations in the GH secretagogue receptor gene in patients with constitutional delay of growth and puberty. *Eur J Endocrinol.* 2011;165(2):233-41.
101. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(9):651-62.
102. Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med.* 2003;349(12):1139-47.

103. Scalco RC, Hwa V, Domene HM, Jasper HG, Belgorosky A, Marino R, et al. STAT5B mutations in heterozygous state have negative impact on height: another clue in human stature heritability. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(3):291-6.
104. Forbes BE, Blyth AJ, Wit JM. Disorders of IGFs and IGF-1R signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;518:111035.
105. Veenma DC, Eussen HJ, Govaerts LC, de Kort SW, Odink RJ, Wouters CH, et al. Phenotype-genotype correlation in a familial IGF1R microdeletion case. *J Med Genet.* 2010;47(7):492-8.
106. Walenkamp MJE, Robers JML, Wit JM, Zandwijken GRJ, van Duyvenvoorde HA, Oostdijk W, et al. Phenotypic Features and Response to GH Treatment of Patients With a Molecular Defect of the IGF-1 Receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(8):3157-71.
107. Caliebe J, Broekman S, Boogaard M, Bosch CA, Ruivenkamp CA, Oostdijk W, et al. IGF1, IGF1R and SHOX mutation analysis in short children born small for gestational age and short children with normal birth size (idiopathic short stature). *Horm Res Paediatr.* 2012;77(4):250-60.
108. Cabrera-Salcedo C, Hawkes CP, Tyzinski L, Andrew M, Labilloy G, Campos D, et al. Targeted Searches of the Electronic Health Record and Genomics Identify an Etiology in Three Patients with Short Stature and High IGF-I Levels. *Horm Res Paediatr.* 2019;92(3):186-95.
109. Domene S, Domene HM. The role of acid-labile subunit (ALS) in the modulation of GH-IGF-I action. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;518:111006.
110. Fofanova-Gambetti OV, Hwa V, Wit JM, Domene HM, Argente J, Bang P, et al. Impact of heterozygosity for acid-labile subunit (IGFALS) gene mutations on stature: results from the international acid-labile subunit consortium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(9):4184-91.
111. Domené HM, Scaglia PA, Martínez AS, Keselman AC, Karabatas LM, Pipman VR, et al. Heterozygous IGFALS gene variants in idiopathic short stature and normal children: impact on height and the IGF system. *Horm Res Paediatr.* 2013;80(6):413-23.
112. Argente J, Perez-Jurado LA. Letter to the Editor: History and clinical implications of PAPP-A2 in human growth: When reflecting on idiopathic short stature leads to a specific and new diagnosis: Understanding the concept of "low IGF-I availability". *Growth Horm IGF Res.* 2018;40:17-9.
113. Babiker A, Al Noaim K, Al Swaid A, Alfadhel M, Deeb A, Martin-Rivada A, et al. Short stature with low insulin-like growth factor 1 availability due to pregnancy-associated plasma protein A2 deficiency in a Saudi family. *Clin Genet.* 2021;100(5):601-6.
114. Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Libório DC, Kim CA, et al. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66(1):130-5.
115. Ogata T, Onigata K, Hotsubo T, Matsuo N, Rappold G. Growth hormone and gonadotropin-releasing hormone analog therapy in haploinsufficiency of SHOX. *Endocr J.* 2001;48(3):317-22.
116. Blum WF, Ross JL, Zimmermann AG, Quigley CA, Child CJ, Kalifa G, et al. GH treatment to final height produces similar height gains in patients with SHOX deficiency and Turner syndrome: results of a multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1383-92.
117. Vasques GA, Arnhold IJ, Jorge AA. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(4):222-9.




118. Hanley PC, Kanwar HS, Martineau C, Levine MA. Short Stature is Progressive in Patients with Heterozygous NPR2 Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(10).
119. Hisado-Oliva A, Garre-Vazquez AI, Santaolalla-Caballero F, Belinchon A, Barreda-Bonis AC, Vasques GA, et al. Heterozygous NPR2 Mutations Cause Disproportionate Short Stature, Similar to Leri-Weill Dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(8):E1133-42.
120. Hauer NN, Sticht H, Boppudi S, Buttner C, Kraus C, Trautmann U, et al. Genetic screening confirms heterozygous mutations in ACAN as a major cause of idiopathic short stature. *Sci Rep.* 2017;7(1):12225.
121. Lin L, Li M, Luo J, Li P, Zhou S, Yang Y, et al. A High Proportion of Novel ACAN Mutations and Their Prevalence in a Large Cohort of Chinese Short Stature Children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(7):e2711-e9.
122. Wu S, Wang C, Cao Q, Zhu Z, Liu Q, Gu X, et al. The Spectrum of ACAN Gene Mutations in a Selected Chinese Cohort of Short Stature: Genotype-Phenotype Correlation. *Front Genet.* 2022;13:891040.
123. Alexandrou E, Dauber A, Tyzinski L, Hwa V, Andrew M, Kim H, et al. Clinical phenotype and musculoskeletal characteristics of patients with aggrecan deficiency. *Am J Med Genet A.* 2022;188(4):1193-203.
124. Muthuvel G, Dauber A, Alexandrou E, Tyzinski L, Andrew M, Hwa V, et al. Treatment of Short Stature in Aggrecan-deficient Patients With Recombinant Human Growth Hormone: 1-Year Response. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(5):e2103-e9.
125. Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, Aza-Carmona M, Sentchordi-Montané L, Barraza-García J, et al. IHH Gene Mutations Causing Short Stature With Nonspecific Skeletal Abnormalities and Response to Growth Hormone Therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(2):604-14.
126. Vasques GA, Hisado-Oliva A, Funari MF, Lerario AM, Quedas EP, Solberg P, et al. Long-term response to growth hormone therapy in a patient with short stature caused by a novel heterozygous mutation in NPR2. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;30(1):111-6.
127. Horton WA, Hall JG, Hecht JT. Achondroplasia. *Lancet.* 2007;370(9582):162-72.
128. Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Schmidt H, Weissenbach J, Maroteaux P, et al. Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia. *J Med Genet.* 1996;33(9):749-52.
129. Mamada M, Yorifuji T, Kurokawa K, Kawai M, Momoi T, Nakahata T. Prevalence of Mutations in the FGFR3 Gene in Individuals with Idiopathic Short Stature. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2006;15(2):61-4.
130. Nishimura G, Haga N, Kitoh H, Tanaka Y, Sonoda T, Kitamura M, et al. The phenotypic spectrum of COL2A1 mutations. *Hum Mutat.* 2005;26(1):36-43.
131. Chen M, Miao H, Liang H, Ke X, Yang H, Gong F, et al. Clinical Characteristics of Short-Stature Patients With Collagen Gene Mutation and the Therapeutic Response to rhGH. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:820001.
132. Oklu R, Hesketh R. The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J.* 2000;352 Pt 3(Pt 3):601-10.
133. Huckert M, Stoetzel C, Morkmued S, Laugel-Haushalter V, Geoffroy V, Muller J, et al. Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet.* 2015;24(11):3038-49.

134. McInerney-Leo AM, Le Goff C, Leo PJ, Kenna TJ, Keith P, Harris JE, et al. Mutations in LTBP3 cause acromicric dysplasia and geleophysic dysplasia. *J Med Genet.* 2016;53(7):457-64.
135. Bertola DR, Antequera R, Rodovalho MJ, Honjo RS, Albano LM, Furquim IM, et al. Brachyolmia with amelogenesis imperfecta: further evidence of a distinct entity. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(3):532-4.
136. de Castro CM, Rabe SM, Langdon SD, Fleenor DE, Slentz-Kesler K, Ahmed MN, et al. Genomic structure and chromosomal localization of the novel ETS factor, PE-2 (ERF). *Genomics.* 1997;42(2):227-35.
137. Balasubramanian M, Lord H, Levesque S, Guturu H, Thuriot F, Sillon G, et al. Chitayat syndrome: hyperphalangism, characteristic facies, hallux valgus and bronchomalacia results from a recurrent c.266A>G p.(Tyr89Cys) variant in the ERF gene. *J Med Genet.* 2017;54(3):157-65.
138. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 2002;70(6):1555-63.
139. Pannone L, Bocchinfuso G, Flex E, Rossi C, Baldassarre G, Lissewski C, et al. Structural, Functional, and Clinical Characterization of a Novel PTPN11 Mutation Cluster Underlying Noonan Syndrome. *Hum Mutat.* 2017;38(4):451-9.
140. Pasmant E, Vidaud M, Vidaud D, Wolkenstein P. Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *J Med Genet.* 2012;49(8):483-9.
141. Fu JF, Hsu JJ, Tang TC, Shih LY. Identification of CBL, a proto-oncogene at 11q23.3, as a novel MLL fusion partner in a patient with de novo acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;37(2):214-9.
142. Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet.* 2010;87(2):250-7.
143. Perez B, Mechinaud F, Galambrun C, Ben Romdhane N, Isidor B, Philip N, et al. Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia. *J Med Genet.* 2010;47(10):686-91.
144. Martinelli S, Stellacci E, Pannone L, D'Agostino D, Consoli F, Lissewski C, et al. Molecular Diversity and Associated Phenotypic Spectrum of Germline CBL Mutations. *Hum Mutat.* 2015;36(8):787-96.

APÊNDICE

RESEARCH

Diagnostic yield of a multigene sequencing approach in children classified as idiopathic short stature

Nathalia Liberatoscioli Menezes Andrade¹, Mariana Ferreira de Assis Funari²,
Alexandra Christianne Malaquias³, Paulo Ferrez Collett-Solberg⁴, Nathalia L R A Gomes⁵, Renata Scalco^{2,6},
Naiara Castelo Branco Dantas¹, Raissa C Rezende¹, Angelica M F P Tiburcio⁵, Micheline A R Souza⁷,
Bruna L Freire^{1,2}, Ana C V Krepischi⁸, Carlos Alberto Longui³, Antonio Marcondes Lerario⁹, Ivo J P Arnhold²,
Alexander A L Jorge^{1,2} and Gabriela Andrade Vasques^{1,2}

¹Unidade de Endocrinologia Genética (LIM 25), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil

²Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil

³Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁴Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

⁵Serviço de Endocrinologia, Unidade de Crescimento, Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

⁶Departamento de Medicina, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁷Serviço de Endocrinologia do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagao Gesteira/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

⁸Centro de Pesquisa em Genoma Humano e Células-Tronco, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁹Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, Department of Internal Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA

Correspondence should be addressed to A A L Jorge: alexj@usp.br

Abstract

Objective: Most children with short stature remain without an etiologic diagnosis after extensive clinical and laboratory evaluation and are classified as idiopathic short stature (ISS). This study aimed to determine the diagnostic yield of a multigene analysis in children classified as ISS.

Design and methods: We selected 102 children with ISS and performed the genetic analysis as part of the initial investigation. We developed customized targeted panel sequencing, including all genes already implicated in the isolated short-stature phenotype. Rare and deleterious single nucleotide or copy number variants were assessed by bioinformatic tools.

Results: We identified 20 heterozygous pathogenic (P) or likely pathogenic (LP) genetic variants in 17 of 102 patients (diagnostic yield = 16.7%). Three patients had more than one P/LP genetic alteration. Most of the findings were in genes associated with the growth plate differentiation: *IHH* ($n = 4$), *SHOX* ($n = 3$), *FGFR3* ($n = 2$), *NPR2* ($n = 2$), *ACAN* ($n = 2$), and *COL2A1* ($n = 1$) or involved in the RAS/MAPK pathway: *NF1* ($n = 2$), *PTPN11* ($n = 1$), *CBL* ($n = 1$), and *BRAF* ($n = 1$). None of these patients had clinical findings to guide a candidate gene approach. The diagnostic yield was higher among children with severe short stature (35% vs 12.2% for height SDS \leq or > -3 ; $P = 0.034$). The genetic diagnosis had an impact on clinical management for four children.

Conclusion: A multigene sequencing approach can determine the genetic etiology of short stature in up to one in six children with ISS, removing the term idiopathic from their clinical classification.

Key Words

- ▶ idiopathic short stature
- ▶ multigene sequencing analysis
- ▶ genetic
- ▶ mutation

Endocrine Connections
(2022) 11, e220214

Introduction

Short stature affects 2.3% of children and is a frequent complaint in pediatric endocrinology visits. However, more than 60% of these children have clinical and laboratory evaluations with no relevant findings justifying their growth impairment and are classified as having idiopathic short stature (ISS) (1). This term is widely used but this strict definition excludes children with evidence of systemic, endocrine, nutritional or chromosomal abnormalities, and those born small for gestational age (SGA). On the other hand, it includes familial short stature (2), which may suggest a major genetic basis.

It is known that human height has a high degree of heritability (>80%) (3). Thousands of common single nucleotide polymorphisms (minor allele frequency (MAF) $\geq 5\%$) have a low individual impact on height variability (less than 1–2 mm), while some rare variants (MAF < 1%) have been associated with a higher individual impact on stature (about 20 mm) (4, 5). This demonstrates that short stature has a complex inheritance and that adult height is primarily determined by the sum of the effects of common and rare variants (5, 6).

In the last 20 years, many monogenic defects have been established as causes of isolated short stature in patients initially classified as ISS (7). The genetic defects associated with ISS are mainly located in genes that regulate the endochondral ossification process in the growth plate and in genes related to the GH-IGF-1 axis (8, 9, 10). Also, defects in genes associated with the RAS-MAPK pathway (*PTPN11* and *NF1*) were reported in children with short stature without other characteristics (11, 12), with clear relevance for the patient's follow-up.

The individuals carrying these monogenic conditions exhibit variable degrees of short stature with nonspecific additional findings, limiting the use of a candidate gene approach. Therefore, genetic evaluation through multigene sequence analysis has gained importance, and several studies have already been published using this methodology in children with short stature of unknown cause (8, 10, 13, 14, 15, 16). However, the previous studies assessed pre-selected samples and/or included children born small for gestational age (SGA) or children with syndromic short stature. Thus, the present study aimed to evaluate a large number of homogeneous children classified as ISS, using a targeted gene panel as part of the initial investigation. We evaluated the diagnostic yield of this comprehensive genetic approach in 102 children with ISS.

Patients and methods

Patients

We enrolled 102 children initially classified as ISS (2) for genetic investigation. The ethics committee for the analysis of research projects of the *Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo* approved the present study (approval no. 3.555.875). All procedures followed the ethical standards of our ethics committee and the Declaration of Helsinki. The patients and/or their tutors provided written informed consent after receiving a full explanation of the purpose and nature of all procedures.

All children underwent clinical and laboratory assessment defined by the ISS consensus (2). The inclusion criteria were short stature (height standard deviation score (SDS) ≤ -2 (17)) and clinical assessment compatible with a healthy child. We excluded children born preterm (<37 weeks) and/or with low birth weight, as well as patients with significant dysmorphic features, major malformations (18), microcephaly, neurodevelopmental delay, intellectual disabilities, skeletal dysplasia, chronic systemic, nutritional, and endocrine diseases, including growth hormone deficiency (19).

In total, 364 children classified as ISS and who met the inclusion criteria were evaluated between August 1994 and February 2020. Of these, 262 were not included because they lost clinical follow-up ($n = 198$) and/or had already been genetically evaluated in previous studies using a candidate gene approach ($n = 64$) (20, 21, 22, 23). A total of 102 children were enrolled for this study. Fifty-nine children without previous genetic studies were selected for the genetic study during the follow-up in our outpatient clinic (retrospective cohort). Forty-three children were sequentially enrolled from March 2018 to February 2020 (prospective cohort). For these 43 children, the present genetic analysis was performed just after the first clinical and laboratory evaluation (Fig. 1).

The clinical assessment included measurements of weight (measured using an electronic scale) and standing and sitting height (mean of three measurements using a calibrated wall-mounted stadiometer to the nearest 0.1 cm). The results were converted to SDS using age- and sex-specific norms for height, BMI, and sitting height:total height ratio (SH:H) (17, 24). The heights of the parents were obtained during the patients' visit or were obtained from the medical records reported by the family. The target height of the child was calculated as ((father's height + mother's height ± 13 cm)/2) and expressed as SDS. Patients were characterized as having familial short

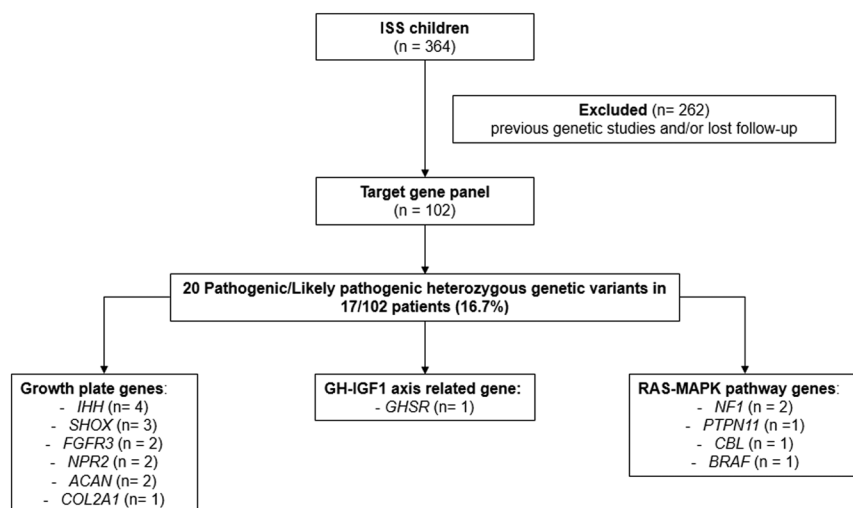


Figure 1
Flowchart of the approach used in this study to investigate a group of patients with idiopathic short stature.

stature when at least one of the parents had height SDS ≤ -2 . Bone age was assessed by the method of Greulich and Pyle, using left hand and wrist x-rays (25). All children underwent laboratory tests, including a complete blood count, creatinine, electrolytes, alkaline phosphatase, albumin, screening for celiac disease, TSH, free T4, and IGF-1 levels determination. A karyotype was performed in all girls to exclude Turner syndrome. Growth hormone deficiency (GHD) was excluded in all children based on normal IGF-1 SDS level (IGF-1 SDS ≥ -1) (26), normal growth velocity for age ($n = 100$), and/or a GH peak at stimulation test $> 5 \mu\text{g/L}$ ($n = 59$).

Genetic analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes from all patients and relatives using standard procedures. Targeted panel sequencing was performed only for the index patients. We developed a customized targeted panel (Agilent SureSelect XT assay; Agilent Technologies). The complete list of included genes is available in Supplementary Table 1 (see section on [supplementary materials](#) given at the end of this article). It contains genes expressed in the growth plate, involved in fundamental cellular processes and/or in the GHRH-GH-IGF1 pathway (7). In addition, we included *SHOX* genomic and enhancer regions to improve the analysis of this locus by next-generation sequencing (NGS). Our customized targeted panel had similar accuracy to the standard evaluation of *SHOX* defects (27). In-house bioinformatic analysis was performed as previously reported (12). The sequences were aligned to the human reference genome sequence (GRCh37/hg19). Copy number variation (CNVs) analysis was also performed for all patients using the program Copy

Number Targeted Resequencing Analysis (CONTRA) to identify the presence of deletions or duplications (28).

Variant assessment

For data analysis, we searched for rare variants located in exonic regions and consensus splice site sequences, with MAF $< 0.1\%$ in public international (gnomAD (29)) and national databases (ABraOM (30); SELAdb (31)). We prioritized variants according to their potential to be pathogenic, including loss-of-function variants, variants predicted to be pathogenic by multiple *in silico* tools (Supplementary Table 2), or previously reported in Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). The sequencing reads carrying candidate variants were visually inspected using the Integrative Genomics Viewer to reduce false-positive findings. The assessment of gene function was performed using the OMIM (<https://www.omim.org/>) and PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) databases. Sanger sequencing was performed to validate the candidate variants identified and for segregation analysis. The CNVs related to the *SHOX* gene identified by the CONTRA analysis were confirmed and segregated by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (27). MLPA analysis was carried out using the SALSA MLPA P018 *SHOX* (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands). The other CNVs of interest were confirmed and segregated in the family using the CGH-array technique. All variants were classified following the American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology variant pathogenicity guidelines (32).

Statistical analysis

Qualitative (nominal) variables were reported as absolute values and percentages. Continuous variables were

expressed as mean ± S.D. or median and interquartile range (IQR) (p25–p75). To compare children who had a genetic diagnosis with those without a genetic diagnosis and with those children who harbor a variant of uncertain significance (VUS), we used the ANOVA followed by Tukey test or Kruskal–Wallis, one-way ANOVA on ranks for numerical variables, as appropriate. Nominal variables were compared by chi-square or Fisher’s exact test, as appropriate. A *P*-value <0.05 was used for statistical significance. All analyses were done with SigmaStat software (RRID:SCR_010285, version 3.5; Systat Software, San Jose, CA).

Results

Cohort description

We analyzed data from 102 unrelated children initially classified as ISS. The clinical characteristics of these children are summarized in Table 1. Children who were included in the genetic study during their follow-up (retrospective cohort) or at the initial evaluation (prospective cohort) had similar characteristics (Supplementary Table 3). Our cohort was characterized by the predominance of boys (66%) and patients with familial short stature (59%). The mean age at the first evaluation was 8.9 ± 3.7 years, and 78% of the selected children were prepubertal. The average height was -2.6 ± 0.8 SDS, with 70% of the children having a height SDS < -2.5 and 20% a height SDS ≤ -3.0. Most of the children were eutrophic (80%; BMI SDS ≥ -2 and ≤ 1),

11% had low BMI (BMI SDS < -2), and 9% were overweight (BMI SDS > 1 and ≤ 2). The mean difference between bone and chronological age was -1.9 ± 1.4 years.

Genetic variants detected in the targeted panel

Eight pathogenic (P) and 12 likely pathogenic (LP) heterozygous variants, including 4 CNVs (16 single nucleotide variants and 4 CNVs; total=20), were identified in 17 of 102 patients. Three patients (patients 1, 4, and 7) had more than one P/LP variant (Fig. 2). The genetic results are described in Fig. 1 and Table 2. Ten single nucleotide variants were located in genes related to the growth plate (four in *IHH*, two in *NPR2*, two in *FGFR3*, one in *ACAN*, and one in *COL2A1*), one variant was in a gene associated with the GH-IGF1 axis (*GHSR*), and five variants were in genes related to the RAS-MAPK pathway (two in *NF1*, one in *CBL* gene, one in *PTPN11*, one in *BRAF*). In addition, we observed an allelic imbalance suggesting mosaicism in one *NF1 de novo* mutation (Tables 2 and 3). Three CNVs were heterozygous deletions related to the *SHOX* gene, and one is a complex rearrangement involving the *ACAN* gene (Supplementary Table 4). Considering the 20 variants identified in this study, 13 were found in patients from the prospective cohort and 7 in patients from the retrospective cohort.

Additionally to P/LP variants, 13 variants were classified as VUS in 12 patients (Table 4). One patient had more than one VUS (patient 26), and another carried one P and one LP variant besides the VUS (patient 4). Eight VUSs were in

Table 1 Clinical characteristics of 102 patients with isolated short stature.

	Total	P/LP	VUS	Negative	<i>P</i> ^a
Prospective: retrospective cohort	43:59	10:7	66	27:47	0.230
Familial short stature ^b	58 (56.9%)	13 (76%)	5 (45%)	40 (54%)	0.175
Sex (male:female)	67:35	12:5	6:5	49:25	0.672
Chronological age (years)	8.9 ± 3.6	7.3 ± 3.8	8.9 ± 2.5	9.2 ± 3.7	0.164
Bone age – chronological age (years)	-1.9 ± 1.4	-1.4 ± 1.8	-2.0 ± 0.9	-2.0 ± 1.4	0.340
Height SDS	-2.65 ± 0.9	-2.98 ± 0.6	-2.68 ± 0.4	-2.57 ± 0.9	0.198
Severe short stature ^c	20 (19.6%)	7 (41.2%)	1 (9.1%)	12 (16.2%)	0.042
Height SDS corrected by TH SDS ^d	-1.41 ± 1.2	-1.39 ± 0.9	-1.91 ± 0.8	-1.33 ± 1.2	0.308
BMI SDS	-0.44 ± 1.1	0.18 ± 1.0 ^e	-0.27 ± 1.0	-0.61 ± 1.1	0.021
Sitting height/height (SH:H) SDS	0.78 ± 1.3	0.94 ± 1.6	0.48 ± 0.8	0.78 ± 1.3	0.665
GH peak at stimulation test	8.8 (<i>n</i> = 65) (6.5–14.4)	13.4 (<i>n</i> = 10) (9.4–18.6) ^f	6.5 (<i>n</i> = 8) (4.4–10.0)	8.8 (<i>n</i> = 47) (6.8–14.8)	0.017
IGF-1 SDS	-0.9 ± 1.1	-0.91 ± 1.1	-0.83 ± 1.1	-0.9 ± 1.1	0.865

^aANOVA test performed to compare P/LP, VUS, and negative groups; ^bWhen affected children had at least one of the parents with height SDS ≤ -2;

^cHeight SDS ≤ -3; ^dHeight SDS – target height (TH) SDS; ^eTukey test *post hoc*: *P* = 0.018 for P/LP vs negative; ^fTukey test *post hoc*: *P* = 0.039 for P/LP vs VUS. GH, growth hormone; IGF-1, insulin growth factor 1; LP, likely pathogenic; P, pathogenic; SDS, standard deviation score; TH, target height; VUS, variant of uncertain significance.

Bold indicates statistical significance, *P* < 0.05.

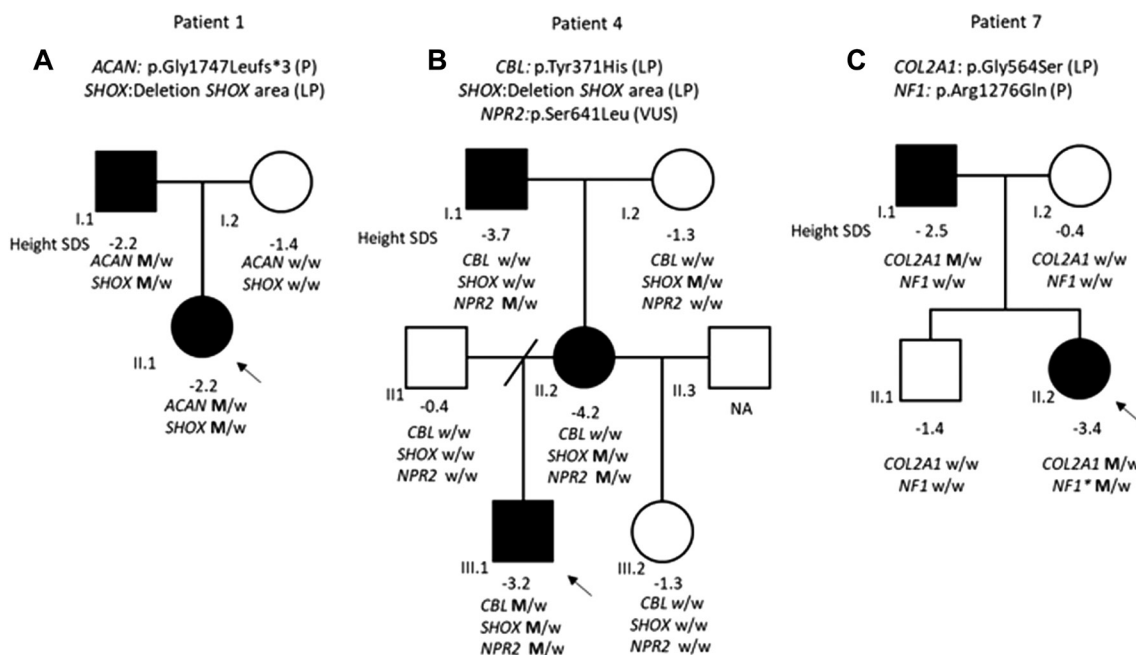


Figure 2

Children who harbor more than one P/LP variant. (A) Girl who inherited two P/LP variants (*ACAN* and *SHOX*) from the short father (patient 1). (B) Boy who has a *de novo* LP variant in *CBL* gene and two other variants inherited from the short mother in *SHOX* gene (LP) and *NPR2* gene (VUS) (patient 4). (C) Girl who inherited a *COL2A1* variant from the short father and a *de novo* variant in *NF1* gene in mosaic state (patient 7). Height SDS and SH:H SDS at first medical visit below the symbols. P, pathogenic; LP, likely pathogenic; VUS, variant of uncertain significance; NA, no data available. M, mutation. w, wild type. *Mosaic state.

genes related to the growth plate (three in *NPR2*, three in *IHH*, one in *FGFR3*, and one in *COL2A1*), four were in genes associated with the GH-IGF1 axis (three in *IGF1R* and one in *GHR*), and one in *NF1* gene. Among these 13 variants, 6 were found in patients from the prospective cohort and 7 were found in the retrospective cohort.

Phenotype of patients harboring variants associated with idiopathic short stature

The clinical characteristics of the children who had P/LP variants ($n=17$) are summarized in Tables 1 and 3. Twelve children (71%) inherited the variant from a parent with short stature (height SDS from -4.2 to -2.0). Seven patients had mild disproportionate short stature (SH:H SDS > 2) and a normal skeletal survey; all of them had defects in genes related to the growth plate (*FGFR3*, *IHH*, *SHOX*, and *ACAN*). Eight had nonspecific skeletal abnormalities, and seven of them with a variant associated with the growth plate. Two of four patients carrying a variant in *IHH* gene (patients 2 and 11) had a shortening of the middle phalanx of the fifth finger with cone-shaped epiphyses identified in the x-ray for bone age. None of the patients who had CNVs ($n=3$) related to the *SHOX* gene had Madelung deformity, and only one girl had disproportionate short stature. Most of the children

had a bone age (BA) compatible with chronological age (58%) or slightly delayed BA (37%). Considering the two girls that harbored pathogenic variants in *ACAN*, only one had advanced bone age (CA 5.4 years; BA: 7.6 years), the other one had a bone age compatible with her chronological age (CA 9.3 years; BA: 8.6 years). The boys with pathogenic variants in *CBL*, *PTPN11*, and *BRAF* had no clinical criteria that could suggest Noonan syndrome or other RASopathies. Similarly, the two patients who had the *NF1* variants did not have any clinical findings that suggested neurofibromatosis type 1 at the age of 2.7 and 9.6 years. One of them had mosaicism for the *NF1* variant, which could explain the absence of additional signs.

Although children harboring LP/P variants had clinical characteristics that overlapped with children with negative results, as a group, these patients had a higher BMI and GH peak. There were no differences in the clinical characteristics of patients with VUS compared to patients with negative result (Table 1). Eight inherited the VUS from a parent with short stature (height SDS from -4.2 to -2.0), and only one had mild body disproportion.

Diagnostic yield of the targeted gene panel

We identified 20 P/LP variants and/or CNVs in 17 of the 102 children with idiopathic short stature, corresponding

Table 2 Twenty pathogenic and likely pathogenic variants identified by targeted gene panel sequencing and CNV analysis in 102 patients with ISS.

ID	Gene	Variant	MAF ^b	Inheritance	ACMG/AMP (32)
1 ^a	ACAN	NM_001369268.1:c.5239_5248del (p.Gly1747Leufs*3)	0	Father ^e	Pathogenic PVS1, PM2, PP4
	SHOX ^c	Deletion SHOX area ^h	-	Father ^e	Likely pathogenic
2 ^a	IHH	NM_002181.4:c.366G>A (p.Trp122*)	0	Mother ^f	Pathogenic PVS1, PM2, PP1
3 ^a	NPR2	NM_003995.4:c.953G>A (p.Arg318Gln)	1.6 × 10 ⁻³	De novo	Likely pathogenic PM1, PM2, PM6
4 ^a	CBL	NM_005188.4:c.1111T>C (p.Tyr371His)	6.5 × 10 ⁻⁵	De novo	Likely pathogenic PM1, PM2, PM5, PM6, PP3, PP5
	SHOX ^c	Deletion SHOX area ^h	-	Mother ^e	Likely pathogenic
5 ^a	GHSR	NM_198407.2:c.611C>A (p.Ala204Glu)	5.3 × 10 ⁻⁵	Father ^e	Likely pathogenic PS3, PP3, PP5
6 ^a	PTPN11	NM_002834.5:c.663A>G (p.Ile221Met)	0	De novo	Likely pathogenic PM1, PM2, PM5, PM6, PP2, PP3
7 ^a	COL2A1	NM_001844.5:c.1690G>A (p.Gly564Ser)	0	Father ^e	Likely pathogenic PM1, PM2, PP2, PP3
	NF1	NM_000267.3:c.3827G>A (p.Arg1276Gln)	8.2 × 10 ⁻⁴	De novo ^g	Pathogenic PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5
8 ^a	ACAN ^d	Complex rearrangement ^h	-	Mother ^e	Pathogenic
9 ^a	SHOX ^c	Deletion SHOX (gene/regulatory sequences)	-	Father ^e	Pathogenic
10	FGFR3	NM_000142.5:c.667C>T (p.Arg223Cys)	0	Mother ^e	Likely pathogenic PM2, PP1, PP2, PP3, PP5
11	IHH	NM_002181.4:c.949G>A (p.Val317Met)	3.3 × 10 ⁻⁵	Father ^e	Likely pathogenic PM2, PP1, PP2, PP3, PP5
12	NPR2	NC_000009.12(NM_003995.3):c.1711-1G>C	0	Unavailable	Pathogenic PVS1, PM2, PP3
13	BRAF	NM_004333.6:c.712G>A (p.Val238Ile)	6.3 × 10 ⁻⁵	Mother ^e	Likely pathogenic PM1, PM2, PP2, PP3
14	IHH	NM_002181.4:c.172G>A (p.Glu58Lys)	0	Mother ^e	Likely pathogenic PM2, PP1, PP2, PP3
15	IHH	NM_002181.4:c.532G>C (p.Val178Leu)	0	De novo	Pathogenic PS2, PM2, PM5, PP2, PP3
16	NF1	NM_000267.3:c.3447G>A (p.Met1149Ile)	0	Mother ^e	Pathogenic PS1, PM1, PM5, PP3
17 ^a	FGFR3	NM_001163213.1:c.251C>T (p.Ser84Leu)	0	Mother ^e	Likely pathogenic PM2, PP1, PP2, PP4, PP5

^aProspective cohort; ^bMAF, minor allele frequency based on gnomAD (28) and ABraOM (29) database; ^cCNV analysis by CONTRA: confirmed and segregated in the family by MLPA technique; ^dCNV analysis by CONTRA: confirmed and segregated in the family by aCGH; ^eAffected parent with short stature (height SDS ≤ -2); ^fThis variant was *de novo* in the mother, absent in maternal grandparents; ^gMosaic variant confirmed by segregation and by the integrative genomics viewer (IGV); ^hMolecular description of CNVs is available in Supplementary Table 4.

to a diagnostic yield of 16.7% (95% CI: 9–24%). The diagnostic yield was higher among children with severe short stature (height SDS ≤ -3; 35%) in comparison with children with less severe short stature (12.2%; *P*=0.034). There was no significant difference in the rate of a positive genetic diagnosis in the group of patients with familial short stature (with 22.4%, without 9.1%; *P*=0.129) or with mild body disproportion (present 30.4%, absent 14.1%, *P*=0.116). The positivity in the prospectively evaluated group was higher: in this group, 10/43 patients (20.9%) had the cause of short stature elucidated vs 7/59 patients (11.9%) in the retrospective group. Despite this, there was no statistical significance when comparing the results of the two groups (*P* = 0.333).

Discussion

The assessment of children with ISS is puzzling. Despite the wide amount of reported new causes of growth disorders in children, those labeled as ISS remain without a specific diagnosis. The genetic investigation has emerged as a potential tool to establish the etiology of short stature. Therefore, we performed a comprehensive genetic study as part of the initial investigation of a large cohort of 102

children with ISS. We identified 20 P/LP variants and/or CNVs in 17 children with ISS, which corresponds to a diagnostic yield of 16.7%, including 3 patients with more than 1 P/LP finding (Figs 1, 2 and Table 2). Additionally, 13 variants were classified as of uncertain significance (VUS) in 12 patients. However, the definitive classification of VUS is a challenge, demanding the genotyping of several family members, functional assays and/or population studies. Thus, in our study, we preferred to be cautious and to consider patients with VUS belonging to the group of patients with negative results when we calculated the diagnostic yield. Consequently, this diagnostic yield may increase in the future if, some VUS are reclassified with additional data.

The diagnostic yield observed in our study was above the median reported in previous studies that used a multigene sequencing approach to assess children with short stature of unknown cause (average diagnostic rate of 12.5%, ranging from 8.7 to 19.5%; reviewed by Sentchordi-Montané *et al.* (10)). Nevertheless, several of these studies were not restricted to patients with ISS and included patients who were born SGA, with syndromic conditions, neurodevelopmental disorders, and/or skeletal dysplasia (8, 11, 12, 14, 33, 34).

Table 3 Clinical characteristics at first evaluation of patients with pathogenic or likely pathogenic genetic alterations.

ID	Gene	Sex	Age (years)	BA-CA (years)	H SDS	SH:H SDS	BMI SDS	Father (H SDS)	Mother (H SDS)	Additional findings
1	ACAN/ <i>SHOX</i>	F	5.4	2.3	-2.1	-0.9	0.7	-2.2 ^a	-1.4	Advanced bone age
2	<i>IHH</i>	M	4.0	-0.9	-3.1	2.0	0.6	1.5	-0.9 ^a	Shortening of the middle phalanx of the fifthfinger at x-ray for bone age
3	<i>NPR2</i>	M	4.8	-1.6	-2.5	0.7	-0.1	-0.3	-1.5	
4 ^b	<i>CBL/SHOX</i>	M	12.9	-2.9	-3.2	-0.5	-2.8	-0.4	-4.2 ^{a,c}	
5	<i>GHSR</i>	M	4.1	-0.3	-2.3	-0.5	0.3	-2.0 ^a	0.7	Prominent forehead
6	<i>PTPN11</i>	M	4.0	-0.3	-2.6	-0.5	-0.5	1.5	0.0	Epicanthus
7	<i>COL2A1/NF1</i>	F	2.7	-0.1	-3.4	-0.1	1.4	-2.5 ^{a,d}	-0.4	Clinodactyly
8	<i>ACAN</i>	F	9.3	-0.7	-3.3	3.6	0.2	-3.7	-3.9 ^a	High palate, epicanthus
9	<i>SHOX</i>	F	9.3	0.5	-2.3	2.2	-0.1	-2.7 ^a	-0.3	Slight triangulation of the distal epiphysis of the radius at x-ray for bone age
10	<i>FGFR3</i>	F	17.2	NA	-3.9	3.6	1.4	-0.7	-3.9 ^a	Slight accentuation of lumbar lordosis at x-ray
11	<i>IHH</i>	M	7.5	-2.5	-2.6	0.0	0.3	-2.0 ^a	-0.6	Shortening of the middle phalanx of the fifth finger at x-ray for bone age
12	<i>NPR2</i>	M	9.7	-3.7	-2.8	-1.3	0.3	-2.2	-1.5	Mild epicanthus
13	<i>BRAF</i>	M	8.7	-2.2	-3.0	-0.7	-0.9	-2.0	-3.1 ^a	Slight accentuation of thoracic kyphosis
14	<i>IHH</i>	M	3.4	-0.7	-2.8	2.3	1.6	-1.2	-2.2 ^a	High palate, mild epicanthus, short fifth metacarpal
15	<i>IHH</i>	M	7.1	-1.3	-2.8	2.2	0.8	-0.2	-1.2	
16	<i>NF1</i>	M	9.6	-5.9	-4.1	1.5	0.0	-3.0	-2.2 ^a	
17	<i>FGFR3</i>	M	5.1	-1.0	-2.8	2.2	-0.1	-1.5	-3.5 ^a	Mild epicanthus

^aAffected parent from who the patient inherited the variant; ^bThis patient also has a VUS in the *NPR2* gene; ^cThis patient carried only the *SHOX* variant;

^dThis patient carried only the *COL2A1* variant.

BA, bone age; CA, chronological age; H, height; SDS, standard deviation score; SH, sitting height.

In one remarkable study, Hauer *et al.* (8) evaluated 200 children with short stature by whole-exome sequencing (WES). A positive genetic diagnosis was obtained in 19 (14.2%) of 134 children initially classified as isolated short stature but which encompassed children born SGA or with syndromic features. In a recent study, Fan *et al.* (13) analyzed 561 patients with short stature by WES. In a subgroup of 257 patients classified as having isolated short stature due to the absence of associated organ malformation(s)

or other clinical evidence for multisystem involvement, a genetic diagnosis was obtained in 11.3%. However, among the positive results, mutations in genes associated with hypopituitarism, skeletal dysplasia, and chronic and metabolic disorders were reported, making it unlikely that all investigated patients met the ISS criteria (13). In another recent study, Sentchordi-Montané *et al.* (10) evaluated 108 children with short stature and minor skeletal anomalies with a customized skeletal dysplasia NGS panel. Although

Table 4 Variants of uncertain significance identified by targeted panel sequencing and CNV analysis in 12/102 patients with ISS.

ID	Gene	Variant	MAF ^a	Inheritance pattern	ACMG/AMP (32)
4	<i>NPR2</i>	NM_003995.4:c.1922C>T (p.Ser641Leu)	9.0 × 10 ⁻⁵	Mother ^b	VUS PM1, PM2, BP4
18	<i>IGF1R</i>	NM_000875.5:c.1139T>G (p.Leu380Arg)	0	Mother	VUS PM2, PP2, PP3
19	<i>NF1</i>	NM_000267.3:c.169G>A (p.Gly57Ser)	7.4 × 10 ⁻³	Unavailable	VUS PP3, BS2
20	<i>IGF1R</i>	NM_000875.5:c.3932C>T (p.Ser1311Leu)	1.0 × 10 ⁻⁴	<i>De novo</i>	VUS PM6, PP2, BP4
21	<i>IHH</i>	NM_002181.4:c.1168C>T (p.Arg390Cys)	4.0 × 10 ⁻⁴	Father ^b	VUS PM2, PP2, PP3
22	<i>NPR2</i>	NM_003995.4:c.2644G>A (p.Val882Ile)	2.0 × 10 ⁻⁴	Unavailable	VUS PP3, PP4
23	<i>COL2A1</i>	NM_001844.5:c.550G>A (p.Ala184Thr)	4.3 × 10 ⁻³	Mother ^b	VUS PM1, PM2, BP4
24	<i>IGF1R</i>	NM_000875.5:c.2719G>T (p.Ala907Ser)	0	Unavailable	VUS PM2, PP2, PP3
25	<i>GHR</i>	NM_000163.5:c.1156C>T (p.Arg386Cys)	9.0 × 10 ⁻⁴	Father ^b	VUS PM2, PP3
26	<i>IHH</i>	NM_002181.4:c.229C>A (p.Arg77Ser)	4.9 × 10 ⁻³	Mother ^b	VUS PM2, PP3, PP2, BS4
	<i>NPR2</i>	NM_003995.4:c.838C>T (p.Arg280Trp)	1.0 × 10 ⁻⁴	Mother ^b	VUS PM2, BS4
27	<i>FGFR3</i>	NM_000142.4:c.1657G>T (p.Val553Leu)	5.9 × 10 ⁻⁵	Mother ^b	VUS PM2, PP2, PP3
28	<i>IHH</i>	NM_002181.4:c.685G>A (p.Val229Met)	0	Father ^b	VUS PM2, PP1, PP2, PP3

Patients 11, 14, 15 (22), and 28 (44) have been reported in recent studies as clinically characterized children with *IHH* variants.

^aMAF, minor allele frequency based on the higher frequency observed in gnomAD (29) and ABraOM (30) database; ^bAffected parent with short stature (height SDS ≤ -2).

most of these children met the criteria for ISS, about a third were born SGA. Additionally, defects in the *SHOX* were ruled out before patients had been included in the study. The diagnostic yield was 11.1%, considering only P/LP variants (10).

We can attribute the higher diagnostic yield of our study in part to the systematic analysis of CNVs. This analysis included the evaluation of the *SHOX* gene and its regulatory regions, whose haploinsufficiency is a well-known cause of short stature in patients with ISS (20). Three patients had P/LP *SHOX*-related CNVs, corresponding to 2.9% of our cohort. Additionally, our cohort had an enrichment of familial cases, which can be associated with an increased possibility to identify an autosomal-dominant genetic cause for short stature (9, 35). Since our protocol was not pre-selected based on the patients' parent's height, we hypothesized that there was a referral bias of familial cases to our outpatient clinic in a tertiary center. Nevertheless, the severity of short stature was the only variable significantly associated with a higher diagnostic rate in our cohort.

Most of the genetic defects found in our cohort of ISS (70%) were identified in genes related to the growth plate (*ACAN*, *IHH*, *SHOX*, *NPR2*, *COL2A1*, *FGFR3*), similarly to previous studies (8, 12, 36). This finding emphasizes the role of defects in the endochondral ossification process leading to ISS phenotype. Children with defects in these genes usually inherited the genetic defect from a parent with short stature (9 of 13 cases); had mild body disproportion (7 of 13) and/or nonspecific skeletal abnormalities (7 of 13). However, these findings did not allow a differentiation between patients with alterations in the *IHH*, *NPR2*, *ACAN*, or *SHOX* genes. Additionally, three children with a causative defect in a growth plate gene had normal body proportion and no skeletal findings; and two children with *de novo* germline mutations had parents with normal height. Thus, clinical and radiological data may be insufficient to guide a candidate gene approach due to their nonspecificity (Table 3).

It is noteworthy that five children had genetic variants related to the RAS-MAPK pathway. Three of them had a *de novo* mutation, including one detected in a mosaic state and two inherited the variant from a parent with ISS (Table 2). These children may have a mild presentation in a spectrum of phenotypes caused by defects in these genes. Other studies using the genomic approach in patients with short stature also identified *NF1* and *PTPN11* mutations in patients without the typical clinical features (8, 11, 13, 14, 15). This data highlight the importance of the genetic diagnosis as it has an impact on the clinical

follow-up and in the decision to start growth hormone therapy for these children.

Three patients have more than one P/LP genetic alteration that explains the short stature phenotype (Fig. 2). Multiple genetic diagnoses can occur in 1.4–7.2% of patients with Mendelian disorders (37). Additionally, two non-overlapping genetic diagnoses of growth disorders were previously reported in patients with syndromic short stature (8, 13, 38). The exact role of each variant in our patients' phenotype was not well established.

In summary, a multigene sequencing approach is able to determine a genetic etiology of short stature in up to one in six children with ISS, removing the term idiopathic from their clinical classification (35). Knowing the genetic basis of these patients short stature can allow precise genetic counseling and clinical follow-up. It is particularly relevant to children harboring variants that can support the indication or be a contraindication of rhGH therapy. Based on the significant and progressive reduction of the costs of the genetic studies and their increasing diagnostic yield, we expect to reach the time when this diagnostic tool will be routinely offered in the assessment of children with ISS.

Supplementary materials

This is linked to the online version of the paper at <https://doi.org/10.1530/EC-22-0214>.

Declaration of interest

A A L J has received an independent research grant from BioMarin and consulting fees from Novo Nordisk. The other authors declare that they have no competing financial interest to declare.

Funding

This work was supported by Grants 2013/03236-5 (to A A L J) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP); Grant 303294/2020-5 (to A A L J) from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and by Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES; Finance Code 001 to N C B D, N L M A, and R C R).

Author contribution statement

N L M A and M F and A A L J and G A V contributed equally to this study.

Acknowledgements

The authors thank the Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala for their assistance with targeted panel sequencing and all collaborators, patients, and family members who made this study possible.

References

- 1 Collett-Solberg PF, Jorge AAL, Boguszewski MCS, Miller BS, Choong CSY, Cohen P, Hoffman AR, Luo X, Radovick S & Saenger P. Growth hormone therapy in children; research and practice – a

- review. *Growth Hormone and IGF Research* 2019 **44** 20–32. (<https://doi.org/10.1016/j.ghir.2018.12.004>)
- 2 Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM & 2007 ISS Consensus Workshop participants. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 4210–4217. (<https://doi.org/10.1210/jc.2008-0509>)
 - 3 Silventoinen K, Sammalisto S, Perola M, Boomsma DI, Cornes BK, Davis C, Dunkel L, De Lange M, Harris JR, Hjelmborg JV, *et al.* Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Research* 2003 **6** 399–408. (<https://doi.org/10.1375/136905203770326402>)
 - 4 Yengo L, Sidorenko J, Kemper KE, Zheng Z, Wood AR, Weedon MN, Frayling TM, Hirschhorn J, Yang J, Visscher PM, *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry. *Human Molecular Genetics* 2018 **27** 3641–3649. (<https://doi.org/10.1093/hmg/ddy271>)
 - 5 Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, Lo KS, Wood AR, Kjaer TR, Fine RS, Lu Y, Schurmann C, Highland HM, *et al.* Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature* 2017 **542** 186–190. (<https://doi.org/10.1038/nature21039>)
 - 6 Wood AR, Esko T, Yang J, Vedantam S, Pers TH, Gustafsson S, Chu AY, Estrada K, Luan J, Kutalik Z, *et al.* Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nature Genetics* 2014 **46** 1173–1186. (<https://doi.org/10.1038/ng.3097>)
 - 7 Vasques GA, Andrade NLM & Jorge AAL. Genetic causes of isolated short stature. *Archives of Endocrinology and Metabolism* 2019 **63** 70–78. (<https://doi.org/10.20945/2359-399700000105>)
 - 8 Hauer NN, Popp B, Schoeller E, Schuhmann S, Heath KE, Hisado-Oliva A, Klinger P, Kraus C, Trautmann U, Zenker M, *et al.* Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genetics in Medicine* 2018 **20** 630–638. (<https://doi.org/10.1038/gim.2017.159>)
 - 9 Plachy L, Strakova V, Elblova L, Obermannova B, Kolouskova S, Snajderova M, Zemkova D, Dusatkova P, Sumnik Z, Lebl J, *et al.* High prevalence of growth plate gene variants in children with familial short stature treated with GH. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2019 **104** 4273–4281. (<https://doi.org/10.1210/jc.2018-02288>)
 - 10 Sentchordi-Montane L, Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Diaz-Gonzalez F, Modamio-Hoybjor S, de la Torre C, Nevado J, Ruiz-Ocana P, Bezanilla-Lopez C, Prieto P, *et al.* High prevalence of variants in skeletal dysplasia associated genes in individuals with short stature and minor skeletal anomalies. *European Journal of Endocrinology* 2021 **185** 691–705. (<https://doi.org/10.1530/EJE-21-0557>)
 - 11 Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, Miller TC, Moon JE, Derr MA, Hwa V, Hirschhorn JN & Dauber A. Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 **98** E1428–E1437. (<https://doi.org/10.1210/jc.2013-1534>)
 - 12 Freire BL, Homma TK, Funari MFA, Lerario AM, Vasques GA, Malaquias AC, Arnhold IJP & Jorge AAL. Multigene sequencing analysis of children born small for gestational age with isolated short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2019 **104** 2023–2030. (<https://doi.org/10.1210/jc.2018-01971>)
 - 13 Fan X, Zhao S, Yu C, Wu D, Yan Z, Fan L, Song Y, Wang Y, Li C, Ming Y, *et al.* Exome sequencing reveals genetic architecture in patients with isolated or syndromic short stature. *Journal of Genetics and Genomics* 2021 **48** 396–402. (<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.02.008>)
 - 14 Perchard R, Murray PG, Payton A, Highton GL, Whatmore A & Clayton PE. Novel mutations and genes that impact on growth in short stature of undefined aetiology: the EPIGROW study. *Journal of the Endocrine Society* 2020 **4** bvaa105. (<https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa105>)
 - 15 Yang L, Zhang C, Wang W, Wang J, Xiao Y, Lu W, Ma X, Chen L, Ni J, Wang D, *et al.* Pathogenic gene screening in 91 Chinese patients with short stature of unknown etiology with a targeted next-generation sequencing panel. *BMC Medical Genetics* 2018 **19** 212. (<https://doi.org/10.1186/s12881-018-0730-6>)
 - 16 Li X, Yao R, Chang G, Li Q, Song C, Li N, Ding Y, Li J, Chen Y, Wang Y, *et al.* Clinical profiles and genetic spectra of 814 Chinese children with short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2022 **107** 972–985. (<https://doi.org/10.1210/clinem/dgab863>)
 - 17 Kuczumarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, Mei Z, Curtin LR, Roche AF & Johnson CL. CDC growth charts: United States. *Advance Data* 2000 **314** 1–27.
 - 18 Leppig KA, Werler MM, Cann CI, Cook CA & Holmes LB. Minor malformations: significant or insignificant. *American Journal of Diseases of Children* 1988 **142** 1274. (<https://doi.org/10.1001/archpedi.1988.02150120028024>)
 - 19 Collett-Solberg PF, Ambler G, Backeljauw PF, Bidlingmaier M, Biller BMK, Boguszewski MCS, Cheung PT, Choong CSY, Cohen LE, Cohen P, *et al.* Diagnosis, genetics, and therapy of short stature in children: a Growth Hormone Research Society international perspective. *Hormone Research in Paediatrics* 2019 **92** 1–14. (<https://doi.org/10.1159/000502231>)
 - 20 Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Liborio DC, Kim CA, Arnhold IJ & Mendonca BB. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clinical Endocrinology* 2007 **66** 130–135. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02698.x>)
 - 21 Vasques GA, Amano N, Docko AJ, Funari MF, Quedas EP, Nishi MY, Arnhold IJ, Hasegawa T & Jorge AA. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 **98** E1636–E1644. (<https://doi.org/10.1210/jc.2013-2142>)
 - 22 Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, Aza-Carmona M, Sentchordi-Montane L, Barraza-Garcia J, Lerario AM, Yamamoto GL, Naslavsky MS, Duarte YAO, *et al.* IHH gene mutations causing short stature with nonspecific skeletal abnormalities and response to growth hormone therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2018 **103** 604–614. (<https://doi.org/10.1210/jc.2017-02026>)
 - 23 Ferreira LV, Souza SA, Arnhold IJ, Mendonca BB & Jorge AA. PTPN11 (protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11) mutations and response to growth hormone therapy in children with Noonan syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005 **90** 5156–5160. (<https://doi.org/10.1210/jc.2004-2559>)
 - 24 Fredriks AM, van Buuren S, van Heel WJ, Dijkman-Neerincx RH, Verloove-Vanhorick SP & Wit JM. Nationwide age references for sitting height, leg length, and sitting height/height ratio, and their diagnostic value for disproportionate growth disorders. *Archives of Disease in Childhood* 2005 **90** 807–812. (<https://doi.org/10.1136/adc.2004.050799>)
 - 25 Pyle SI & Greulich WW. *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. 272 p. Stanford: Stanford University Press, 1959.
 - 26 Inoue-Lima TH, Vasques GA, Scalco RC, Nakaguma M, Mendonca BB, Arnhold IJP & Jorge AAL. IGF-1 assessed by pubertal status has the best positive predictive power for GH deficiency diagnosis in peripubertal children. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2019 **32** 173–179. (<https://doi.org/10.1515/jpem-2018-0435>)
 - 27 Funari MFA, de Barros JS, Santana LS, Lerario AM, Freire BL, Homma TK, Vasques GA, Mendonca BB, Nishi MY & Jorge AAL. Evaluation of SHOX defects in the era of next-generation sequencing. *Clinical Genetics* 2019 **96** 261–265. (<https://doi.org/10.1111/cge.13587>)
 - 28 Li J, Lupat R, Amarasinghe KC, Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, Tothill RW, Halgamuge SK, Campbell IG & Goringe KL. CONTRA: copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics* 2012 **28** 1307–1313. (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts146>)

- 29 Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020 **581** 434–443. (<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>)
- 30 Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, Bozoklian D, Sandberg TOM, Brito LA, Lazar M, *et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Human Mutation* 2017 **38** 751–763. (<https://doi.org/10.1002/humu.23220>)
- 31 Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, Funari MFA, Nishi MY, Narcizo AM, Benedetti AFF, Oba-Shinjo SM, Vitorino AJ, Santos RASXD, *et al.* SELAdb: a database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics* 2020 **75** e1913. (<https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e1913>)
- 32 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015 **17** 405–424. (<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>)
- 33 Hattori A, Katoh-Fukui Y, Nakamura A, Matsubara K, Kamimaki T, Tanaka H, Dateki S, Adachi M, Muroya K, Yoshida S, *et al.* Next generation sequencing-based mutation screening of 86 patients with idiopathic short stature. *Endocrine Journal* 2017 **64** 947–954. (<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0150>)
- 34 Huang Z, Sun Y, Fan Y, Wang L, Liu H, Gong Z, Wang J, Yan H, Wang Y, Hu G, *et al.* Genetic evaluation of 114 Chinese short stature children in the next generation era: a single center study. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018 **49** 295–305. (<https://doi.org/10.1159/000492879>)
- 35 Dauber A. Genetic testing for the child with short stature-has the time come to change our diagnostic paradigm? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2019 **104** 2766–2769. (<https://doi.org/10.1210/jc.2019-00019>)
- 36 Plachy L, Dusatkova P, Maratova K, Petruzelkova L, Elblova L, Kolouskova S, Snajderova M, Obermannova B, Zemkova D, Sumnik Z, *et al.* Familial short stature – a novel phenotype of growth plate collagenopathies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2021 **106** 1742–1749. (<https://doi.org/10.1210/clinem/dgab084>)
- 37 Narayanan DL, Udyawar D, Kaur P, Sharma S, Suresh N, Nampoothiri S, do Rosario MC, Somashekar PH, Rao LP, Kausthubham N, *et al.* Multilocus disease-causing genomic variations for Mendelian disorders: role of systematic phenotyping and implications on genetic counselling. *European Journal of Human Genetics* 2021 **29** 1774–1780. (<https://doi.org/10.1038/s41431-021-00933-7>)
- 38 Correa FA, Franca MM, Fang Q, Ma Q, Bachega TA, Rodrigues A, Ozel BA, Li JZ, Mendonca BB, Jorge AAL, *et al.* Growth hormone deficiency with advanced bone age: phenotypic interaction between GHRH receptor and CYP21A2 mutations diagnosed by sanger and whole exome sequencing. *Archives of Endocrinology and Metabolism* 2017 **61** 633–636. (<https://doi.org/10.1590/2359-3997000000311>)

Received in final form 4 October 2022


Accepted 12 October 2022

Accepted Manuscript published online 12 October 2022



Review

Idiopathic Short Stature: What to Expect from Genomic Investigations

Nathalia Liberatoscioli Menezes Andrade ¹, Laurana Polli Cellin ¹, Raissa Carneiro Rezende ¹, Gabriela Andrade Vasques ² and Alexander Augusto Lima Jorge ^{2,*} 

¹ Unidade de Endocrinologia Genetica (LIM25), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo 05403-000, Brazil

² Unidade de Endocrinologia Genetica (LIM25) e Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo 05403-000, Brazil

* Correspondence: alexj@usp.br

Abstract: Short stature is a common concern for physicians caring for children. In traditional investigations, about 70% of children are healthy, without producing clinical and laboratory findings that justify their growth disorder, being classified as having constitutional short stature or idiopathic short stature (ISS). In such scenarios, the genetic approach has emerged as a great potential method to understand ISS. Over the last 30 years, several genes have been identified as being responsible for isolated short stature, with almost all of them being inherited in an autosomal-dominant pattern. Most of these defects are in genes related to the growth plate, followed by genes related to the growth hormone (GH)–insulin-like growth factor 1 (IGF1) axis and RAS-MAPK pathway. These patients usually do not have a specific phenotype, which hinders the use of a candidate gene approach. Through multigene sequencing analyses, it has been possible to provide an answer for short stature in 10–30% of these cases, with great impacts on treatment and follow-up, allowing the application of the concept of precision medicine in patients with ISS. This review highlights the historic aspects and provides an update on the monogenic causes of idiopathic short stature and suggests what to expect from genomic investigations in this field.



Citation: Andrade, N.L.M.; Cellin, L.P.; Rezende, R.C.; Vasques, G.A.; Jorge, A.A.L. Idiopathic Short Stature: What to Expect from Genomic Investigations. *Endocrines* **2023**, *4*, 1–17. <https://doi.org/10.3390/endocrines4010001>

Academic Editor: Tomohiro Ishii

Received: 1 November 2022

Revised: 7 December 2022

Accepted: 3 January 2023

Published: 9 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: short stature; idiopathic short stature; genetic analysis

1. Introduction

Short stature is a common concern for physicians caring for children and is defined as having a height exceeding 2 standard deviations (SD) below the corresponding mean for a given age, sex, and population group. Based on this definition, short stature affects 2.3% of children [1]. In the traditional approach taken to investigate the cause of growth deficiencies, these children undergo an extensive medical evaluation searching for hormonal etiologies or other chronic medical conditions. However, previous studies have shown that a standard medical evaluation does not often lead to a diagnosis in a healthy child whose only positive finding based on anamnesis and a physical examination is short stature [2,3]. In about 70% of cases of short stature evaluations, the children are healthy, without clinical and laboratory findings that explain their growth disorder, being classified as having constitutional short stature or idiopathic short stature (ISS) [2,4,5]. This scenario has been changing with the improvement of the genetic sequencing techniques, which have made it possible to diagnose 10–30% of these children, providing an answer to the cause of their isolated short stature [6–13]. This review provides an update on the monogenic causes of idiopathic short stature and indicates what to expect from the genomic investigation in this field.

2. Materials and Methods

2.1. Search Strategy

We conducted a systematic literature review to identify studies reporting the use of genetic sequencing approaches in the investigation of idiopathic short stature. We searched the PubMed® databases and included studies from 1960 to November 2022.

2.2. Eligibility Criteria

We searched the literature for review, observational studies, and clinical studies that included genetic data about children classified as having idiopathic short stature. The key words “idiopathic short stature” and “genetics” were screened, and 6421 results were found. We excluded in this analysis books, documents, and papers that were not written in English, with 1026 results remaining. We considered as the most relevant articles those that encompassed large cohorts and used a multigene sequencing analysis for idiopathic short stature. We chose articles that addressed the term idiopathic short stature for the first time to discuss historical aspects and the most relevant articles that addressed genetic aspects related to idiopathic short stature in the last 20 years.

3. Historic Aspects of Idiopathic Short Stature

The term idiopathic is often used to relate to or to denote any disease or condition that arises spontaneously or without any known cause [14]. It is usually a diagnosis of exclusion, but it is unclear what minimum investigation should be carried out to define a condition as idiopathic. Therefore, many medical specialties have difficulties in defining this term [15]. In the context of short stature, it is hard to determine when the term idiopathic was first used in the medical literature concerning children with a growth disorder. To the best of our knowledge, the first time that this concept was reported was in 1964 in a paper that described the growth response to pituitary growth hormone (GH) [16]. In this study, the author explained the following: “The remainder of the patients could presumably be forced into various ill-defined groups, called primordial, ateliotic, constitutional, hypocaloric, or low-birth-weight dwarfs [16]. However, there is still much doubt if these terms delineate what has been posteriorly called “idiopathic growth failure”. In 1968, Edelmann et al. used the term “idiopathic growth retardation”, referring to children with growth retardation, with no determined etiology [17]. In the early 1970s, the term idiopathic short stature (ISS) appeared in the medical literature for the first time [18,19]. However, the term included patients with short stature regardless of birth weight or length, and it was generally used to describe growth disorders of an unknown cause. In 1996, after a consensus meeting, it was defined that children with ISS would be those with adequate birth weight and length for gestational age (>-2 SDS), without body disproportion, without evidence of chronic organic diseases, without psychiatric illnesses, with adequate nutrition, and without evidence of endocrine deficiencies, including GH [20]. Since then, the term has been widely used in clinical practice and was reinforced by the consensus study published in 2008 [21]. Nevertheless, these consensus preceded the expansion of genetic studies in growth disorders [22]. Nowadays, more than 900 papers on PubMed address genetic studies involving children with ISS. Several of these studies described genes in which rare deleterious variants cause short stature without other characteristics or only with subtle phenotypes. These genes are mainly involved in the GH/insulin-like growth factor (*IGF-1*) axis and growth plate physiology [23], challenging the continued use of the term ISS.

4. Genetic Basis of Idiopathic Short Stature

Human height has a high degree of heritability, indicating that genetic factors are one of the main determinants of height [24]. Environmental aspects also contribute to height variability. Studies that evaluated the growth pattern of twins showed an increasing pattern of height heritability with age, being low in early childhood and up to 0.68–0.94 at older ages [25]. This genetic influence on height is attributed to a complex combination of multiple genes and variants in a typical pattern of a polygenic trait.

Based on these concepts, the genetic evaluation emerged as a great potential tool to understand ISS. In recent years, several genome-wide association studies (GWAS) have identified more than 12,000 common variants affecting adult height [21,24,26]. Each of these common variants (minor allele frequency (MAF) \geq 5%) has a low impact on height variability (less than 1–2 mm), whereas rare variants (MAF $<$ 1%) were associated with having a greater impact on height (around 20 mm) [27,28]. Thus, the combination of common and rare variants explains the height variability in the general population and those with short stature without other clinical manifestations in a polygenic model that is classically used to explain ISS [26,29].

In contrast to the polygenic nature presented above, more extreme phenotypes of short stature or syndromic growth disorders are often associated with monogenic conditions [30,31]. The first described monogenic cause of short stature was severe isolated growth hormone (GH) deficiency. In 1981, it was shown that a deletion of the *GHI* gene caused complete GH deficiency and severe short stature [32]. In the last 40 years, hundreds of genes involved in syndromes associated with growth impairment have been identified [31]. These children and their families carried extremely rare variants with a great effect on the phenotype, usually with syndromic characteristics and Mendelian inheritance [28]. However, over the last 30 years, several genes have been identified as responsible for isolated short stature, almost all of them following an autosomal-dominant inheritance pattern [6,33–47] (Table 1). This background is helping us better understand the genetic basis of short stature in non-syndromic individuals.

Table 1. The genes related to “idiopathic short stature” as a monogenic component.

Gene	Year of Description in ISS	Prevalence in ISS	Evidence	Observation	Ref
<i>GHR</i>	1995	5%	Limited	Laboratory findings suggestive of partial GH insensitivity	[33,48]
<i>SHOX</i>	1997	2.4%	Definitive	Short stature with mild body disproportion	[49]
<i>GHI</i>	2003	No data	Limited	Severe postnatal short stature, normal to elevated GH peaks in stimulation tests, and low levels of <i>IGF-1</i> and IGFBP-3	[35]
<i>IGF1R</i>	2003	No data	Moderated	The majority were born small for their gestational age and had high levels of <i>IGF-1</i>	[36,50,51]
<i>IGFALS</i>	2004	No data	Limited	Severe deficiency of <i>IGF1</i> and IGFBP-3, disproportional to the severity of short stature	[52]
<i>GHSR</i>	2006	Only case report	Limited	Associated with GHD and short stature in the same family	[38,53]
<i>NPR2</i>	2013	2 to 13.6%	Strong	Proportional or disproportional short stature and unspecified skeletal findings at time of X-ray of bone age	[39]
<i>PTPN11</i>	2013	Only case report	Limited	Short stature with or without mild phenotype of Noonan syndrome	[6]
<i>IGF1</i>	2013	No data	Limited	Variable degree of pre- and postnatal growth retardation with serum <i>IGF-1</i> at the lower end of normal	[40]
<i>ACAN</i>	2014	No data	Moderated	Short stature with or without advanced bone age	[41]

Table 1. Cont.

Gene	Year of Description in ISS	Prevalence in ISS	Evidence	Observation	Ref
<i>FGFR3</i>	2015	Only one case report	Limited	Only one family described with proportional short stature	[42]
<i>PAPP-A2</i>	2016	Only case report	Limited	High levels of <i>IGF-1</i> and <i>IGFBP-3</i>	[43]
<i>NPPC</i>	2018	No data	Limited	Brachydactyly	[44]
<i>IHH</i>	2018	3.3%	Moderated	Proportional or disproportional short stature, with or without unspecific skeletal findings as shortening of middle phalanges of the 2nd and 5th digits	[45]
<i>STAT5B</i>	2018	Only case report	Limited	Eczema and laboratory results suggestive of partial GH insensitivity	[46]
<i>NF1</i>	2019	No data	Limited	Short stature without clinical features of neurofibromatosis	[54]
<i>COL2A1</i>	2021	5.7%	Limited	Unspecific skeletal findings and disproportionate short stature	[47]

5. Genes Related to “Idiopathic Short Stature”: Monogenic Conditions

5.1. Genes Related to the GH-IGF1 Axis

The GH/*IGF-1* axis is an essential postnatal growth regulator. One of the main criteria for classifying a child as having ISS is to exclude a diagnosis of GH deficiency [55]. The other axis defects are rare conditions, often causing extreme short stature and likely to be well characterized by the hormonal profile [56]. However, defects involving this axis can also cause remaining growth disorder phenotypes, often labeled as ISS.

5.1.1. *GH1*

In addition to the inherent difficulty in ruling out GH deficiency in children with short stature [22,57], the role of bioinactive GH molecules has long been postulated [58,59]. Specific mutations in *GH1* make GH unable to activate its receptor but it retains its ability to be detected by GH assays. Few patients with biologically inactive GH have been described in the literature [60–63]. The patients usually have severe postnatal short stature (height SDS < −3) without significant dysmorphisms. A laboratory evaluation of these patients demonstrated a normal to elevated GH peak in stimulation tests and low levels of *IGF-1* and *IGFBP-3*. The improvement in growth velocity and the increase in *IGF-1* levels during short- and long-term rhGH therapy differentiates these children from those with insensitivity to GH [62]. Despite representing an extreme form of short stature, these patients can be classified as ISS, and only the identification of the genetic variant in *GH1* allows the correct determination of the etiology of the growth disorder [35].

5.1.2. *GHR*

Classically, biallelic mutations in the GH receptor gene (*GHR*) cause complete insensitivity to GH (GHI) or Laron syndrome, a severe inability to respond to endogenous or exogenous GH with particular growth and metabolic effects [64]. Patients with the classical GHI phenotype have severe postnatal short stature, elevated basal and stimulated GH levels, and extremely low *IGF-1*/*IGFBP-3* levels that do not increase after rhGH use. Studies in the 1990s suggested that children classified as having ISS could have partial forms of GHI, with low *IGF-1* and GH binding protein (GHBP) values and high mean 12-h GH values [65]. In humans, GHBP is generated by the cleavage of *GHR* found on the cell surface, which reflects the expression of this receptor. Over the years, it has become clear that GH insensitivity occurs across a broad spectrum of severity [66]. In 1994, a *GHR* mutation was

first reported in patients classified as ISS [33]. In this study, the author evaluated *GHR* in 14 ISS children with low GHBP and identified three patients with heterozygous and one with compound heterozygous *GHR* variants. Following this study, several others described patients with ISS and heterozygous variants of *GHR*. However, many of these variants would not be classified as pathogenic under the current criteria in variant analyses [67]. As *GHR* haploinsufficiency causes a slight reduction in height (around 4 cm) [68], only variants with a dominant negative effect can relate to short stature with autosomal dominant inheritance [69].

5.1.3. *GHSR*

Ghrelin is a brain–gut peptide that acts by binding to the growth hormone secretagogue receptor (*GHSR*) [70]. Beyond its action in energy metabolism and the regulation of appetite, this peptide was also related to bone formation and growth hormone release. The active form of *GHSR* is expressed predominantly in the pituitary and hypothalamus. Studies suggest that ghrelin regulates GH secretion, through *GHSR*, in an endocrine pathway distinct from GHRH and somatostatin, and contributes to the control of pulsatile GH release [71], with a high degree of constitutive activity in vitro. In 2006, Pantel et al. reported a *GHSR* missense variant in two unrelated families with short stature, demonstrating that this defect resulted in decreased receptor expression and selectively impaired the constitutive activity of the *GHSR*, whereas it preserved the ability for ghrelin response [38]. Homozygous and heterozygous defects in the *GHSR* gene were associated with ISS and with GH deficiencies of variable severity and penetrance. Both phenotypes were even described in the same family [38]. Additionally, heterozygous *GHSR* defects were also related to constitutional delays in growth and puberty [72]. This heterogeneity in the clinical presentation may be partially explained by the gene defects causing protein alterations that affect the binding affinity to ghrelin and the constitutive activity of the receptor itself. However, the role of *GHSR* variants in growth disorders is still a matter of debate.

5.1.4. *STAT5B*

The signal transducer and activator of transcription 5B (*STAT5B*) is an important cytoplasmic protein in the *GHR* signaling pathway. *STAT5B* is responsible for increases in the expression of several GHR-stimulated genes, such as *IGF1*, its binding protein (IGFBP-3), and the acid labile subunit (ALS) [73]. A homozygous inactivating mutation in the *STAT5B* gene was first described in 2003 as a rare cause of growth hormone insensitivity in a patient with severe short stature and immunodysfunction [74]. Individuals heterozygous for loss-of-function (LoF) mutations in *STAT5B* have a mean negative impact of 3.9 cm in their height, usually resulting in their stature being within the normal range [75]. Collaborating with the idea of a spectrum of effects on height, in 2018, three heterozygous *STAT5B* mutations with dominant negative effects were described in eleven individuals from three unrelated families. The probands had variable degrees of short stature, with the laboratory evaluations being suggestive of mild GHI, elevated IgE, and eczema [46]. These data have identified *STAT5B* as a gene that can be associated with ISS.

5.1.5. *IGF1* and *IGF1R*

IGF-1 is essential in intrauterine and postnatal growth, acting through a tyrosine kinase receptor, *IGF-1R*. Patients with LoF homozygous mutations in *IGF1* or *IGF1R* experience prenatal-onset growth impairments, failure to thrive, microcephaly, and developmental delays [76]. While patients with *IGF1* defects have extremely low levels of *IGF-1*, those with *IGF1R* defects show an elevation of this hormone. Both genetic defects cause normal to high concentrations of basal and stimulated GH [76]. The defects in heterozygosity in *IGF1* or *IGF1R* have a much more variable clinical presentation. With the increase in cases with defects in these genes, some patients can be labeled as having ISS. Some cases of heterozygous LoF mutations in *IGF1* were described; these patients had variable degrees of pre- and postnatal growth retardation with serum *IGF-1* at the lower end of the normal

range due to *IGF1* haploinsufficiency [40]. Although most patients fit into the classification of children born small for gestational age (SGA) and have associated microcephaly, some patients may fit into the ISS classification. Heterozygous mutations in *IGF1R* were more frequent than in its ligand but showed similar broad clinical variability levels [77,78]. Some affected patients are born with weight and length within the lower reference limits and develop short stature during childhood, with normal to elevated *IGF-1* values at baseline, which rise above the reference values during GH treatment [50,79]. Thus, heterozygous defects in *IGF1* or *IGF1R* may be present in children classified as having ISS, being more likely in cases when the birth weight or length is at the lower limit of normality.

5.1.6. Ternary Complex Defects (*IGFALS* and *PAPP-A2*)

Most circulating *IGF-1* is found in a ternary complex bound with IGFBP-3 and ALS (acid labile subunit). This complex is important in extending the serum *IGF-1* half-life and decreasing its bioavailability at the tissue level [80]. Homozygous or compound heterozygous defects in the *IGFALS* cause human acid labile subunit (ALS) deficiencies. This condition causes a mild phenotype of GHI, characterized by moderate postnatal growth impairment, pubertal delay, normal or even increased GH, and a marked reduction in the levels of *IGF-1* and IGFBP-3, which remain low after GH treatment [52,80,81]. Heterozygous carriers of *IGFALS* gene mutations have a partial ALS deficiency, resulting in less than 1.0 SD of height loss and generally not causing short stature [82]. One study showed that the frequency of rare *IGFALS* variants in children with ISS is 3 times higher than in normal height controls, suggesting that defects in heterozygosity in this gene may contribute to short stature and low *IGF-1* levels in some children with ISS [37].

Also related to the ternary complex, pregnancy-associated plasma protein A2 (*PAPP-A2*) is a serum and tissue protease responsible for the proteolysis of IGFBPs, releasing *IGF-1* from the ternary complex [83]. *PAPP-A2* specifically cleaves IGFBP-3 and -5, so the loss of *PAPP-A2* function leads to increased serum concentrations of IGFBP-3 and IGFBP-5 and total concentrations of *IGF-1*, decreasing the bioactive *IGF-1*. Until now, few families with homozygous LoF mutations in *PAPPA2* have been described [43,84]. In addition to their variable degrees of short stature, some patients had microcephaly, thin long bones, low bone mineral density, and insulin resistance. They also presented with markedly elevated serum concentrations of *IGF-1* and IGFBP-3. As the clinical findings are relatively non-specific, some patients with *PAPPA2* defects may be classified as having ISS if a more detailed hormonal assessment is not performed [83].

5.2. Genes That Regulate Growth Plate Physiology

Longitudinal growth depends on the endochondral ossification process in the growth plate. This process involves proliferation, hypertrophy, and the senescence of chondrocytes and cartilage matrix synthesis [85]. The regulation of the entire physiology of the growth plate involves several paracrine and autocrine factors, and defects in genes encoding any of these factors or their respective receptors, inherited in an autosomal dominant manner, can cause a variable phenotype form of isolated short stature with or without mild body disproportion [86]. In the last 20 years, growth-plate-related genes have become protagonists in studies related to ISS [87]. The most consistent and frequent findings were those involving short stature homeobox (*SHOX*) [34], natriuretic peptide receptor 2 (*NPR2*) [39], aggrecan (*ACAN*) [41], Indian hedgehog (*IHH*) [45], natriuretic peptide C (*NPPC*) [44], fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) [42], and collagen-related genes [47]. Each of these genes is responsible for a small proportion of cases of isolated SS (up to 2%), but this proportion may be significantly higher in familial short stature [6,27].

5.2.1. *SHOX*

SHOX is located on the pseudoautosomal region of sex chromosomes and is expressed in hypertrophic chondrocytes in the growth plate. *SHOX* is a transcription factor that increases *NPPB* and inhibits the expression of *FGFR3*, stimulating and coordinating the

proliferation and differentiation of chondrocytes. It also has an important role in the synthesis of the growth cartilage matrix through interactions with the *SOX* trio (*SOX9*, *SOX5*, and *SOX6* genes) [49]. Since its first description in 1997, *SHOX* gene haploinsufficiency has become the leading monogenic cause of short stature (1–10% of non-syndromic short stature cases) [34,49].

It is known that defects in this gene comprise an enormous phenotypic variability ranging from isolated short stature with or without mild body disproportion to Leri–Weill dyschondrosteosis (LWD), a type of skeletal dysplasia characterized by mesomelia and Madelung deformity [88]. Despite being recognized, its phenotypic variability still needs to be better understood. Most genetic defects related to the *SHOX* gene (>70%) are deletions involving the whole gene or its regulatory regions. Although the genotype–phenotype correlation is still a matter of debate, deletions in downstream *SHOX* enhancers have been associated with a milder phenotype (variable degrees of short stature, with milder body disproportions and the absence of Madelung deformity) [89]. The growth impairments in *SHOX* haploinsufficiency are variable, but longitudinal follow-up studies suggest the presence of a growth retardation in early life with birth lengths in the lower range of normality, a relatively well-preserved prepubertal growth, an attenuated pubertal growth spurt, and a frequent short adult height. The loss of growth potential observed in these patients suggests an additional effect of estrogens in the presence of *SHOX* defects, which lead to premature fusion of the growth plate. A few studies suggest that recombinant human growth hormone (rhGH) therapy (with or without GnRH analog treatment) can improve the adult height of patients with *SHOX* haploinsufficiency by up to 1 SDS of height [90–93].

5.2.2. *NPR2* and *NPPC*

In the last 10 years, the C-type natriuretic peptide (CNP) system and its receptor (NPR-B), encoded by the *NPPC* and *NPR2* genes, respectively, have been identified as important regulators of the endochondral ossification process. The CNP/NPR-B system stimulates the proliferation and differentiation of chondrocytes and the synthesis of the growth plate matrix in an autocrine and paracrine manner. This action is partially explained by the inhibition of the *FGFR3* pathway. Only two families, with short stature and small hand phenotypes, have been described as having heterozygous *NPPC* mutations [44]. In contrast, numerous descriptions of patients with homozygous *NPR2* defects have been made.

Biallelic mutations in *NPR2* lead to acromesomelic dysplasia of the Maroteaux type, a skeletal dysplasia characterized by severe mesomelic short stature and abnormalities in the phalanges and metacarpals [94]. Heterozygous mutations in *NPR2* have been described in cohorts of children with idiopathic short stature (with frequency rates ranging from 1.8 to 13.6%) [82]. These patients have variable degrees of height deficit and progressive short stature with increasing loss of height potential with age [95]. In addition to short stature, these patients may also have mild body disproportion and nonspecific skeletal findings such as short metacarpals [39,96]. Treatment with rhGH promotes short-term height gains, but the data on the final height in treated patients are not yet available [97].

5.2.3. *ACAN*

Aggrecan, which is encoded by the *ACAN* gene, is a major proteoglycan component in the extracellular matrix of the growth plate and articular cartilage. Biallelic defects in *ACAN* cause Spondyloepimetaphyseal dysplasia, while alterations in the heterozygous state account for a less severe and more variable phenotype [98]. Since 2014, more than 100 variants have been described in the *ACAN* gene [41,99–102]. Usually, these patients have a severe to mild proportional short stature with advanced bone age in the prepubertal period, which leads to premature growth arrest after the onset of puberty, causing a deficit in adult height. The premature maturation of hypertrophic chondrocytes and the early invasion of growth plates by blood vessels and osteoblasts are proposed mechanisms for advanced bone age, early epiphyseal fusion, and premature growth arrest in patients with

ACAN mutations [41]. Despite being a striking feature, it is not found in all patients [103]. Due to its presence in the articular cartilage, the patients may also present with early-onset osteoarthritis, which is more common by the fourth decade of life, mainly affecting the knees, with variable degrees of severity [102]. The limited data about growth patterns show that pubertal spurts may be impaired due to advancing bone age, which lead to a short adult height. Thus, these patients could benefit from puberty blocking and rhGH therapy [99,104].

5.2.4. *IHH*

The Indian hedgehog gene (*IHH*) is expressed in prehypertrophic cartilage chondrocytes and coordinates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral bone development [93]. Defects in the *IHH* gene have already been recognized as a cause of skeletal dysplasias in homozygosis (acrocapitofemoral dysplasia) and in heterozygosis (brachydactyly type A1, BDA1) [94]. More recently, heterozygous *IHH* mutations have been reported as a very frequent cause of short stature (frequency of 3.4%), with mild body disproportion and non-specific skeletal abnormalities such as brachymesophalangia-V (BMP-V, shortening of the middle phalanx of the fifth digit of varying degree) [33,95]. Despite being frequent in the general population (12.1%), BMP-V is a very common finding (64.3%) in hand radiographs of individuals with heterozygous mutations in *IHH* [33]. While the *IHH* mutations responsible for BDA1 are always missense and in the same domain of the protein, the mutations causing ISS are distributed throughout the gene and can also be LoF, suggesting a mechanism of haploinsufficiency. A short-term good response to rhGH has been described in these patients [33].

5.2.5. *FGFR3*

The fibroblast growth factor receptor-3 (*FGFR3*) pathway acts as a negative regulator of growth plate chondrogenesis. Heterozygous gain-of-function mutations in *FGFR3* are recognized as causing achondroplasia and hypochondroplasia. Achondroplasia is clinically characterized by severe disproportionate short stature with rhizomelia [105]. On the other hand, hypochondroplasia is generally less severe and has a wider phenotypic variability [106]. Although body disproportion is expected in patients with hypochondroplasia, some children may not be diagnosed in the first evaluation. These children may not yet have radiographic findings suggestive of a skeletal defect or may have a slight body disproportion, which can only be recognized through the sitting height/total height ratio. As such, they are often classified as having idiopathic short stature, demonstrating the variable spectrum of the phenotype [107]. Corroborating this hypothesis, a recent study identified an activating mutation of *FGFR3* causing autosomal proportional familial short stature without other specific findings [42].

5.2.6. *COL2A1* and Other Collagen Genes

Collagens are the main structural components of the extracellular matrix, with type II collagen being the main collagen synthesized by chondrocytes. This type of collagen is found in the vitreous humor, inner ear, nucleus pulposus, and mainly in the growth cartilage, and is essential for the endochondral ossification process. Mutations in the *COL2A1* gene interfere with the grouping of type II collagen molecules, causing varying degrees of skeletal dysplasia and some types of eye disorders. More than 16 syndromic conditions have been associated with collagen gene defects [108]. Some of these may present with short stature and unspecific skeletal alterations. However, due to the great variability and overlapping phenotypes, mainly in *COL2A1*, *COL11A1*, and *COL11A2*-related disorders, some mutations in collagen genes have already been reported in ISS cohorts [12,31,109–111]. In a recent study, Plachy et al. found 9 collagen genes variants (*COL2A1*, *COL11A1*) in 17 patients (11.5%) in a cohort of familial short stature patients that were treated with growth hormone therapy, reinforcing the role of these genes in genetic causes of short stature usually classified as idiopathic [47].

5.3. Genes Related to RAS-MAPK Pathway

Increased signal transduction through the mitogen-activated protein kinase (RAS-MAPK) cascade is a common molecular mechanism that characterizes a heterogeneous group of syndromes classified as RASopathies. Noonan syndrome is the main representative of this group and has short stature as one of its clinical criteria. However, there is a wide spectrum of genetic variability among individuals, and their phenotype–genotype correlations are not fully established, even within the same family. Another challenge in the diagnosis is that even in the presence of typical dysmorphisms, they can undergo changes according to age group, which often makes the clinical diagnosis even more difficult; these children can be classified as having idiopathic short stature due to their attenuated phenotype. Pathogenic variants in genes related to the RAS-MAPK pathway have already been identified in cohorts of patients with idiopathic short stature, with the diagnosis often being only possible using a genetic approach.

5.3.1. *PTPN11*

The protein–tyrosine phosphatase non-receptor type 11 gene (*PTPN11*) encodes the non-receptor Src-homology 2 (SH2) domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2). SHP2 participates in multiple intracellular signaling pathways, including the Ras/MAPK cascade. Heterozygous mutations in *PTPN11* cause Noonan syndrome (NS), characterized by reduced postnatal growth, congenital heart disease, and facial dysmorphisms [112]. Usually, children can also present with low serum *IGF-1* levels, which reflects some degree of GH insensitivity [113]. Although most children harboring *PTPN11* variants have some clinical features of Noonan syndrome, there is a wide variability in clinical presentation, even in patients with the same genetic variant [100]. In addition, some mutations have a less intense effect (hypomorphic) and a more discrete phenotype [114]. Based on this, *PTPN11* variants have been increasingly described in studies evaluating multiple genes in ISS in children without other clinical criteria of Noonan syndrome [6,11,12,54]. This can be partially explained by the important changes in craniofacial features with age, which sometimes can make a clinical diagnosis of NS challenging. Children with *PTPN11* variants in the milder end of the NS phenotypic spectrum can also be classified as having ISS. The identification of a pathogenic variant in *PTPN11* in a child with isolated short stature has evident impacts on the follow-up and treatment.

5.3.2. *NF1*

Neurofibromin 1 (*NF1*) is a gene related to the RAS-MAPK pathway that encodes neurofibromin, a RAS-specific guanosine triphosphatase (GTPase)-activating protein that converts active GTP-bound RAS to inactive GDP-bound RAS. The inactivation of neurofibromin leads to the hyperactivation of RAS and contributes through other mediators to cell and growth proliferation related to the formation of tumors. The classic presentation of patients who carry variants in the *NF1* gene includes café au lait spots, cutaneous or plexiform neurofibromas, and Lisch nodules in the iris. Intellectual disabilities, vasculopathies, optic gliomas, and increased risk of nervous system tumors, and short stature may be present, which can often suggest a Noonan-like phenotype [115]. Due to having the same phenotypic variability and the fact that the clinical features can change during childhood, *NF1* variants have been found in cohorts of children with ISS, making it a gene to be enrolled in the genetic investigation of patients with isolated phenotypes [54]. Additionally, these data highlight the importance of a genetic diagnosis, as it has a great impact on the clinical follow-up as well as on the decision to start growth hormone therapy in these patients.

6. Conclusions and What to Expect from Genomic Investigations

In the last 20 years, the investigations of children with short stature have been changing considerably. The genetic approach has gained importance and emerged as a potential method to establish the etiology of growth impairment. Since the 1950s, when the kary-

otype technique was developed and explained chromosomal abnormalities such as Down's syndrome and Turner's syndrome, a lot has changed. The chromosome microarray analysis (CMA) technique became frequently used due to its greater sensitivity in detecting submicroscopic copy number variants (CNVs, deletions, and duplications). A CMA can reveal a pathogenic CNV in approximately 10% of growth disorders, mainly in children with syndromic short stature of an unknown cause [116]. The identification of point variants (single-nucleotide variants and small insertions and deletions) has also undergone great developments, migrating rapidly from Sanger sequencing to next-generation sequencing (NGS). This new technology allows the sequencing of multiple regions and genes simultaneously and can include an analysis of CNVs, an in-target gene panel, and whole-exome sequencing (WES) or whole-genome sequencing (WGS).

The use of NGS-based techniques improves the diagnostic yield and better explains the genetic basis of the isolated short stature phenotype for patients initially classified as having ISS. Although the current guidelines suggest that the genetic test should preferably be conducted in syndromic conditions or when it is possible to determine a candidate gene [22,117], this approach is being challenged. Children classified as having ISS infrequently show signs that reliably allow a candidate gene investigation, and for this reason the multigene approach is a logical strategy to assess them. Additionally, it has been increasingly shown that a significant number of children with ISS have a monogenic form of short stature (Table 2). The average diagnostic rate of the multigene approach in ISS is around 12.5% (ranging from 8.7 to 19.5%) [12]. Finally, the costs of genetic tests and their analysis have demonstrated substantial and rapid improvements. The perspective is that in the near future, according to Moore's law, the price of human genome sequencing may drop quickly and considerably [118]. Consequently, a multigene approach (e.g., a targeted gene panel or WES) in children with ISS will soon become a good option, since it might save time and costs when used with other exams and provide an answer for a significant number of families about the cause of short stature, allowing the rapid identification of other affected family members.

Additionally, knowing the genetic basis of these patients' short stature can allow precise genetic counseling and clinical follow-up. This is particularly relevant to children harboring variants in the RAS-MAPK pathway. Moreover, the use of rhGH therapy in ISS is controversial, and at some point the genetic studies can support the use of this therapy. It is accepted that children with *SHOX* haploinsufficiency can improve their adult height with rhGH therapy [91,93]. Some preliminary data have already associated with a good short-term response to rhGH treatment in patients with variants in the *IHH* [45], *NPR2* [97], and *ACAN* [119] genes. The knowledge of the genetic basis of ISS has the potential to clarify the growth pattern and to trigger the development of specific treatment protocols, including the indication and the use of rhGH, natriuretic peptide analogs, or puberty modulators with the added benefit of permitting drug development through targeted therapy.

However, a substantial number of children with ISS remain undiagnosed, even after performing a WES analysis. Initially, we must remember that not every short child will be a short adult. Observational studies of children with ISS show that the majority show spontaneous catch-up growth [120]. These children are not expected to have genetic factors (mono- or polygenic) that cause short stature. Secondly, new genes associated with ISS need to be revealed. Furthermore, as height is a polygenic trait, it is expected that using a polygenic risk score (PRS) in combination with rare variants may increase the degree of knowledge about height determination, allowing the application of the concept of precision medicine in patients with ISS [26]. What we expect from the genomic investigation is that these diagnostic tools will be routinely offered and recommended in assessing children with ISS, so that we can close those gaps that remain open to so many families who seek our help.

Table 2. A review of multigene approach studies on “idiopathic short stature”.

Reference	Total Cohort	ISS Cohort	Methodology	Diagnostic Yield (Total Cohort)	Diagnostic Yield (ISS Cohort)	Discussion
Wang et al. (2013) [6]	192	14	Target gene panel with 1077 genes	4/192 (2%)	3/14 (21.4%)	Included syndromic children
Guo et al. (2014) [7]	14	3	Exome	5/14 (35.7%)	0	Only genes related to syndromic short stature
Hattori et al. (2017) [8]	86	86	Target gene panel with 10 genes	18 (20.9%)	18 (20.9%)	Excluded SGA and syndromic children
Hauer et al. (2018) [9]	200	13	Exome	38/200 (19%)	11/13 (84.6%)	134 children initially classified as having ISS but included children born SGA and with syndromic features
Freire et al. (2019) [10]	179	55	Target gene panel/exome	8/55 (14.5%)	8/55 (14.5%)	Included only children with isolated short stature born SGA
Perchard et al. (2020) [11]	263	18	Target gene panel	27/263 (10%)	5/18 (27.8%)	Included children with GH deficiency and dysmorphic features
Fan et al. (2021) [13]	561	257	Exome	135/561 (24%)	11.3% (29/257)	Included genes associated with hypopituitarism, skeletal dysplasia, and chronic and metabolic disorders with the positive results in the ISS group.
Sentchordi-Montané et al. (2021) [12]	108	108	Target gene panel	21/108 (19.4%)	12/108 (11.1%)	Skeletal dysplasia NGS panel and <i>SHOX</i> -related genes were excluded. Included children born SGA.
Andrade et al. (2022) [121]	102	102	Target gene panel	17/102 (16.7%)	17/102 (16.7%)	Only children classified as having ISS

Author Contributions: Conceptualization, A.A.L.J.; methodology and selection of manuscripts to be included in the review, A.A.L.J. and N.L.M.A.; writing—original draft preparation, N.L.M.A. and L.P.C.; writing—review and editing, R.C.R., G.A.V. and A.A.L.J.; supervision, A.A.L.J. and G.A.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Grant 303294/2020-5 (to A.A.L.J.) from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and by Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES; Finance Code 001 to N.L.M.A., L.P.C. and R.C.R.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: A.A.L.J. received an independent research grant from BioMarin and consulting fees from Novo Nordisk. The other authors declare that they have no competing financial interest to declare.

References

1. Visscher, P.M. Commentary: Height and Mendel’s theory: The long and the short of it. *Int. J. Epidemiol.* **2013**, *42*, 944–945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sisley, S.; Trujillo, M.V.; Khoury, J.; Backeljauw, P. Low Incidence of Pathology Detection and High Cost of Screening in the Evaluation of Asymptomatic Short Children. *J. Pediatr.* **2013**, *163*, 1045–1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Dauber, A. Genetic Testing for the Child With Short Stature—Has the Time Come To Change Our Diagnostic Paradigm? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 2766–2769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lindsay, R.; Feldkamp, M.; Harris, D.; Robertson, J.; Rallison, M. Utah Growth Study: Growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J. Pediatr.* **1994**, *125*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Voss, L.D.; Mulligan, J.; Betts, P.R.; Wilkin, T.J. Poor growth in school entrants as an index of organic disease: The Wessex growth study. *BMJ* **1992**, *305*, 1400–1402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wang, S.R.; Carmichael, H.; Andrew, S.F.; Miller, T.C.; Moon, J.E.; Derr, M.A.; Hwa, V.; Hirschhorn, J.N.; Dauber, A. Large-Scale Pooled Next-Generation Sequencing of 1077 Genes to Identify Genetic Causes of Short Stature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1428–E1437. [[CrossRef](#)]
7. Guo, M.H.; Shen, Y.; Walvoord, E.C.; Miller, T.C.; Moon, J.E.; Hirschhorn, J.N.; Dauber, A. Whole Exome Sequencing to Identify Genetic Causes of Short Stature. *Horm. Res. Paediatr.* **2014**, *82*, 44–52. [[CrossRef](#)]
8. Hattori, A.; Katoh-Fukui, Y.; Nakamura, A.; Matsubara, K.; Kamimaki, T.; Tanaka, H.; Dateki, S.; Adachi, M.; Muroya, K.; Yoshida, S.; et al. Next generation sequencing-based mutation screening of 86 patients with idiopathic short stature. *Endocr. J.* **2017**, *64*, 947–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hauer, N.N.; Popp, B.; Schoeller, E.; Schuhmann, S.; Heath, K.E.; Hisado-Oliva, A.; Klinger, P.; Kraus, C.; Trautmann, U.; Zenker, M.; et al. Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genet. Med.* **2018**, *20*, 630–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Freire, B.; Homma, T.K.; Funari, M.F.A.; Lerario, A.M.; Vasques, G.A.; Malaquias, A.C.; Arnhold, I.J.P.; Jorge, A.A.L. Multigene Sequencing Analysis of Children Born Small for Gestational Age With Isolated Short Stature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 2023–2030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Perchard, R.; Murray, P.G.; Payton, A.; Highton, G.L.; Whatmore, A.; Clayton, P.E. Novel Mutations and Genes That Impact on Growth in Short Stature of Undefined Aetiology: The EPIGROW Study. *J. Endocr. Soc.* **2020**, *4*, bvaa105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sentchordi-Montané, L.; Benito-Sanz, S.; Aza-Carmona, M.; Díaz-González, F.; Modamio-Høybjør, S.; de la Torre, C.; Nevado, J.; Ruiz-Ocaña, P.; López, C.B.; Prieto, P.; et al. High prevalence of variants in skeletal dysplasia associated genes in individuals with short stature and minor skeletal anomalies. *Eur. J. Endocrinol.* **2021**, *185*, 691–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fan, X.; Zhao, S.; Yu, C.; Wu, D.; Yan, Z.; Fan, L.; Song, Y.; Wang, Y.; Li, C.; Ming, Y.; et al. Exome sequencing reveals genetic architecture in patients with isolated or syndromic short stature. *J. Genet. Genom.* **2021**, *48*, 396–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Law, J.; Martin, E. Idiopathic. In *Concise Medical Dictionary*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2010.
15. Tirlapur, S.A.; Priest, L.; Daniels, J.P.; Khan, K.S. How do we define the term idiopathic? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2013**, *25*, 468–473. [[CrossRef](#)]
16. Soyka, L.F.; Ziskind, A.; Crawford, J.D. Treatment of Short Stature in Children and Adolescents with Human Pituitary Growth Hormone (Raben). *N. Engl. J. Med.* **1964**, *271*, 754–764. [[CrossRef](#)]
17. Edelmann, C.M.; Houston, I.B.; Soriano, J.R.; Boichis, H.; Stark, H. Renal excretion of hydrogen ion in children with idiopathic growth retardation. *J. Pediatr.* **1968**, *72*, 443–451. [[CrossRef](#)]
18. Spiegel, R.N.; Sather, A.; Hayles, A.B. Cephalometric study of children with various endocrine diseases. *Am. J. Orthod.* **1971**, *59*, 362–375. [[CrossRef](#)]
19. Grunt, J.A.; Enriquez, A.R.; Daughaday, W.H.; Budd, S. Acute and Long-Term Responses to hGH in Children with Idiopathic Small-for-Dates Dwarfism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1972**, *35*, 157–168. [[CrossRef](#)]
20. Ranke, M.B. Towards a Consensus on the Definition of Idiopathic Short Stature. *Horm. Res.* **1996**, *45* (Suppl. 2), 64–66. [[CrossRef](#)]
21. Cohen, P.; Rogol, A.; Deal, C.L.; Saenger, P.; Reiter, E.O.; Ross, J.L.; Chernausek, S.D.; Savage, M.O.; Wit, J.M. Consensus Statement on the Diagnosis and Treatment of Children with Idiopathic Short Stature: A Summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 4210–4217. [[CrossRef](#)]
22. Collett-Solberg, P.F.; Ambler, G.; Backeljauw, P.F.; Bidlingmaier, M.; Biller, B.M.; Boguszewski, M.C.; Cheung, P.T.; Choong, C.S.Y.; Cohen, L.E.; Cohen, P.; et al. Diagnosis, Genetics, and Therapy of Short Stature in Children: A Growth Hormone Research Society International Perspective. *Horm. Res. Paediatr.* **2019**, *92*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Inzaghi, E.; Reiter, E.; Cianfarani, S. The Challenge of Defining and Investigating the Causes of Idiopathic Short Stature and Finding an Effective Therapy. *Horm. Res. Paediatr.* **2019**, *92*, 71–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Silventoinen, K.; Sammalisto, S.; Perola, M.; Boomsma, D.I.; Cornes, B.K.; Davis, C.; Dunkel, L.; de Lange, M.; Harris, J.R.; Hjelmborg, J.V.; et al. Heritability of Adult Body Height: A Comparative Study of Twin Cohorts in Eight Countries. *Twin Res.* **2003**, *6*, 399–408. [[CrossRef](#)]
25. Jelenkovic, A.; Sund, R.; Hur, Y.-M.; Yokoyama, Y.; Hjelmborg, J.; Möller, S.; Honda, C.; Magnusson, P.; Pedersen, N.; Ooki, S.; et al. Genetic and environmental influences on height from infancy to early adulthood: An individual-based pooled analysis of 45 twin cohorts. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Yengo, L.; Vedantam, S.; Marouli, E.; Sidorenko, J.; Bartell, E.; Sakaue, S.; Graff, M.; Eliassen, A.U.; Jiang, Y.; Raghavan, S.; et al. A saturated map of common genetic variants associated with human height. *Nature* **2022**, *610*, 704–712. [[CrossRef](#)]
27. Dauber, A.; Rosenfeld, R.G.; Hirschhorn, J.N. Genetic Evaluation of Short Stature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 3080–3092. [[CrossRef](#)]

28. Durand, C.; Rappold, G.A. Height matters—From monogenic disorders to normal variation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2013**, *9*, 171–177. [[CrossRef](#)]
29. Marouli, E.; Graff, M.; Medina-Gomez, C.; Lo, K.S.; Wood, A.R.; Kjaer, T.R.; Fine, R.S.; Lu, Y.; Schurmann, C.; Highland, H.M.; et al. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature* **2017**, *542*, 186–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Baron, J.; Säwendahl, L.; De Luca, F.; Dauber, A.; Phillip, M.; Wit, J.M.; Nilsson, O. Short and tall stature: A new paradigm emerges. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 735–746. [[CrossRef](#)]
31. Wit, J.M.; Oostdijk, W.; Losekoot, M.; van Duyvenvoorde, H.A.; Ruivenkamp, C.A.L.; Kant, S.G. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Novel genetic causes of short stature. *Eur. J. Endocrinol.* **2016**, *174*, R145–R173. [[CrossRef](#)]
32. Phillips, J.A.; Hjelle, B.L.; Seeburg, P.H.; Zachmann, M. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 6372–6375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Goddard, A.D.; Covello, R.; Luoh, S.-M.; Clackson, T.; Attie, K.M.; Gesundheit, N.; Rundle, A.C.; Wells, J.A.; Carlsson, L.M. Mutations of the Growth Hormone Receptor in Children with Idiopathic Short Stature. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333*, 1093–1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rao, E.; Weiss, B.; Fukami, M.; Rump, A.; Niesler, B.; Mertz, A.; Muroya, K.; Binder, G.; Kirsch, S.; Winkelmann, M.; et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 54–63. [[CrossRef](#)]
35. Millar, D.S.; Lewis, M.D.; Horan, M.; Newsway, V.; Easter, T.E.; Gregory, J.W.; Fryklund, L.; Norin, M.; Crowne, E.C.; Davies, S.J.; et al. Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 424–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Abuzzahab, M.J.; Schneider, A.; Goddard, A.; Grigorescu, F.; Lautier, C.; Keller, E.; Kiess, W.; Klammt, J.; Kratzsch, J.; Osgood, D.; et al. IGF-I Receptor Mutations Resulting in Intrauterine and Postnatal Growth Retardation. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2211–2222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Domené, H.M.; Scaglia, P.A.; Martínez, A.S.; Keselman, A.C.; Karabatas, L.M.; Pipman, V.R.; Bengolea, S.V.; Guida, M.C.; Ropelato, M.G.; Ballerini, M.G.; et al. Heterozygous IGFALS Gene Variants in Idiopathic Short Stature and Normal Children: Impact on Height and the IGF System. *Horm. Res. Paediatr.* **2013**, *80*, 413–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Pantel, J.; Legendre, M.; Cabrol, S.; Hilal, L.; Hajaji, Y.; Morisset, S.; Nivot, S.; Vie-Luton, M.-P.; Grouselle, D.; de Kerdanet, M.; et al. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 760–768. [[CrossRef](#)]
39. Vasques, G.A.; Amano, N.; Docko, A.J.; Funari, M.F.A.; Quedas, E.P.S.; Nishi, M.Y.; Arnhold, I.J.P.; Hasegawa, T.; Jorge, A.A.L. Heterozygous Mutations in Natriuretic Peptide Receptor-B (NPR2) Gene as a Cause of Short Stature in Patients Initially Classified as Idiopathic Short Stature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1636–E1644. [[CrossRef](#)]
40. Batey, L.; Moon, J.; Yu, Y.; Wu, B.; Hirschhorn, J.N.; Shen, Y.; Dauber, A. A Novel Deletion of IGF1 in a Patient With Idiopathic Short Stature Provides Insight Into IGF1 Haploinsufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E153–E159. [[CrossRef](#)]
41. Nilsson, O.; Guo, M.H.; Dunbar, N.; Popovic, J.; Flynn, D.; Jacobsen, C.; Lui, J.C.; Hirschhorn, J.N.; Baron, J.; Dauber, A. Short Stature, Accelerated Bone Maturation, and Early Growth Cessation Due to Heterozygous Aggrecan Mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E1510–E1518. [[CrossRef](#)]
42. Kant, S.G.; Cervenková, I.; Balek, L.; Trantirek, L.; Santen, G.W.; de Vries, M.C.; van Duyvenvoorde, H.A.; van der Wielen, M.J.; Verkerk, A.J.; Uitterlinden, A.G.; et al. A novel variant of FGFR3 causes proportionate short stature. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *172*, 763–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dauber, A.; Muñoz-Calvo, M.T.; Barrios, V.; Domené, H.M.; Kloverpris, S.; Serra-Juhé, C.; Desikan, V.; Pozo, J.; Muzumdar, R.; Martos-Moreno, G.; et al. Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF -I availability. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 363–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hisado-Oliva, A.; Ruzafa-Martin, A.; Sentchordi, L.; Funari, M.F.; Bezanilla-López, C.; Alonso-Bernaldez, M.; Barraza-García, J.; Rodríguez-Zabala, M.; Lerario, A.M.; Benito-Sanz, S.; et al. Mutations in C-natriuretic peptide (NPPC): A novel cause of autosomal dominant short stature. *Anesth. Analg.* **2018**, *20*, 91–97. [[CrossRef](#)]
45. Vasques, G.A.; Funari, M.F.A.; Ferreira, F.M.; Aza-Carmona, M.; Sentchordi-Montané, L.; Barraza-García, J.; Lerario, A.M.; Yamamoto, G.L.; Naslavsky, M.S.; Duarte, Y.A.O.; et al. IHH Gene Mutations Causing Short Stature With Nonspecific Skeletal Abnormalities and Response to Growth Hormone Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**, *103*, 604–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Klammt, J.; Neumann, D.; Gevers, E.F.; Andrew, S.F.; Schwartz, I.D.; Rockstroh, D.; Colombo, R.; Sanchez, M.A.; Vokurkova, D.; Kowalczyk, J.; et al. Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2105. [[CrossRef](#)]
47. Plachy, L.; Dusatkova, P.; Maratova, K.; Petruzelkova, L.; Elblova, L.; Kolouskova, S.; Snajderova, M.; Obermannova, B.; Zemkova, D.; Sumnik, Z.; et al. Familial Short Stature—A Novel Phenotype of Growth Plate Collagenopathies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2021**, *106*, 1742–1749. [[CrossRef](#)]
48. El Kholly, M.; Mella, P.; Rashad, M.; Buzi, F.; Meazza, C.; Zahra, S.; Elsedfy, H. Growth Hormone/IGF-I Axis and Growth Hormone Receptor Mutations in Idiopathic Short Stature. *Horm. Res. Paediatr.* **2011**, *76*, 300–306. [[CrossRef](#)]
49. Marchini, A.; Ogata, T.; Rappold, G.A. A Track Record on SHOX: From Basic Research to Complex Models and Therapy. *Endocr. Rev.* **2016**, *37*, 417–448. [[CrossRef](#)]

50. Caliebe, J.; Broekman, S.; Boogaard, M.; Bosch, C.A.; Ruivenkamp, C.A.; Oostdijk, W.; Kant, S.; Binder, G.; Ranke, M.B.; Wit, J.M.; et al. IGF1, IGF1R and SHOX Mutation Analysis in Short Children Born Small for Gestational Age and Short Children with Normal Birth Size (Idiopathic Short Stature). *Horm. Res. Paediatr.* **2012**, *77*, 250–260. [[CrossRef](#)]
51. Ester, W.A.; Van Duyvenvoorde, H.A.; De Wit, C.C.; Broekman, A.J.; Ruivenkamp, C.A.L.; Govaerts, L.C.P.; Wit, J.M.; Hokken-Koelega, A.C.S.; Losekoot, M. Two Short Children Born Small for Gestational Age with Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Haploinsufficiency Illustrate the Heterogeneity of Its Phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 4717–4727. [[CrossRef](#)]
52. Domené, H.M.; Bengolea, S.V.; Martínez, A.S.; Ropelato, M.G.; Pennisi, P.; Scaglia, P.; Heinrich, J.J.; Jasper, H.G. Deficiency of the Circulating Insulin-like Growth Factor System Associated with Inactivation of the Acid-Labile Subunit Gene. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 570–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Inoue, H.; Kangawa, N.; Kinouchi, A.; Sakamoto, Y.; Kimura, C.; Horikawa, R.; Shigematsu, Y.; Itakura, M.; Ogata, T.; Fujieda, K.; et al. Identification and Functional Analysis of Novel Human Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHSR) Gene Mutations in Japanese Subjects with Short Stature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, E373–E378. [[CrossRef](#)]
54. Plachy, L.; Strakova, V.; Elblova, L.; Obermannova, B.; Kolouskova, S.; Snajderova, M.; Zemkova, D.; Dusatkova, P.; Sumnik, Z.; Lebl, J.; et al. High Prevalence of Growth Plate Gene Variants in Children With Familial Short Stature Treated With GH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 4273–4281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Collett-Solberg, P.F.; Jorge, A.A.; Boguszewski, M.C.; Miller, B.S.; Choong, C.S.Y.; Cohen, P.; Hoffman, A.R.; Luo, X.; Radovick, S.; Saenger, P. Growth hormone therapy in children; research and practice—A review. *Growth Horm. IGF Res.* **2018**, *44*, 20–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Vasques, G.A.; Andrade, N.L.M.; Correa, F.A.; Jorge, A.A.L. Update on new GH-IGF axis genetic defects. *Arch. Endocrinol. Metab.* **2019**, *63*, 608–617. [[CrossRef](#)]
57. Sanguineti, N.; Braslavsky, D.; Scaglia, P.A.; Keselman, A.; Ballerini, M.G.; Ropelato, M.G.; Suco, S.; Vishnopolska, S.; Berenstein, A.J.; Jasper, H.; et al. p.R209H GH1 variant challenges short stature assessment. *Growth Horm. IGF Res.* **2019**, *50*, 23–26. [[CrossRef](#)]
58. Kowarski, A.; Weldon, V.; Daughaday, W.; Schneider, J.; Ben-Galim, E. GROWTH FAILURE WITH NORMAL SERUM RIA-GH AND LOW SOMATOMEDIN ACTIVITY: SOMATOMEDIN RESTORATION AND GROWTH ACCELERATION AFTER EXOGENOUS GH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1978**, *47*, 461–466. [[CrossRef](#)]
59. Mauras, N.; Walton, P.; Nicar, M.; Welch, S.; Rogol, A. Growth hormone stimulation testing in both short and normal statured children: Use of an immunofunctional assay. *Pediatr. Res.* **2000**, *48*, 614–618. [[CrossRef](#)]
60. Takahashi, Y.; Kaji, H.; Okimura, Y.; Goji, K.; Abe, H.; Chihara, K. Short Stature Caused by a Mutant Growth Hormone. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 432–436. [[CrossRef](#)]
61. Takahashi, Y.; Shirono, H.; Arisaka, O.; Yagi, T.; Koga, J.; Kaji, H.; Okimura, Y.; Abe, H.; Tanaka, T.; Chihara, K. Biologically inactive growth hormone caused by an amino acid substitution. *J. Clin. Investig.* **1997**, *100*, 1159–1165. [[CrossRef](#)]
62. Besson, A.; Salemi, S.; Deladoëy, J.; Vuissoz, J.-M.; Eblé, A.; Bidlingmaier, M.; Bürgi, S.; Honegger, U.; Flück, C.; Mullis, P.E. Short Stature Caused by a Biologically Inactive Mutant Growth Hormone (GH-C53S). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 2493–2499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Petkovic, V.; Miletta, M.C.; Boot, A.M.; Losekoot, M.; Flück, C.E.; Pandey, A.V.; Eblé, A.; Wit, J.M.; Mullis, P.E. Short stature in two siblings heterozygous for a novel bioinactive GH mutant (GH-P59S) suggesting that the mutant also affects secretion of the wild-type GH. *Eur. J. Endocrinol.* **2013**, *168*, K35–K43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Laron, Z. Laron Syndrome (Primary Growth Hormone Resistance or Insensitivity): The Personal Experience 1958–2003. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 1031–1044. [[CrossRef](#)]
65. Attie, K.M.; Carlsson, L.M.; Rundle, A.C.; Sherman, B.M. Evidence for partial growth hormone insensitivity among patients with idiopathic short stature. *J. Pediatr.* **1995**, *127*, 244–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. David, A.; Hwa, V.; Metherell, L.; Netchine, I.; Camacho-Hübner, C.; Clark, A.J.L.; Rosenfeld, R.G.; Savage, M.O. Evidence for a Continuum of Genetic, Phenotypic, and Biochemical Abnormalities in Children with Growth Hormone Insensitivity. *Endocr. Rev.* **2011**, *32*, 472–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Anesth. Analg.* **2015**, *17*, 405–424. [[CrossRef](#)]
68. Zoledziewska, M.; Sidore, C.; Chiang, C.W.K.; Sanna, S.; Mulas, A.; Steri, A.M.; Busonero, F.; Marcus, J.; Marongiu, M.; Maschio, A.; et al. Height-reducing variants and selection for short stature in Sardinia. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1352–1356. [[CrossRef](#)]
69. Vairamani, K.; Merjaneh, L.; Casano-Sancho, P.; Sanli, M.E.; David, A.; Metherell, L.; Savage, M.O.; Del Pozo, J.S.; Backeljauw, P.F.; Rosenfeld, R.G.; et al. Novel Dominant-Negative GH Receptor Mutations Expands the Spectrum of GHI and IGF-I Deficiency. *J. Endocr. Soc.* **2017**, *1*, 345–358. [[CrossRef](#)]
70. Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Ghrelin Is a Growth-Hormone-Releasing Acylated Peptide from Stomach. *Nature* **1999**, *402*, 656–660. [[CrossRef](#)]
71. Howard, A.D.; Feighner, S.D.; Cully, D.F.; Arena, J.P.; Liberators, P.A.; Rosenblum, C.I.; Hamelin, M.; Hreniuk, D.L.; Palyha, O.C.; Anderson, J.; et al. A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release. *Science* **1996**, *273*, 974–977. [[CrossRef](#)]

72. Pugliese-Pires, P.N.; Fortin, J.-P.; Arthur, T.; Latronico, A.C.; Mendonca, B.B.; Villares, S.M.F.; Arnhold, I.J.P.; Kopin, A.S.; Jorge, A.A.L. Novel inactivating mutations in the GH secretagogue receptor gene in patients with constitutional delay of growth and puberty. *Eur. J. Endocrinol.* **2011**, *165*, 233–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Levy, D.E.; Darnell, J.E., Jr. STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 651–662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kofoed, E.M.; Hwa, V.; Little, B.; Woods, K.A.; Buckway, C.K.; Tsubaki, J.; Pratt, K.L.; Bezrodnik, L.; Jasper, H.; Tepper, A.; et al. Growth Hormone Insensitivity Associated with a *STAT5b* Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1139–1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Scalco, R.C.; Hwa, V.; Domené, H.M.; Jasper, H.G.; Belgorosky, A.; Marino, R.; Pereira, A.M.; A Tonelli, C.; Wit, J.M.; Rosenfeld, R.G.; et al. *STAT5B* mutations in heterozygous state have negative impact on height: Another clue in human stature heritability. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *173*, 291–296. [[CrossRef](#)]
76. Forbes, B.E.; Blyth, A.J.; Wit, J.M. Disorders of IGFs and IGF-1R signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2020**, *518*, 111035. [[CrossRef](#)]
77. Veenma, D.C.M.; Eussen, H.J.; Govaerts, L.C.P.; de Kort, S.W.K.; Odink, R.J.; Wouters, C.H.; Hokken-Koelega, A.C.S.; de Klein, A. Phenotype-genotype correlation in a familial IGF1R microdeletion case. *J. Med. Genet.* **2009**, *47*, 492–498. [[CrossRef](#)]
78. Walenkamp, M.J.E.; Robers, J.M.L.; Wit, J.M.; Zandwijken, G.R.J.; van Duyvenvoorde, H.; Oostdijk, W.A.; Hokken-Koelega, A.C.S.; Kant, S.G.; Losekoot, M. Phenotypic Features and Response to GH Treatment of Patients With a Molecular Defect of the IGF-1 Receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 3157–3171. [[CrossRef](#)]
79. Cabrera-Salcedo, C.; Hawkes, C.P.; Tyzinski, L.; Andrew, M.; Labilloy, G.; Campos, D.; Feld, A.; Deodati, A.; Hwa, V.; Hirschhorn, J.N.; et al. Targeted Searches of the Electronic Health Record and Genomics Identify an Etiology in Three Patients with Short Stature and High IGF-I Levels. *Horm. Res. Paediatr.* **2019**, *92*, 186–195. [[CrossRef](#)]
80. Domené, S.; Domené, H.M. The role of acid-labile subunit (ALS) in the modulation of GH-IGF-I action. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2020**, *518*, 111006. [[CrossRef](#)]
81. Domené, H.M.; Hwa, V.; Jasper, H.G.; Rosenfeld, R.G. Acid-labile subunit (ALS) deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **2011**, *25*, 101–113. [[CrossRef](#)]
82. Fofanova-Gambetti, O.V.; Hwa, V.; Wit, J.M.; Domene, H.M.; Argente, J.; Bang, P.; Hoegler, W.; Kirsch, S.; Pihoker, C.; Chiu, H.K.; et al. Impact of Heterozygosity for Acid-Labile Subunit (IGFALS) Gene Mutations on Stature: Results from the International Acid-Labile Subunit Consortium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 4184–4191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Argente, J.; Pérez-Jurado, L.A. Letter to the Editor: History and clinical implications of PAPP-A2 in human growth: When reflecting on idiopathic short stature leads to a specific and new diagnosis: Understanding the concept of “low IGF-I availability”. *Growth Horm. IGF Res.* **2018**, *40*, 17–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Babiker, A.; Al Noaim, K.; Al Swaid, A.; Al Fadhel, M.; Deeb, A.; Martín-Rivada, A.; Barrios, V.; Pérez-Jurado, L.A.; Alfares, A.; Al Alwan, I.; et al. Short stature with low insulin-like growth factor 1 availability due to pregnancy-associated plasma protein A2 deficiency in a Saudi family. *Clin. Genet.* **2021**, *100*, 601–606. [[CrossRef](#)]
85. Lui, J.C.; Nilsson, O.; Baron, J. RECENT RESEARCH ON THE GROWTH PLATE: Recent insights into the regulation of the growth plate. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *53*, T1–T9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Nilsson, O.; Marino, R.; De Luca, F.; Phillip, M.; Baron, J. Endocrine Regulation of the Growth Plate. *Horm. Res. Paediatr.* **2005**, *64*, 157–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Vasques, G.A.; Andrade, N.L.M.; Jorge, A.A.L. Genetic causes of isolated short stature. *Arq. Bras. De Endocrinol. Metabol.* **2019**, *63*, 70–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Jorge, A.; Souza, S.C.; Nishi, M.Y.; Billerbeck, A.E.; Libório, D.C.C.; Kim, C.A.; Arnhold, I.J.P.; Mendonça, B.B.; Nishi, M.Y. *SHOX* mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: Frequency and phenotypic variability. *Clin. Endocrinol.* **2006**, *66*, 130–135. [[CrossRef](#)]
89. Funari, M.F.; de Barros, J.S.; Santana, L.S.; Lerario, A.M.; Freire, B.L.; Homma, T.K.; Vasques, G.A.; Mendonca, B.B.; Nishi, M.Y.; Jorge, A.A. Evaluation of *SHOX* defects in the era of next-generation sequencing. *Clin. Genet.* **2019**, *96*, 261–265. [[CrossRef](#)]
90. Ogata, T.; Onigata, K.; Hotsubo, T.; Matsuo, N.; Rappold, G. Growth Hormone and Gonadotropin-Releasing Hormone Analog Therapy in Haploinsufficiency of *SHOX*. *Endocr. J.* **2001**, *48*, 317–322. [[CrossRef](#)]
91. Blum, W.F.; Cao, D.; Hesse, V.; Fricke-Otto, S.; Ross, J.L.; Jones, C.; Quigley, C.A.; Binder, G. Height Gains in Response to Growth Hormone Treatment to Final Height Are Similar in Patients with *SHOX* Deficiency and Turner Syndrome. *Horm. Res. Paediatr.* **2009**, *71*, 167–172. [[CrossRef](#)]
92. Blum, W.F.; Ross, J.L.; Zimmermann, A.G.; Quigley, C.A.; Child, C.J.; Kalifa, G.; Deal, C.; Drop, S.L.S.; Rappold, G.; Cutler, G.B., Jr. GH Treatment to Final Height Produces Similar Height Gains in Patients With *SHOX* Deficiency and Turner Syndrome: Results of a Multicenter Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1383–E1392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Dantas, N.C.; Funari, M.F.; Vasques, G.A.; Andrade, N.L.; Rezende, R.C.; Brito, V.; Scalco, R.C.; Arnhold, I.J.; Mendonca, B.B.; Jorge, A.A. Adult Height of Patients with *SHOX* Haploinsufficiency with or without GH Therapy: A Real-World Single-Center Study. *Horm. Res. Paediatr.* **2022**, *95*, 264–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Vasques, G.A.; Arnhold, I.J.; Jorge, A.A. Role of the Natriuretic Peptide System in Normal Growth and Growth Disorders. *Horm. Res. Paediatr.* **2014**, *82*, 222–229. [[CrossRef](#)]
95. Hanley, P.C.; Kanwar, H.S.; Martineau, C.; Levine, M.A. Short Stature is Progressive in Patients with Heterozygous *NPR2* Mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, 3190–3202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Hisado-Oliva, A.; Garre-Vázquez, A.I.; Santaolalla-Caballero, F.; Belinchón, A.; Barrera-Bonis, A.C.; Vasques, G.A.; Ramirez, J.; Luzuriaga, C.; Carlone, G.; González-Casado, I.; et al. Heterozygous *NPR2* Mutations Cause Disproportionate Short Stature, Similar to Léri-Weill Dyschondrosteosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, E1133–E1142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Plachy, L.; Dusatkova, P.; Maratova, K.; Petruzalkova, L.; Zemkova, D.; Elblova, L.; Kucerova, P.; Toni, L.; Kolouskova, S.; Snajderova, M.; et al. *NPR2* Variants Are Frequent among Children with Familiar Short Stature and Respond Well to Growth Hormone Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, e746–e752. [[CrossRef](#)]
98. Gibson, B.G.; Briggs, M.D. The aggrecanopathies; an evolving phenotypic spectrum of human genetic skeletal diseases. *Orphanet J. Rare Dis.* **2016**, *11*, 86. [[CrossRef](#)]
99. Gkourogiani, A.; Andrew, M.; Tyzinski, L.; Crocker, M.; Douglas, J.; Dunbar, N.; Fairchild, J.; Funari, M.F.A.; Heath, K.; Jorge, A.A.L.; et al. Clinical Characterization of Patients With Autosomal Dominant Short Stature due to Aggrecan Mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *102*, 460–469. [[CrossRef](#)]
100. Hauer, N.N.; Sticht, H.; Boppudi, S.; Büttner, C.; Kraus, C.; Trautmann, U.; Zenker, M.; Zweier, C.; Wiesener, A.; Jamra, R.A.; et al. Genetic screening confirms heterozygous mutations in *ACAN* as a major cause of idiopathic short stature. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12225. [[CrossRef](#)]
101. Lin, L.; Li, M.; Luo, J.; Li, P.; Zhou, S.; Yang, Y.; Chen, K.; Weng, Y.; Ge, X.; Mireguli, M.; et al. A High Proportion of Novel *ACAN* Mutations and Their Prevalence in a Large Cohort of Chinese Short Stature Children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2021**, *106*, e2711–e2719. [[CrossRef](#)]
102. Wu, S.; Wang, C.; Cao, Q.; Zhu, Z.; Liu, Q.; Gu, X.; Zheng, B.; Zhou, W.; Jia, Z.; Gu, W.; et al. The Spectrum of *ACAN* Gene Mutations in a Selected Chinese Cohort of Short Stature: Genotype-Phenotype Correlation. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 891040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Alexandrou, E.; Dauber, A.; Tyzinski, L.; Hwa, V.; Andrew, M.; Kim, H.; Elangovan, S.; Gubanich, P.; Taylor-Haas, J.A.; Paterno, M.; et al. Clinical phenotype and musculoskeletal characteristics of patients with aggrecan deficiency. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2022**, *188*, 1193–1203. [[CrossRef](#)]
104. Muthuvel, G.; Dauber, A.; Alexandrou, E.; Tyzinski, L.; Andrew, M.; Hwa, V.; Backeljauw, P. Treatment of Short Stature in Aggrecan-deficient Patients With Recombinant Human Growth Hormone: 1-Year Response. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2021**, *107*, e2103–e2109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Horton, W.A.; Hall, J.G.; Hecht, J.T. Achondroplasia. *Lancet* **2007**, *370*, 162–172. [[CrossRef](#)]
106. Rousseau, F.; Bonaventure, J.; Legeai-Mallet, L.; Schmidt, H.; Weissenbach, J.; Maroteaux, P.; Munnich, A.; Le Merrer, M. Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia. *J. Med. Genet.* **1996**, *33*, 749–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Mamada, M.; Yorifuji, T.; Kurokawa, K.; Kawai, M.; Momoi, T.; Nakahata, T. Prevalence of Mutations in the *FGFR3* Gene in Individuals with Idiopathic Short Stature. *Clin. Pediatr. Endocrinol.* **2006**, *15*, 61–64. [[CrossRef](#)]
108. Deng, H.; Huang, X.; Yuan, L. Molecular genetics of the *COL2A1*-related disorders. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2016**, *768*, 1–13. [[CrossRef](#)]
109. Nishimura, G.; Haga, N.; Kitoh, H.; Tanaka, Y.; Sonoda, T.; Kitamura, M.; Shirahama, S.; Itoh, T.; Nakashima, E.; Ohashi, H.; et al. The phenotypic spectrum of *COL2A1* mutations. *Hum. Mutat.* **2005**, *26*, 36–43. [[CrossRef](#)]
110. Chen, M.; Miao, H.; Liang, H.; Ke, X.; Yang, H.; Gong, F.; Wang, L.; Duan, L.; Chen, S.; Pan, H.; et al. Clinical Characteristics of Short-Stature Patients With Collagen Gene Mutation and the Therapeutic Response to rhGH. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 820001. [[CrossRef](#)]
111. Yang, L.; Zhang, C.; Wang, W.; Wang, J.; Xiao, Y.; Lu, W.; Ma, X.; Chen, L.; Ni, J.; Wang, D.; et al. Pathogenic gene screening in 91 Chinese patients with short stature of unknown etiology with a targeted next-generation sequencing panel. *BMC Med. Genet.* **2018**, *19*, 212. [[CrossRef](#)]
112. Tartaglia, M.; Kalidas, K.; Shaw, A.; Song, X.; Musat, D.L.; van der Burgt, I.; Brunner, H.G.; Bertola, D.R.; Crosby, A.; Ion, A.; et al. *PTPN11* Mutations in Noonan Syndrome: Molecular Spectrum, Genotype-Phenotype Correlation, and Phenotypic Heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *70*, 1555–1563. [[CrossRef](#)]
113. Malaquias, A.C.; Jorge, A.A. Activation of the MAPK pathway (RASopathies) and partial growth hormone insensitivity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2021**, *519*, 111040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Pannone, L.; Bocchinfuso, G.; Flex, E.; Rossi, C.; Baldassarre, G.; Lisewski, C.; Pantaleoni, F.; Consoli, F.; Lepri, F.; Magliozzi, M.; et al. Structural, Functional, and Clinical Characterization of a Novel *PTPN11* Mutation Cluster Underlying Noonan Syndrome. *Hum. Mutat.* **2017**, *38*, 451–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Pasmant, E.; Vidaud, M.; Vidaud, D.; Wolkenstein, P. Neurofibromatosis type 1: From genotype to phenotype. *J. Med. Genet.* **2012**, *49*, 483–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Homma, T.K.; Krepischi, A.C.; Furuya, T.K.; Honjo, R.S.; Malaquias, A.C.; Bertola, D.R.; Costa, S.S.; Canton, A.P.; Roela, R.A.; Freire, B.; et al. Recurrent Copy Number Variants Associated with Syndromic Short Stature of Unknown Cause. *Horm. Res. Paediatr.* **2017**, *89*, 13–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Mintz, C.S.; Seaver, L.H.; Irons, M.; Grimberg, A.; Lozano, R. Focused Revision: ACMG practice resource: Genetic evaluation of short stature. *Genet. Med.* **2021**, *23*, 813–815. [[CrossRef](#)]
118. Hayden, E.C. Technology: The \$1,000 genome. *Nature* **2014**, *507*, 294–295. [[CrossRef](#)]

119. Van Der Steen, M.; Pfundt, R.; Maas, S.J.; Bakker-van Waarde, W.M.; Odink, R.J.; Hokken-Koelega, A.C. ACAN Gene Mutations in Short Children Born SGA and Response to Growth Hormone Treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *102*, 1458–1467. [[CrossRef](#)]
120. Greco, L.; Power, C.; Peckham, C. Adult outcome of normal children who are short or underweight at age 7 years. *BMJ* **1995**, *310*, 696–700. [[CrossRef](#)]
121. Andrade, N.L.M.; Funari, M.F.D.A.; Malaquias, A.C.; Collett-Solberg, P.F.; Gomes, N.; Scalco, R.; Dantas, N.C.B.; Rezende, R.C.; Tiburcio, A.M.F.P.; Souza, M.A.R.; et al. Diagnostic yield of a multigene sequencing approach in children classified as idiopathic short stature. *Endocr. Connect.* **2022**, *11*, e220214. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Genetic causes of isolated short stature

Gabriela A. Vasques^{1,2}, Nathalia L. M. Andrade^{1,2}, Alexander A. L. Jorge^{1,2}

¹ Unidade de Endocrinologia Genética (LIM25), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil

² Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil

Correspondence to:

Alexander A. L. Jorge
Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo (LIM-25)
Av. Dr. Arnaldo, 455,
5º andar, sala 5340
01246-903 – São Paulo, SP, Brasil
alexj@usp.br

Received on Nov/29/2018

Accepted on Feb/22/2019

DOI: 10.20945/2359-399700000105

ABSTRACT

Short stature is a common feature, and frequently remains without a specific diagnosis after conventional clinical and laboratorial evaluation. Longitudinal growth is mainly determined by genetic factors, and hundreds of common variants have been associated to height variability among healthy individuals. Although isolated short stature may be caused by the combination of variants, with a deleterious impact on the growth of individuals with polygenic inheritance, recent studies have pointed out some monogenic defects as the cause of the growth disorder observed in nonsyndromic children. The majority of these defects are in genes related to the growth plate cartilage and in the growth hormone (GH) – insulin-like growth factor 1 (IGF-1) axis. Affected patients usually present the mildest spectrum of some forms of skeletal dysplasia, or subtle abnormalities of laboratory tests, suggesting hormonal resistance or insensibility. The lack of specific characteristics, however, does not allow formulation of a definitive diagnosis without the use of broad genetic studies. Thus, molecular genetic studies including panels of genes or exome analysis will become essential in investigating and identifying the causes of isolated short stature in children, with a crucial impact on treatment and follow-up. *Arch Endocrinol Metab.* 2019;63(1):70-8

Keywords

Short stature; growth; growth cartilage; growth hormone

INTRODUCTION

Short stature is defined as a condition characterized by height more than 2 standard deviation scores below the mean observed in age and sex control population (height SDS < -2) (1). Based on this definition, short stature affects 2.3% of children, and is a matter of concern for many parents seeking medical attention. Although growth disorder may be a clinical presentation of an underlying disease, in around 70% of the cases, short stature is not associated with any clinical and laboratory evidence that justify growth impairment (2). These children are usually classified as having constitutional or idiopathic short stature (ISS) (3). In this review, we also used the term isolated short stature, in view of the growing number of monogenic conditions that explain the short stature phenotype in nonsyndromic children.

Height is one of the human traits with a higher degree of heritability (> 80%), which means that genetic variability is the main determinant of stature (4). Up to date, more than 600 common variants (with allele frequencies greater than 1%) distributed

across more than 400 regions of the genome have been independently associated with height (5). The impact of each identified common variant on stature is small (around 1-4 mm). More recently, studies have pointed out that rare variants (frequency < 1%) may exert an effect on height variability 10 to 20 times greater than that exert by common variants (about 20 mm per allele). Many of these common and rare variants are in genes associated with syndromic growth disorders or in genes involved in the development of the growth cartilage (6).

Since short stature is a common clinical presentation, it is widely accepted that it is caused by common variants with polygenic inheritance (7,8). However, recent studies have challenged this dogma, and proposed that many of the children classified as ISS could instead have a monogenic defect. A part of this group would represent the mildest spectrum of phenotypic variability of syndromic conditions (9,10). For example, there are short stature individuals harboring pathogenic variants in genes responsible for the Noonan syndrome who do not present any of the other phenotypic alterations that

would allow the recognition of this condition clinically (11). Additionally, genes that regulate the growth plate and that had already been associated with skeletal dysplasias were recently pointed as responsible for some cases of ISS (12-16). This review provides an update on monogenic causes of isolated short stature.

GENES THAT REGULATE GROWTH PLATE

Endochondral ossification is a complex process which occurs in the growth plate to promote bone elongation and consequent increase in height. It involves proliferation, hypertrophy and senescence of chondrocytes and also cartilage matrix synthesis (17). Paracrine and autocrine factors are the main regulators of endochondral ossification and defects in genes that encode or disrupt these factors (summarized in Table 1) have been associated with ISS. Each of these genes is responsible for a small proportion of cases (up to 2%), but this proportion may be significantly higher in familial short stature. Defects in genes that regulate growth plate, inherited in an autosomal dominant manner, cause a variable phenotype in terms of degree of short stature and body proportions. The atypical radiological findings do not allow the precise diagnosis and some of the patients are recognized as having a subclinical skeletal dysplasia.

SHOX

The short stature homeobox (*SHOX*) gene is located in the pseudoautosomal region 1 of both sex chromosomes and is expressed in growth cartilage, especially in hypertrophic chondrocytes. The role of the *SHOX* gene as a regulator of the growth plate has not been fully understood. It is known that *SHOX* is a transcription factor that increases *NPPB* and inhibits *FGFR3* expression, respectively (Figure 1A).

Both effects stimulate and coordinate chondrocytes proliferation and differentiation in order to promote longitudinal growth. In addition, *SHOX* interacts with the *SOX* trio (*SOX9*, *SOX5* and *SOX6* genes), which has an important role in cartilage matrix synthesis (18). The causative relation between *SHOX* defects and ISS was first described in 1997 (12). Since then, *SHOX* haploinsufficiency has become the main recognized monogenic cause of short stature, being responsible for 2.6% of the nonsyndromic cases of short stature. Homozygous defects in *SHOX* gene cause Langer mesomelic dysplasia, a rare skeletal dysplasia with severe short stature and limb aplasia or hypoplasia of the ulna and fibula. Heterozygous *SHOX* haploinsufficiency causes phenotypes that range from isolated short stature to the complete picture of the Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD), a skeletal dysplasia characterized by mesomelia and Madelung deformity (*i.e.* shortening and bowing of the radius with dorsal subluxation of the distal ulna) (19). Around 80% of reported *SHOX* defects are deletions involving the gene or regulatory regions, with the remaining ones being point mutations. Although no genotype-phenotype correlation has been identified in individuals with *SHOX* deletions encompassing exons and point mutations, deletion in downstream *SHOX* enhancer have been associated with a milder phenotype (18).

Abnormal body proportion, defined by the [sitting height]/[height] ratio for age and sex (SH/H SDS) > 2, is present in the vast majority of children with isolated short stature caused by *SHOX* haploinsufficiency (20). The degree of short stature is variable, and the mean growth deficit of affected individuals is of around 12 cm, which means that there are carriers with height within the normal range.

A reasonable clinical selection criterion to screen for *SHOX* defects in a child with isolated short stature is

Table 1. Genes involved in the endochondral ossification process that are associated with isolated short stature

Gene	First report in patient classified as ISS	Frequency in ISS (%)	Additional common findings	References
<i>SHOX</i>	1997	2.6 (1.1 to 22.2)	Mild abnormal body proportion, family member with Madelung deformity	(18)
<i>NPR2</i>	2013	1.8 to 6 (13.6*)	Nonspecific skeletal abnormalities, as short metacarpals	(13,22)
<i>NPPC</i>	2018	NA	Two families described with brachydactyly	(16)
<i>ACAN</i>	2014	1.4	Accelerated bone maturation and early-onset osteoarthritis	(52,53)
<i>IHH</i>	2018	3.4	Shortening of the middle phalanx of the 5th finger	(15,54)
<i>FGFR3</i>	2015	NA	Only one family described with normal body proportion	(32)

* Familial cases; NA: not available; ISS: idiopathic short stature.

the presence of abnormal body proportion, especially if the phenotype of disproportional short stature segregates in an autosomal dominant manner and/or there is a family member with Madelung deformity. Particular attention should be given to the regulatory regions of *SHOX* gene, since deletions located outside the coding region are more commonly associated with short stature without other specific findings.

NPR2* and *NPPC

The C-type natriuretic peptide (CNP) and its receptor (NPR-B) are important regulators of the endochondral ossification process (21). CNP and NPR-B are encoded by *NPPC* and *NPR2* genes, respectively. They are notably expressed in the hypertrophic zone of the growth plate. The CNP/NPR-B system stimulates chondrocyte proliferation and differentiation and synthesis of cartilage matrix in an autocrine/paracrine manner. The molecular mechanism that explains these actions is at least partially identified and involves the inhibition of the FGFR3 pathway (Figure 1B). After CNP binding to NPR-B, there is an intracellular accumulation of cyclic GMP (cGMP), that activates cGMP-dependent protein kinases I and II (cGKI and cGKII). cGKII inhibits the activation of RAF-1. Biallelic loss-of-function mutations in *NPR2* cause acromesomelic dysplasia type Maroteaux (21). Heterozygous *NPR2* mutations in a cohort of ISS children were first described in 2013 (13). Since then, other studies have replicated this finding and the prevalence of heterozygous *NPR2* mutations in ISS patients has ranged from 1.8% to 13.6% (in familial cases) (22). Similar to what has been observed in patients with *SHOX* haploinsufficiency, carriers of *NPR2* mutation have a variable degree of short stature and some carrier relatives presented height at the lower limit of the normal range. Abnormal body proportion (SH/H SDS > 2) and nonspecific skeletal abnormalities, as short metacarpals (Figure 2A), were also observed among patients with *NPR2* mutations. Due to the phenotypic heterogeneity, there is, at the moment, no clinical feature that enables establishing a criterion to select short stature patients for for *NPR2* molecular-genetic screening.

More recently, heterozygous *NPPC* mutations have been identified in two families with ISS. In total, six *NPPC* carriers were identified, two being Brazilian and four Spanish. Their height SDS ranged from -4.3 to -2.3 and all of them also had small hands phenotype (16).

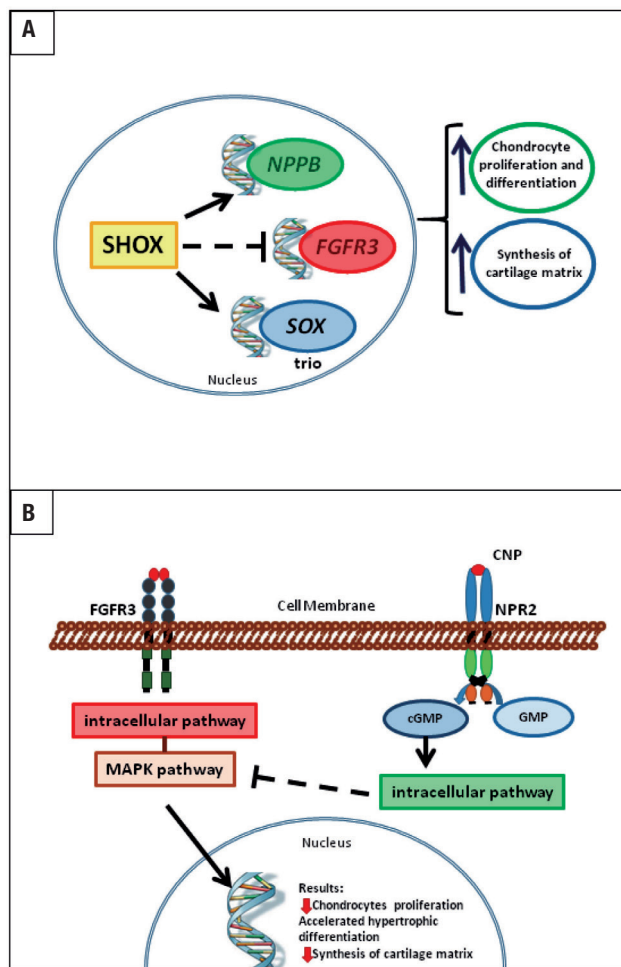


Figure 1. Schematic representation of chondrogenesis regulation by genes associated to isolated short stature phenotype. **(A)** *SHOX* is a transcriptional factor that enhances *NPPB* and *SOX* trio expression and inhibits *FGFR3* expression. This leads to an increase in chondrocyte proliferation and differentiation and an increase in cartilage matrix synthesis. **(B)** CNP and FGF signaling pathways converge at the MAPK pathway. The opposite effect of CNP on *FGFR3* pathway improves longitudinal bone growth by increasing chondrocyte proliferation and differentiation and cartilage matrix synthesis.

ACAN

The Aggrecan gene (*ACAN*) encodes a proteoglycan present in the extracellular matrix. Aggrecan has a fundamental structural and functional role in the growth plate cartilage. Initially, *ACAN* mutations were associated with two rare types of skeletal dysplasias, one with an autosomal dominant (Spondyloepiphyseal dysplasia, Kimberley type) and another with a recessive inheritance (Spondyloepimetaphyseal dysplasia, aggrecan type) (23). In 2014, heterozygous *ACAN* mutations were identified as cause of short stature in three families with no skeletal findings suggestive of skeletal dysplasia. Children presented accelerated bone

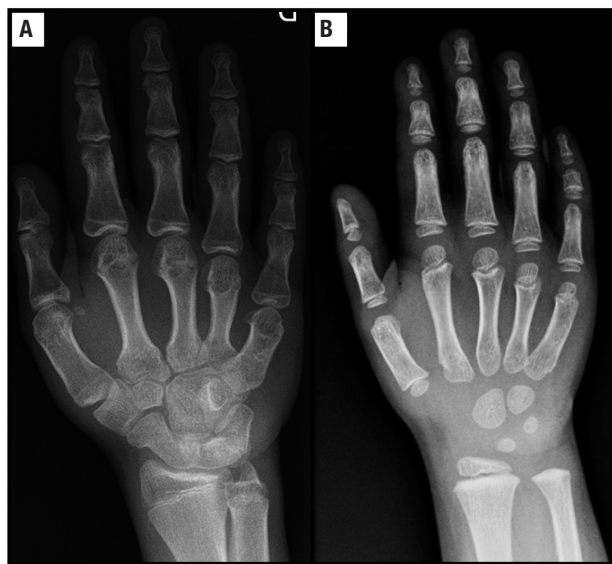


Figure 2. Hand radiographs of children carrying *NPR2* and *IHH* mutations. **(A)** Hand radiograph of a patient with heterozygous mutation in *NPR2*. Shortening of metacarpal is clearly observed. **(B)** Hand radiograph of a child with heterozygous mutation in *IHH* showing the shortening of the middle phalanx of the 5th finger with cone-shaped epiphyses.

maturation, even before puberty, and some subjects had accompanying early-onset osteoarthritis (14). This dual phenotypic presentation occurs because aggrecan is a component of both growth plate and articular cartilage.

Since the first report, more than one hundred individuals from more than twenty families with autosomal dominant inherited short stature were identified as carriers of *ACAN* mutations (24). Affected children seem to have growth impairment even before birth, and mutations in this gene were reported in a cohort of short children born small for their gestational age, mainly regarding birth length (25). The majority of children with *ACAN* mutations have proportionate short stature with advanced bone age. Due to the poor pubertal spurt followed by early growth cessation, final height is still more compromised and adults present lower height SDS and, frequently, body disproportion. Other clinical features recognized in affected subjects are brachydactyly, mild midface hypoplasia, and flat nasal bridge. Some individuals present early-onset osteoarthritis, which appears until fourth decade of life and affects most commonly the knees, with a variable degree of severity (24). Whereas most children from cohorts of patients with ISS have delayed bone age, *ACAN* mutation should be suspected in a short child with advanced bone age.

IHH

The Indian hedgehog gene (*IHH*) is expressed in prehypertrophic chondrocytes of the growth plate, and codifies a key paracrine regulator of endochondral ossification, which coordinates chondrocytes proliferation and differentiation (26). Similar to what occurs with the other genes that regulate growth plate described above, *IHH* defects had already been recognized as a cause of two skeletal dysplasias. Homozygous *IHH* mutations cause acrocapitofemoral dysplasia, characterized by severe disproportionate short stature with cone-shaped epiphyses in hands and hips. Additionally, heterozygous mutations in *IHH* cause brachydactyly type A1 (BDA1), characterized by a striking shortening of the middle phalanges, which can be fused with the terminal ones (27). Interestingly, short stature was not consistently reported in patients with BDA1 (28).

In 2018, we described heterozygous *IHH* mutations as a cause of the growth impairment in an ISS cohort (frequency of 3.4%) (15). Our patients with heterozygous *IHH* variants did not present classical features of BDA1. The only recurrent radiological finding observed was a varying degree of shortening of the middle phalanx of the 5th finger (Figure 2B), which is the defining feature of Brachymesophalangia – V (BMP-V). BMP-V was observed in 64.3% hand radiographs from individuals with heterozygous mutations in *IHH* in our cohort, which was significantly higher than that observed in a population study (12.1%) (15). Four probands were born small for gestational age considering only length at birth. Affected subjects typically had mild disproportional short stature. The severity of short stature is variable and disproportionality seems to become more pronounced over the years.

FGFR3

The fibroblast growth factor receptor-3 (*FGFR3*) pathway acts as a negative regulator of the growth plate chondrogenesis (Figure 1). Heterozygous gain-of-function mutations in the *FGFR3* cause achondroplasia and hypochondroplasia. Achondroplasia is the most frequent skeletal dysplasia and is clinically characterized by severe disproportional short stature with rhizomelia (29). In contrast, hypochondroplasia is generally less severe and presents a broader phenotypic variability (30).

Although there is an evident abnormal proportion in patients with hypochondroplasia and *FGFR3* alterations

is rare in patients classified as ISS (31), some children still can be undiagnosed at first evaluation. More recently, a study identified *FGFR3*-activating mutation causing autosomal dominant familial proportionate short stature without other specific findings (32).

GENES RELATED TO THE GH-IGF1 AXIS

Since the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) have been initially recognized as the main regulators of longitudinal growth, the first researches in the field of genetics of short stature attempted to identify children with defects in the GH-IGF-1–bone axis. GH is secreted by the pituitary gland, and promotes bone elongation mainly through regulating synthesis of IGF-1, both circulating and peripheral. Growth impairment can be caused by gene defects that affect several components of this cascade (summarized in Table 2), from the synthesis of GH to the action of IGF-1. Affected subjects may not present classical features of GH/IGF-1 deficiency or resistance, in which cases they would often be classified as having ISS.

GH1

Defects in *GHI* gene, which encodes GH, were firstly recognized as a cause of isolated GH deficiency (IGHD). The genetic defects responsible for this phenotype are generally deletions involving the gene or point mutations leading to a truncated protein, although some missense mutations and rare promoter region mutations have already been reported (33). Affected

children typically present proportionate short stature with low growth velocity, low IGF-1 concentration and an inadequate response during GH provocative tests. Additionally, heterozygous and homozygous mutations in *GHI* have been associated with bioinactive GH, characterized by a similar phenotype to IGHD, except for normal or elevated GH levels (34).

Children with *GHI* defects may present a milder phenotype than that classically described, with no typical findings that allow the diagnosis of IGHD or of bioinactive GH. This may be particularly important in less severe genetic defects, as reported in a study that identified a heterozygous mutation in the *GHI* gene promoter associated to ISS (35). In these cases, the etiology of short stature remains undefined after the initial clinical and laboratorial evaluation.

GHSR

Two peptides stimulate GH synthesis and secretion: growth hormone-releasing hormone (GHRH) and ghrelin. Ghrelin acts through interaction with the GH secretagogue receptor (GHSR) and has also a potent orexigenic effect (36).

Defects in the *GHSR* gene have been associated with ISS and GH deficiency with variable severity and penetrance. Both phenotypes were even described in the same family (37). Additionally, some affected children had delayed puberty (38). This heterogeneity in clinical presentation may be partially explained because gene defects can result in protein alterations that affect the binding affinity to ghrelin and the constitutive activity of the receptor.

Table 2. Genes related to GH-IGF1 axis that are associated with isolated short stature

Gene	First report in patient classified as ISS	Frequency in ISS (%)	Inheritance	Additional common findings	References
<i>GHI</i>	2003	NA	AD	Low height velocity and delayed bone age	(35)
<i>GHSR</i>	2006	2.0 to 2.4	AD/AR	GHD and ISS in the same family	(37,55)
<i>GHR</i>	1995	0 to 5.0	AD	Laboratory suggestive of partial GH insensitivity	(56,57)
<i>STAT5B</i>	2018	NA	AD	Three families described with eczema and laboratory suggestive of partial GH insensitivity	(41)
<i>IGF1</i>	2012	NA	AD	Birth weight and birth length in the lower normal range	(45,58)
<i>IGF1R</i>	2003	1.6 to 2.0	AD	Born small for gestational age in the most cases and elevated levels of IGF-1	(46,47,59)
<i>IGFALS</i>	2004	NA	AR	Severe deficiency of IGF-1 and IGFBP-3 disproportionate to the severity of short stature	(48)
<i>PAPP-A2</i>	2016	NA	AR	High levels of IGF-1 and IGFBP-3	(50)

NA: prevalence study is not available; ISS: idiopathic short stature.

GHR

GH exerts its action by binding to the GH receptor (GHR), a member of the cytokine superfamily of receptors. Homozygous or compound heterozygous mutations in *GHR* gene cause complete GH insensitivity (GHI), known as Laron syndrome, characterized by extreme short stature, high or normal GH concentrations, very low IGF-1 and IGFBP-3 levels, and no increase in IGF-1 concentration after exogenous GH stimulation (39). Differently, heterozygous *GHR* mutations can cause a variable spectrum of GHI, ranging from total absence of GHR activation to milder impairment causing subtler clinical phenotypes.

Until now, only seven patients have been reported with heterozygous *GHR* mutations with a dominant-negative effect causing short stature with recognizable features of partial GHI. Several other studies have reported heterozygous *GHR* variants in ISS patient cohorts, with a frequency between 5% and 15.5%. However, many of these variants have not been proven to be causative of short stature. It is supposed that the ISS phenotype, accompanied by some degree of GHI, may be caused by less deleterious heterozygous *GHR* mutations. Some authors suggested that low growth hormone binding protein (GHBP) levels could indicate a defect in the extracellular domain of the GHR in these patients (40).

Hence, since the clinical characterization remains subjective, heterozygous *GHR* mutations may be responsible for the growth failure observed in a group of children with isolated short stature and non-classical laboratory phenotype associated with impaired GH action.

STAT5B

STAT5B is an essential protein in the intracellular signaling pathway downstream of GHR activation. Homozygous inactivating *STAT5B* mutations cause the classical phenotype of GH insensitivity associated with immunodeficiency (mainly eczema and chronic pulmonary disease). Relatives of autosomal recessive *STAT5B* deficient patients who carry *STAT5B* mutations usually have heights within the low normal range (41).

In 2018, three heterozygous *STAT5B* mutations with a dominant-negative effect were described in eleven individuals from three unrelated families, whose probands had undiagnosed short stature and

laboratory evaluation of mild GH insensitivity. Most of the affected individuals presented elevated IgE, mild eczema and short stature with inter- and intra-familial variability (42).

IGF1 and IGF1R

IGF-1 is the main growth factor in intrauterine development and in postnatal growth and acts through the binding to a cell surface tyrosine kinase receptor called IGF1R. Deletions or homozygous loss-of-function mutations in *IGF1* gene cause severe pre- and post-natal growth failure, microcephaly and retarded intellectual development (43). Affected patients present extreme low IGF-1 levels with normal or high GH concentrations. Individuals heterozygous for *IGF1* variants were significantly shorter and had reduced head circumferences compared to noncarrier relatives. Affected children born from affected mothers appear to have a more compromised height, which suggest a role of placental dysfunction (44).

In 2014, a complete *IGF1* gene deletion in heterozygosity was reported in a patient with ISS. The affected child had birth length and weight within the low normal value and presented postnatal growth failure with low-normal serum IGF-1 (45).

Patients heterozygous for *IGF1R* defects have a similar phenotype to that of patients with *IGF1* mutations, except for the relatively high IGF-1 concentrations (46). Although this is a rare condition, some patients may have a less obvious clinical presentation, and short stature may be the only recognizable characteristic (47).

Ternary complex defects (IGFALS and PAPP-A2)

Most of the serum IGF-1 circulates bound to IGF binding protein type 3 (IGFBP-3) and acid-labile subunit (ALS), forming a ternary complex. This complex is essential to extend serum IGF-1 half-life and to decrease its bioavailability at tissue level. On the other hand, pregnancy-associated plasma protein A2 (PAPP-A2) is a serum and tissue protease responsible for the proteolysis of IGFBP-3, releasing IGF-1 from the ternary complex.

Biallelic loss-of-function mutations in *IGFALS* result in extreme decrease in the circulating levels of functional ALS (48). The consequence of this is the impossibility to form a ternary complex with reduced IGF-1 and IGFBP-3 levels, which is reflected clinically

in mild short stature associated with delayed puberty. Over the past years, it has been postulated that heterozygous variants in *IGFALS* are responsible for isolated short stature phenotype. Affected children presented partial ALS deficiency and a mean decrease in height of 1 SDS (49).

The opposite phenomenon, *i.e.* increased IGF-1 and IGFBP-3 levels, was first described in 2016. Five affected children coming from two different families had *PAPPA2* deficiency caused by autosomal recessive mutations in *PAPPA2* gene. In addition to variable short stature (heights ranged from -1.0 to -3.8 SDS), some patients had microcephaly, thin long bones, low bone mineral density, and insulin resistance (50).

OTHER GENE

PTPN11

The protein-tyrosine phosphatase non-receptor type 11 gene (*PTPN11*) encodes the non-receptor Src-homology 2 (SH2) domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2). SHP2 participates in multiple intracellular signaling pathways, including the Ras/MAPK cascade. Activating heterozygous mutations in *PTPN11* cause the Noonan syndrome (NS), characterized by reduced postnatal growth, congenital heart disease, and facial dysmorphisms. Commonly, affected children present low serum IGF-1 level, which reflects some degree of GH insensitivity (51).

Similarly to the other genes reported above, there is a variable clinical presentation in affected individuals, even within the same family. In addition, the craniofacial features change with age, therefore it can be sometimes challenging to make a clinical diagnosis of NS. Finally, pathogenic variants in *PTPN11* have been identified in patients from a cohort of ISS children (11).

CONCLUSION AND FUTURE DIRECTIONS

Over the past several years, an increasing number of genetic variants have been associated with short stature. Many of these genes have been long known to be causing extreme phenotypes of growth disorders, which are clinically recognized, such as skeletal dysplasias or GH resistance syndromes. Nowadays, with the advent and greater availability of next-generation sequencing techniques, it has become possible to identify several gene defects in short stature children that presented

clinically with the mildest spectrum of the diseases and that were initially classified as ISS.

The identification of the genetic causes of short stature prevents children to undergo unnecessary exams, and can give hints on the growth outcomes, with or without recombinant human GH (rhGH). For example, it is known that patients with *SHOX* defects have a good response to rhGH therapy (18). Conversely, it is expected that ISS children with less severe defects of the GH-IGF-1 axis, including less severe *GHR* mutations, will respond less to rhGH use at regular dosage (40). Besides that, a CNP analog named vosoritide, that has been used as an experimental drug for the treatment of achondroplasia, can be in the future an option to treat children with nonsyndromic short stature, especially those with heterozygous mutations in the *NPR2* or in the *NPPC* genes (21).

The lack of specific characteristics makes accurate diagnosis difficult without the use of molecular genetic study. For this same reason, candidate gene analysis is generally not sufficient, and hence, a multiple-gene testing approach using next-generation sequencing (NGS) is preferable. The choice of the use of whole exome sequencing (WES) or gene-panel analysis of the genes will depend on the availability and on cost-benefit evaluation. Even when using the WES, the analysis of these patients should prioritize genes already associated with the isolated short stature phenotype. In the years that will follow, molecular genetic study using a panel of genes or exome analysis will become mandatory when investigating children with isolated short stature, with a crucial impact on treatment and follow-up.

Grants: this work was supported by Grants 2013/03236-5 (to A.A.L.J.) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant 304678/2012-0 (to A.A.L.J.) from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil* (CAPES) – Finance Code 1658266 (to G.A.V.).

Disclosure: no potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

1. Visscher PM. Commentary: Height and Mendel's theory: the long and the short of it. *Int J Epidemiol.* 2013;42(4):944-5.
2. Sisley S, Trujillo MV, Khoury J, Backeljauw P. Low incidence of pathology detection and high cost of screening in the evaluation of asymptomatic short children. *J Pediatr.* 2013;163(4):1045-51.
3. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, et al. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children

- with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4210-7.
4. Silventoinen K, Sammalisto S, Perola M, Boomsma DI, Cornes BK, Davis C, et al. Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Res.* 2003;6(5):399-408.
 5. Wood AR, Esko T, Yang J, Vedantam S, Pers TH, Gustafsson S, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet.* 2014;46(11):1173-86.
 6. Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, Lo KS, Wood AR, Kjaer TR, et al. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature.* 2017;542(7640):186-90.
 7. Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet.* 2010;11(6):446-50.
 8. Grunauer M, Jorge AAL. Genetic short stature. *Growth Horm IGF Res.* 2018;38:29-33.
 9. Dauber A, Stoler J, Hechter E, Safer J, Hirschhorn JN. Whole exome sequencing reveals a novel mutation in *CUL7* in a patient with an undiagnosed growth disorder. *J Pediatr.* 2013;162(1):202-4 e1.
 10. de Bruin C, Finlayson C, Funari MF, Vasques GA, Lucheze Freire B, Lerario AM, et al. Two Patients with Severe Short Stature due to a FBN1 Mutation (p.Ala1728Val) with a Mild Form of Acromicric Dysplasia. *Horm Res Paediatr.* 2016;86(5):342-8.
 11. Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, Miller TC, Moon JE, Derr MA, et al. Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1428-37.
 12. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet.* 1997;16(1):54-63.
 13. Vasques GA, Amano N, Docko AJ, Funari MF, Quedas EP, Nishi MY, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (*NPR2*) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):E1636-44.
 14. Nilsson O, Guo MH, Dunbar N, Popovic J, Flynn D, Jacobsen C, et al. Short stature, accelerated bone maturation, and early growth cessation due to heterozygous aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(8):E1510-8.
 15. Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, Aza-Carmona M, Sentchordi-Montane L, Barraza-Garcia J, et al. *IHH* Gene Mutations Causing Short Stature With Nonspecific Skeletal Abnormalities and Response to Growth Hormone Therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(2):604-14.
 16. Hisado-Oliva A, Ruzafa-Martin A, Sentchordi L, Funari MFA, Bezanilla-Lopez C, Alonso-Bernaldez M, et al. Mutations in C-natriuretic peptide (*NPPC*): a novel cause of autosomal dominant short stature. *Genet Med.* 2018;20(1):91-7.
 17. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res.* 2005;64(4):157-65.
 18. Marchini A, Ogata T, Rappold GA. A Track Record on *SHOX*: From Basic Research to Complex Models and Therapy. *Endocr Rev.* 2016;37(4):417-48.
 19. Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Liborio DC, Kim CA, et al. *SHOX* mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66(1):130-5.
 20. Malaquias AC, Scalco RC, Fontenele EG, Costalonga EF, Baldin AD, Braz AF, et al. The sitting height/height ratio for age in healthy and short individuals and its potential role in selecting short children for *SHOX* analysis. *Horm Res Paediatr.* 2013;80(6):449-56.
 21. Vasques GA, Arnhold IJ, Jorge AA. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(4):222-9.
 22. Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, Edmund AB, Robinson JW, Olney RC, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (*NPR2*) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat.* 2015;36(4):474-81.
 23. Gibson BG, Briggs MD. The aggrecanopathies; an evolving phenotypic spectrum of human genetic skeletal diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):86.
 24. Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, Crocker M, Douglas J, Dunbar N, et al. Clinical Characterization of Patients With Autosomal Dominant Short Stature due to Aggrecan Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(2):460-9.
 25. van der Steen M, Pfundt R, Maas S, Bakker-van Waarde WM, Odink RJ, Hokken-Koelega ACS. *ACAN* Gene Mutations in Short Children Born SGA and Response to Growth Hormone Treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(5):1458-67.
 26. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, et al. *BMP* and *Ihh/PTHrP* signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development.* 2001;128(22):4523-34.
 27. Lai LP, Mitchell J. Indian hedgehog: its roles and regulation in endochondral bone development. *J Cell Biochem.* 2005;96(6):1163-73.
 28. Liu M, Wang X, Cai Z, Tang Z, Cao K, Liang B, et al. A novel heterozygous mutation in the Indian hedgehog gene (*IHH*) is associated with brachydactyly type A1 in a Chinese family. *J Hum Genet.* 2006;51(8):727-31.
 29. Horton WA, Hall JG, Hecht JT. Achondroplasia. *Lancet.* 2007;370(9582):162-72.
 30. Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Schmidt H, Weissenbach J, Maroteaux P, et al. Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia. *J Med Genet.* 1996;33(9):749-52.
 31. Mamada M, Yorifuji T, Kurokawa K, Kawai M, Momoi T, Nakahata T. Prevalence of Mutations in the *FGFR3* Gene in Individuals with Idiopathic Short Stature. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2006;15(2):61-4.
 32. Kant SG, Cervenkova I, Balek L, Trantirek L, Santen GW, de Vries MC, et al. A novel variant of *FGFR3* causes proportionate short stature. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(6):763-70.
 33. Mullis PE. Genetics of growth hormone deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36(1):17-36.
 34. Besson A, Salemi S, Deladoey J, Vuissoz JM, Eble A, Bidlingmaier M, et al. Short stature caused by a biologically inactive mutant growth hormone (*GH-C53S*). *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2493-9.
 35. Millar DS, Lewis MD, Horan M, Newsway V, Easter TE, Gregory JW, et al. Novel mutations of the growth hormone 1 (*GH1*) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. *Hum Mutat.* 2003;21(4):424-40.
 36. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(13):4679-84.
 37. Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, et al. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest.* 2006;116(3):760-8.
 38. Pugliese-Pires PN, Fortin JP, Arthur T, Latronico AC, Mendonca BB, Villares SM, et al. Novel inactivating mutations in the *GH* secretagogue receptor gene in patients with constitutional delay of growth and puberty. *Eur J Endocrinol.* 2011;165(2):233-41.
 39. Laron Z. Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958-2003. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(3):1031-44.

40. Storr HL, Chatterjee S, Metherell LA, Foley C, Rosenfeld RG, Backeljauw PF, et al. Non-classical growth hormone insensitivity (GHI): characterization of mild abnormalities of GH action. *Endocr Rev.* 2018.
41. Scalco RC, Hwa V, Domene HM, Jasper HG, Belgorosky A, Marino R, et al. STAT5B mutations in heterozygous state have negative impact on height: another clue in human stature heritability. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(3):291-6.
42. Klammt J, Neumann D, Gevers EF, Andrew SF, Schwartz ID, Rockstroh D, et al. Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. *Nat Commun.* 2018;9(1):2105.
43. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med.* 1996;335(18):1363-7.
44. van Duyvenvoorde HA, van Setten PA, Walenkamp MJ, van Doorn J, Koenig J, Gauguin L, et al. Short stature associated with a novel heterozygous mutation in the insulin-like growth factor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(11):E363-7.
45. Batey L, Moon JE, Yu Y, Wu B, Hirschhorn JN, Shen Y, et al. A novel deletion of IGF1 in a patient with idiopathic short stature provides insight into IGF1 haploinsufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(1):E153-9.
46. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, et al. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med.* 2003;349(23):2211-22.
47. Ester WA, van Duyvenvoorde HA, de Wit CC, Broekman AJ, Ruivenkamp CA, Govaerts LC, et al. Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4717-27.
48. Domene HM, Bengolea SV, Martinez AS, Ropelato MG, Pennisi P, Scaglia P, et al. Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene. *N Engl J Med.* 2004;350(6):570-7.
49. Domene HM, Scaglia PA, Martinez AS, Keselman AC, Karabatas LM, Pipman VR, et al. Heterozygous IGFALS gene variants in idiopathic short stature and normal children: impact on height and the IGF system. *Horm Res Paediatr.* 2013;80(6):413-23.
50. Dauber A, Munoz-Calvo MT, Barrios V, Domene HM, Klooverpris S, Serra-Juhe C, et al. Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF-I availability. *EMBO Mol Med.* 2016;8(4):363-74.
51. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 2002;70(6):1555-63.
52. Hu X, Gui B, Su J, Li H, Li N, Yu T, et al. Novel pathogenic ACAN variants in non-syndromic short stature patients. *Clin Chim Acta.* 2017;469:126-9.
53. Hauer NN, Sticht H, Boppudi S, Buttner C, Kraus C, Trautmann U, et al. Genetic screening confirms heterozygous mutations in ACAN as a major cause of idiopathic short stature. *Sci Rep.* 2017;7(1):12225.
54. Hellemans J, Coucke PJ, Giedion A, De Paepe A, Kramer P, Beemer F, et al. Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. *Am J Hum Genet.* 2003;72(4):1040-6.
55. Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, et al. Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):E373-8.
56. Goddard AD, Covello R, Luoh SM, Clackson T, Attie KM, Gesundheit N, et al. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. The Growth Hormone Insensitivity Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333(17):1093-8.
57. El Kholly M, Mella P, Rashad M, Buzi F, Meazza C, Zahra S, et al. Growth hormone/IGF-I axis and growth hormone receptor mutations in idiopathic short stature. *Horm Res Paediatr.* 2011;76(5):300-6.
58. Fuqua JS, Derr M, Rosenfeld RG, Hwa V. Identification of a novel heterozygous IGF1 splicing mutation in a large kindred with familial short stature. *Horm Res Paediatr.* 2012;78(1):59-66.
59. Caliebe J, Broekman S, Boogaard M, Bosch CA, Ruivenkamp CA, Oostdijk W, et al. IGF1, IGF1R and SHOX mutation analysis in short children born small for gestational age and short children with normal birth size (idiopathic short stature). *Horm Res Paediatr.* 2012;77(4):250-60.