

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

MARIA ISABEL TELES FARIAS

FENÓTIPO ÓSSEO E CALCIFICAÇÃO DA AORTA ABDOMINAL EM IDOSOS
COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

ARACAJU

2013

MARIA ISABEL TELES FARIAS

FENÓTIPO ÓSSEO E CALCIFICAÇÃO DA AORTA ABDOMINAL EM IDOSOS
COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

Monografia apresentada à Universidade Federal de Sergipe como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Graduação em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Hermínio Aguiar-Oliveira

ARACAJU

2013

MARIA ISABEL TELES FARIAS

FENÓTIPO ÓSSEO E CALCIFICAÇÃO DA AORTA ABDOMINAL EM IDOSOS
COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

Monografia apresentada à Universidade
Federal de Sergipe como um dos pré-
requisitos para a obtenção do título de
Graduação em Medicina.

Autor(a): _____

Maria Isabel Teles Farias

Orientador: _____

Prof. Dr. Manuel Hermínio Aguiar-Oliveira

Examinador(a): _____

ARACAJU

2013

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente, iluminando e guiando meus caminhos, agradeço por mais essa bênção concedida.

A minha amada avó Maria Isabel, exemplo de humanidade, fé, amor e dedicação à família.

Aos meus queridos pais, Acácia e Perrucho, por não medirem esforços para me proporcionar sempre o melhor. Obrigada por todo amor, apoio e dedicação incondicionais.

Às minhas irmãs, Catarine e Natália, pelo companheirismo e exemplos de responsabilidade.

A Felipe, por todo o amor, incentivo e compreensão, que foram essenciais para a conclusão de mais essa etapa.

A Dr. Manuel Hermínio, exemplo de dedicação, humanidade e ética. Seu exemplo de amor à ciência foi fundamental em minha formação. Agradeço também a toda a sua equipe de pesquisa de Itabaianinha, em especial a Dra. Anita Hermínia, que, com serenidade, participou da confecção deste trabalho.

Aos anões de Itabaianinha, pela constante disposição em participar dos trabalhos de pesquisa e proporcionarem grande contribuição à ciência médica.

LISTA DE FIGURAS

I. Revisão de Literatura

Figura 1. Esquema da regulação intrínseca do eixo GH-IGF-I.....	13
Figura 2. Efeito do tamanho da amostra sobre os parâmetros ósseos comumente medidos.....	20
Figura 3. Classificação visual semiquantitativa das deformidades vertebrais. Representação gráfica.....	24
Figura 4. Classificação visual semiquantitativa das deformidades vertebrais. Representação radiológica.....	24
Figura 5. Representação do eixo somatotrófico e efeitos do IGF-1 sistêmico e parácrino no osso.....	26

LISTA DE TABELAS

III. Artigo

Tabela 1. Clinical and biochemical characteristics of the individuals.....	72
Tabela 2. Areal bone mineral density measurements and calculated volumetric BMD.....	73
Tabela 3.Type of fractures.....	74
Tabela 4. Grade of fractures.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

BMC: conteúdo mineral ósseo

DGH: Deficiência do hormônio do crescimento

DIGH: Deficiência isolada do hormônio do crescimento

DMO: Densidade mineral óssea

DP: desvio-padrão

DXA: absorção de dupla energia de raios X

GH: Hormônio do crescimento

GHR: Receptor do GH

GHRH: Hormônio liberador do GH

GHRHR: Receptor do GHRH

IGFBP: Proteína ligadora dos fatores de crescimento semelhantes à insulina

IGF-I: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I

IGF-II: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo II

IGFs: fatores de crescimento semelhantes à insulina

ITT: *Insulin tolerance test* – teste de tolerância à insulina

vDMO: Densidade mineral óssea volumétrica

SUMÁRIO

I. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1. Hipófise.....	10
2. Hormônio de crescimento.....	10
3. Fatores de crescimento semelhantes à insulina.....	11
4. Regulação da secreção de GH.....	12
5. Deficiência de GH.....	14
6. Diagnóstico de DGH.....	16
7. Tecido ósseo.....	17
8. Determinação da massa óssea.....	19
9. Osteoporose.....	21
10. Fraturas vertebrais.....	22
11. GH e metabolismo ósseo.....	25
12. DHG e massa óssea.....	27
13. Aterogênese e eixo GH/IGF-1.....	28
Referências Bibliográficas.....	30
 II. NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO.....	39
Author Guidelines for the Endocrine.....	39
1. Manuscript categories.....	39
2. Manuscript submission.....	42

3. Title page.....	43
4. Abstract.....	43
5. Text.....	44
6. References.....	45
7. Tables.....	46
8. Artwork and illustration guidelines.....	47
9. Electronic supplementary materials.....	50
10. Scientific style.....	52
11. Integrity of research and reporting.....	52
12. After acceptance.....	53

III. ARTIGO CIENTÍFICO.....55

Title.....	55
Abstract.....	56
Introduction.....	57
Subjects and Methods.....	59
Results.....	62
Discussion.....	63
Acknowledgements.....	65
Ethical standards.....	65
Conflict of interest.....	65
References.....	66

I. REVISÃO DE LITERATURA

1. HIPÓFISE

A hipófise, também denominada pituitária, é uma glândula localizada na sela turca, com 0,6g de peso (0,4 a 0,9g), conectada ao hipotálamo pelo pedículo hipofisário (GUYTON & HALL, 2002; THORNER *et al*, 2002).

Divide-se anatomicamente em hipófise anterior (adenohipófise) e hipófise posterior (neurohipófise). Embriologicamente essas porções originam-se de diferentes fontes: a hipófise anterior origina-se da bolsa de Rathke, invaginação embrionária do epitélio da faringe, e a hipófise posterior, do diencéfalo ventral (GUYTON & HALL, 2002; MELMED & KLEINBERG, 2002).

A adeno-hipófise possui cinco principais tipos de células produtoras de hormônios: somatotrofos (produtores do hormônio de crescimento - GH), corticotrofos (produtores do hormônio adrenocorticotrófico, melanotrófico-estimulante e outros pequenos peptídeos), tireotrofos (produtores do hormônio estimulante da tireóide - TSH), gonadotrofos (produzem os hormônios luteinizante e folículo-estimulante – LH e FSH), lactotrofos (produtores de prolactina). A neuro-hipófise é constituída pelos axônios distais dos neurônios hipotalâmicos magnocelulares, cujos corpos celulares localizam-se nos núcleos paraventriculares e supra-ópticos. Nesses neurônios são produzidos dois hormônios: a vasopressina ou hormônio antidiurético (ADH) e a ocitocina, secretados nos capilares da hipófise posterior (GUYTON & HALL, 2002; MELMED & KLEINBERG, 2002; THORNER *et al*, 2002).

A secreção da hipófise anterior é regulada por hormônios de liberação e inibição hipotalâmicos transportados pelo sistema porta-hipofisário e a neuro-hipófise é controlada por sinais nervosos hipotalâmicos. Há também outros fatores que regulam a secreção hipofisária, como secreções parácrinas e autócrinas da própria glândula e feedback de hormônios circulantes (MELMED & KLEINBERG, 2002; THORNER *et al*, 2002).

2. HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

O hormônio de crescimento (GH), também denominado hormônio somatotrópico ou somatotropina, é o peptídeo produzido em maior quantidade pela hipófise anterior, sendo

secretado pelos somatotrofos. Possui estrutura molecular de 191 aminoácidos e pesa cerca de 22.000 daltons. Em uma hipófise normal encontram-se 3 a 5mg de GH, com secreção diária em torno de 500 a 875ng (BOGUSZEWSKI, 2001; GREENSPAN *et al*, 1997; MELMED & KLEINBERG, 2002; THORNER *et al*, 2002)

Há cinco genes localizados no cromossomo 17 que codificam o GH. Entre eles, o gene hGH-N (ou GH1), que é seletivamente transcrito nos somatotrofos, sendo responsável pela síntese do GH hipofisário (BOGUSZEWSKI, 2001; GREENSPAN *et al*, 1997; MELMED & KLEINBERG, 2002; THORNER *et al*, 2002)

O GH regula, principalmente no período pós-natal, o crescimento somático (ósseo e dos tecidos moles) e participa do controle de processos fisiológicos como o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, manutenção da força e massa muscular e composição corporal. Além de atuar no crescimento ósseo e nos tecidos moles, o GH exerce efeitos metabólicos específicos: aumento da velocidade da síntese proteica (balanço nitrogenado positivo), maior metabolização e utilização de ácidos graxos do tecido adiposo e aumento da utilização dos carboidratos, apresentando efeito anabólico, lipolítico e antagonista da insulina.

3. FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA

Os fatores de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factors* - IGFs) são fatores de crescimento peptídicos que possuem elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina e atuam sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular. O IGF-1 e o IGF-2 são moléculas de cadeia única, formadas por 70 e 67 aminoácidos respectivamente (BOGUSZEWSKI, 2001; JONES & CLEMMONS, 1995).

Os genes codificadores dos IGFs localizam-se no braço longo do cromossomo 12 (IGF-1) e no braço curto do cromossomo 11 (IGF-2). O principal local de produção dos IGFs é o fígado, mas eles também são produzidos em outros tecidos (GREENSPAN *et al*, 1997).

O GH é um dos principais promotores da secreção do IGF-1, porém exerce discreto controle na secreção do IGF-2 (BOGUSZEWSKI, 2001). Durante o crescimento intrauterino, os IGFs apresentam menor dependência do GH, tanto é que crianças com deficiência congênita de GH apresentam discreta ou nenhuma redução do crescimento ao nascer. Entretanto, após o nascimento, o GH assume gradualmente posição de principal regulador do crescimento (MARTINELLI JUNIOR & AGUIAR-OLIVEIRA, 2005; MARTINELLI JUNIOR *et al*, 2008).

O IGF-1 é o hormônio que funciona como principal mediador de respostas anabólicas independentes de GH em várias células e tecidos. No sangue periférico, ele circula ligado a proteínas transportadoras, as IGFBPs (*insulin-like growth factor binding proteins*) e exercem suas ações mediante interação com dois diferentes receptores: tipo 1 e tipo 2 (PHILLIPS *et al*, 1981).

O receptor tipo 1 apresenta estrutura semelhante ao receptor da insulina e é o principal mediador das ações fisiológicas do IGF-1. O receptor tipo 2 tem mais afinidade pelo IGF-2 e é importante na regulação das atividades do IGF-1 e 2, tanto sequestrando esses hormônios como promovendo a degradação deles (BOGUSZEWSKI, 2001; BROWN *et al*, 2009).

Assim como os IGFs, as IGFBPs são produzidas em diversos órgãos e tecidos do organismo. Existem seis tipos de IGFBPs, que atuam não só no transporte dos IGFs, mas também modulam suas ações endócrinas e parácrinas, regulam sua bioatividade e facilitam seu armazenamento em fluidos extracelulares (DI LUIGI *et al*, 2001).

A IGFBP-3 é a principal proteína carreadora de IGF-1 e IGF-2 na circulação humana. Quando associada à molécula de IGF e à subunidade ácido lábil (ALS) GH dependente, forma um complexo ternário de grande peso molecular que não consegue atravessar a barreira endotelial, aumentando, dessa forma, a vida média dos IGFs e funcionando como um reservatório circulante de IGFs. Aproximadamente 85-90% dos IGFs circulantes liga-se a este complexo (SALVATORI *et al*, 1999).

Apesar de sua regulação não estar completamente definida, a IGFBP-2, a segunda mais abundante IGFBP, é encontrada no sangue e no líquido cefalorraquidiano. Em contraste com a IGFBP-3, ela parece inibir as ações do IGF-1, impedindo sua ligação aos receptores (DI LUIGI *et al*, 2001).

4. REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE GH

O GH é secretado de forma pulsátil ao longo do dia, com alta frequência e amplitude nos estágios III e IV do sono, com meia vida de aproximadamente 20 minutos. A amplitude dos picos de GH é determinada pela quantidade de GHRH liberada, enquanto a frequência e a duração desses picos são reguladas pela somatostatina (THORNER *et al*, 2002).

A secreção do GH é modificada pela idade. É alta no período fetal e neonatal, declina durante a infância, aumenta na puberdade e vai decaindo na vida adulta para concentrações

semelhantes à observada em indivíduos pré-púberes (GIUSTINA *et al*, 1998; VAISSMANM *et al*, 2001).

O controle da secreção é realizado por complexos hipotalâmicos e periféricos complexos, destacando-se a ação de dois peptídeos hipotalâmicos (somatostatina e hormônio liberador de GH - GHRH). Também sofre influência da grelina, IGF-1, hormônios tireoideanos, glicocorticoides, esteroides gonadais e neurotransmissores, como acetilcolina e noradrenalina (MELMED & KLEINBERG, 2002).

O GHRH é um peptídeo constituído por 42 a 44 aminoácidos, que induz seletivamente a transcrição do gene do GH e a liberação do hormônio, além de ser um determinante da atividade mitótica dos somatotrofos (GIUSTINA *et al*, 1998).

A somatostatina suprime o GH basal, controlando a frequência e a amplitude do pulso de GH e diminui sua resposta aos secretagogos sem alterar os níveis de seu RNA mensageiro (GIUSTINA *et al*, 1998).

As secreções de GHRH e de somatostatina sofrem autorregulação, sendo que o GHRH também estimula a liberação de somatostatina. Além disso, o GH estimula o IGF-1 que, por retroalimentação negativa no hipotálamo e na hipófise, estimula a liberação de somatostatina e inibe a transcrição do gene e a secreção do GH (THORNER *et al*, 2002).

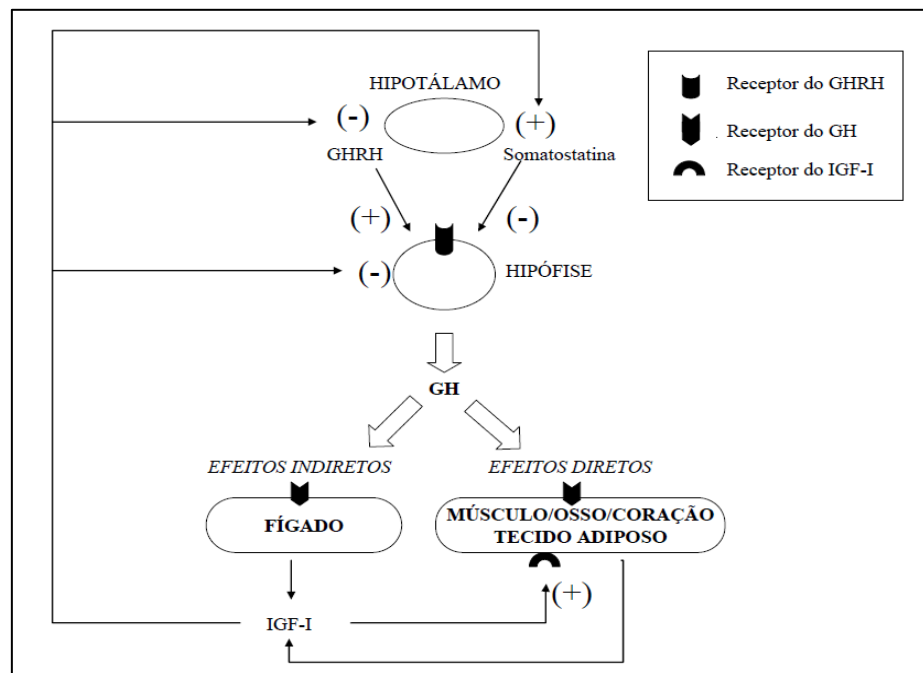


Figura 1. Esquema da regulação intrínseca do eixo GH-IGF-I (AGUIAR-OLIVEIRA *et al*, 2010).

A grelina, peptídeo com 28 aminoácidos, é sintetizada primariamente em tecidos periféricos, especialmente nas células neuroendócrinas da mucosa gástrica e estimula a secreção de GH (ARVAT *et al*, 2001; GIUSTINA *et al*, 1998).

Os hormônios tireoideanos parecem agir como fatores permissivos necessários para a função secretória do somatotrofo. Os glicocorticoides estimulam agudamente a secreção do GH, mas cronicamente a inibem. Os estrogênios, por sua vez, atuam no hipotálamo inibindo a secreção da somatostatina (THORNER *et al*, 2002). A acetilcolina também é um modulador do GH, diminuindo a liberação de somatostatina ou aumentando o GHRH. Agonistas alfa-2-adrenérgicos induzem a liberação de GH, enquanto os agonistas alfa-1- e beta-adrenérgicos a inibem (AL-DAMLUJI, 1993; GIUSTINA *et al*, 1998).

Outros fatores estão também muito relacionados com a secreção de GH, como obesidade, desnutrição, diabetes mellitus e jejum prolongado. A hipoglicemia é um potente estímulo para a secreção de GH, enquanto a hiperglicemia estimula a liberação de somatostatina e bloqueia a secreção de GH. Desnutrição crônica e jejum prolongado associam-se ao aumento da frequência e amplitude de pulso de GH (VAISSMANM *et al*, 2001).

5. DEFICIÊNCIA DE GH

A deficiência de GH (DGH) é classificada em esporádica ou familiar. Entre as causas de DGH esporádica encontram-se causas congênitas (deficiência ou ausência do gene para o GH, defeitos da linha média, síndromes de Prader Willi e Laurence-Moon Biedl, síndrome da sela vazia, agenesia, hipoplasia ou ectopia da hipófise), adquiridas (tumores intracranianos, doenças hematológicas, autoimunes e granulomatosas, infecções pré-natais e do sistema nervoso central, radioterapia intracraniana), variantes (síndrome de Laron, GH biologicamente inativo) e idiopáticas (possível associação com trauma intrauterino ou perinatal) (SALVATORI *et al*, 1999; SALVATORI *et al*, 2001).

A DGH pode ocorrer de forma isolada (DIGH) ou associada a déficits de múltiplos hormônios hipofisários. A DIGH é pouco frequente, ocorrendo em cerca de 1:4.000 a 1:10.000 nascidos vivos. A DIGH genética compreende quatro diferentes tipos de acordo com o grau de deficiência de GH e o padrão genético de herança (BOGUSZEWSKI, 2001; PHILLIPS *et al*, 1981; SOUZA, 1997; SOUZA *et al*, 2004):

- Tipo IA: herança autossômica recessiva, com níveis séricos ausentes de GH. Ocorre por deleção no gene GH-1, sendo a forma mais severa de DIGH. As crianças afetadas apresentam retardo de crescimento já aparente nos primeiros seis meses de vida. Os pacientes desenvolvem anticorpos anti-GH com o uso da terapia com GH.

- Tipo IB: forma mais frequente de DIGH, herança autossômica recessiva com níveis de GH severamente diminuídos. Ocorre produção de moléculas mutantes de GH com uma sequência de aminoácidos distinta do GH normal, que reagem pouco nos radioimunoensaios de GH e não exercem qualquer atividade biológica, mas que criam tolerância imunológica, o que evita a formação de anticorpos anti-GH. Dessa forma, os indivíduos afetados respondem bem à terapia com GH. Os defeitos incluem: mutação de códon de parada, mutação no sítio de emendas, mutação com sentido trocado, mutação da matriz de leitura. Apenas 1,7% dos casos de DIGH tipo IB se deve a mutações no gene do GH-1, sendo a maioria das causas por mutações em outros genes, destacando-se a mutação no receptor do GHRH (GHRH-R).

- Tipo II: herança autossômica dominante. As mutações ocorrem no íntron 3 e afetam a transcrição do exon 3, responsável pela sequência de aminoácidos 32-71 da molécula do GH. Os indivíduos afetados são heterozigotos e as mutações são dominantes negativas, ou seja, o alelo mutante prevalece sobre o alelo não afetado e consegue interferir na síntese e/ou liberação da molécula normal de GH, apresentando níveis séricos de GH reduzidos, porém detectáveis. Não desenvolvem anticorpos anti-GH e respondem bem à terapia com GH.

- Tipo III: forma mais rara de DIGH, herança ligada ao cromossomo X. Alguns indivíduos afetados apresentam agamaglobulinemia associada, o que sugere que pode haver defeitos em genes contíguos ou mutações em múltiplos loci.

A primeira mutação no gene do GHRH-R ocasionando a DIGH tipo IB foi descrita em três famílias do subcontinente indiano, sendo uma delas conhecida como os “anões de Sindh”. Na população de Sindh encontrou-se a mutação GAG → TAG no códon 72, correspondente ao aminoácido residual 50 na proteína madura do GHRH-R. O “nanismo de Sindh” representa o homólogo do “*little mouse*” descrito em 1976, em que a mutação no GHRH-R abole o sítio de ligação para o GHRH, causando resistência ao mesmo, hipoplasia pituitária e DIGH (BAUMANN & MAHESHWARI, 1997; SOUZA *et al*, 2004).

A segunda mutação foi descrita por nosso grupo: 105 indivíduos da região de Carretéis e arredores - Itabaianinha-SE. Trata-se de uma mutação homozigótica tipo *splice* no início do íntron 1, onde a G foi substituída pela A (c.57+1G>A). Ela impede a síntese de RNA mensageiro do GHRH-R, o que causa deficiência severa de GH. Os indivíduos afetados

(MUT/MUT) apresentam baixa estatura acentuada e os indivíduos heterozigotos (MUT/N) parecem não apresentar déficit estatural na idade adulta (HAYASHIDA *et al*, 2000; SALVATORI *et al*, 1999; SALVATORI *et al*, 2001; SALVATORI *et al*, 2002).

6. DIAGNÓSTICO DE DGH

As crianças com DGH geralmente apresentam uma expressão clínica que permite suspeitar da deficiência hormonal: redução da velocidade de crescimento, baixa estatura, cabelos esparsos, raiz nasal hipoplásica, fronte proeminente, órbitas rasas, fácies de querubim ou boneca (desproporção entre calvário e ossos da face), dentição retardada, obesidade e voz de timbre agudo. A fundamentação clínica para a suspeita diagnóstica de DGH em crianças deve ser a medida da altura e velocidade de crescimento por, no mínimo, 06 meses (SHALET *et al*, 1998; MENEZES *et al*, 2004).

Em adultos, a DGH consiste em uma síndrome clínica caracterizada por alterações na composição corporal (redução da massa magra, da água corporal total e da densidade mineral óssea e aumento dos níveis de leptina e da massa gorda, obesidade central) que contribuem para a resistência insulínica, alterações no perfil lipídico (aumento do colesterol total, triglicérides, lipoproteína de baixo peso molecular – LDL, apolipoproteína B e redução da lipoproteína de alto peso molecular – HDL) e predisposição à aterogênese (aumento do fibrinogênio e da atividade do inibidor do ativador do plasminogênio – PAI-1), principalmente na DGH de longa data como a iniciada na infância. Outras características incluem pele fina e seca, redução da capacidade física e alteração do bem-estar psicológico (humor deprimido, fadiga, diminuição da memória e isolamento social) (BARRETTO *et al*, 1999; BARRETO-FILHO *et al*, 2002; DAVIDSON, 1987; JOHANSSON *et al*, 1995; ROSÉN *et al*, 1993).

Os níveis de GH frequentemente são indetectáveis em amostras sanguíneas obtidas aleatoriamente de indivíduos normais, já que sua meia-vida é curta e sua secreção ocorre de forma pulsátil. Assim, testes de estímulo foram introduzidos na investigação diagnóstica da DGH, incluindo arginina, L-dopa, propranolol, clonidina, glucagon e insulina. A hipoglicemia induzida pela insulina (*insulin tolerance test* – ITT) é o teste de estímulo mais utilizado, sendo considerado o padrão-ouro (GROWTH HORMONE RESEARCH SOCIETY, 1998).

Após a exclusão de outras causas de baixa estatura, utilizam-se dois testes de estímulo de secreção de GH para o diagnóstico de DGH. O paciente geralmente apresenta altura

menor que -2 desvios-padrão (DP), velocidade de crescimento menor que 4,5 cm/ano e ausência de resposta a um dos testes farmacológicos (crianças com picos de GH menores que 10mg/l e adultos com picos abaixo de 5µg/l após ITT são indicativos de DGH). Em Itabaianinha, utilizamos o teste da clonidina e a hipoglicemia insulínica para o diagnóstico da DGH (GROWTH HORMONE RESEARCH SOCIETY, 1998).

A dosagem do IGF-1 pode permitir o diagnóstico de DGH, por apresentar níveis plasmáticos mais estáveis e meia-vida mais longa do que o GH (3 horas). Seus resultados devem ser interpretados em função da idade cronológica e do estágio puberal (MARTINELLI JUNIOR *et al*, 2002).

Dados obtidos em Itabaianinha-SE demonstraram que a dosagem de IGF-I é o parâmetro mais apropriado para definição do GH em crianças, adolescentes ou adultos maiores de 50 anos. A deficiência de IGF-I é determinada em qualquer idade quando seu valor é menor que 35g/l (ou menor que -2 DP). Ausência de resposta em único teste de estímulo define DGH ou resistência ao GH. IGF-I menor que 70 g/l em pré-púberes e adultos, ou menor que 170g/l em púberes, ou ainda menor que -1 DP é altamente sugestivo de deficiência de IGF-I. Nestes casos, dois testes de secreção de GH com resposta subnormal estabelecem diagnóstico de DGH. Em adultos com menos de 50 anos a subunidade ALS seria mais apropriada (MARTINELLI JUNIOR *et al*, 2002).

7. TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido dinâmico, que passa por remodelações constantes durante toda a vida. É o principal constituinte do esqueleto, o qual serve de suporte para as partes moles, protege órgãos e constitui um sistema de alavancas que amplia a força gerada pelo sistema muscular. Além da função mecânica de sustentação, locomoção e proteção de órgãos, o osso forma um reservatório de cálcio, magnésio, fósforo e outros íons essenciais às funções homeostáticas (HOLICK & KRANE, 2002).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea, a qual é constituída por uma parte orgânica e por outra inorgânica. O componente orgânico, majoritariamente constituído por colágeno tipo I, confere ao osso uma grande capacidade de resistência às forças de tensão. O componente inorgânico consiste principalmente em fosfatos de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatita (ANDIA *et al*, 2006).

As células constituintes desse tecido são: osteócitos, encontrados no interior da matriz óssea; osteoblastos, responsáveis pela formação óssea com a produção de colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas e concentração do fosfato de cálcio, participando da mineralização óssea; e os osteoclastos, que reabsorvem o tecido ósseo, participando do processo de remodelação óssea.

A remodelação óssea resulta das interações de múltiplos elementos, como os osteoblastos, osteoclastos, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, cujo resultado consiste na manutenção da arquitetura do osso e preservação sistêmica da homeostasia do cálcio. Os mecanismos de remodelação óssea permitem não só a constante adaptação funcional e otimização das estruturas ósseas, como também ajudam a remover e reparar áreas de tecido danificado (MOLINA, 2007).

Esse processo é contínuo e consiste em quatro fases. A ativação é o primeiro estágio do processo e envolve o recrutamento das células precursoras de osteoclastos que estão em repouso no sítio de remodelação. Os osteoclastos são recrutados, estimulados para diferenciação e guiados a uma área da superfície óssea a ser reabsorvida. Na fase de reabsorção, os osteoclastos degradam a matriz óssea mineralizada e formam uma lacuna. Em seguida, a fase de reversão é a transição entre destruição e reparo ósseo, quando a lacuna é limpa e preparada por células mononucleadas. Quando a fase de formação é iniciada os osteoblastos diferenciam-se nos sítios previamente reabsorvidos. A fase de formação envolve a produção de matriz óssea e se inicia com a ativação de pré-osteoblastos, que se diferenciam em osteoblastos. Estes, primeiramente depositam uma substância osteóide, a qual é mineralizada em cerca de três semanas (AMADEI *et al*, 2006).

A massa óssea aumenta durante toda a infância e adolescência, sendo, o pico de massa óssea, atingido por volta dos 20-30 anos. O crescimento do esqueleto ocorre primariamente através do processo de modelagem óssea e apenas parcialmente através de remodelação óssea. Esses mecanismos envolvem uma interação entre osteoblastos e osteoclastos, que atuam de modo cooperativo sob a influência da carga mecânica imposta sobre o osso pela força da musculatura esquelética. A diminuição da carga mecânica leva à perda óssea, enquanto o seu aumento estimula a atividade osteoblástica e a formação óssea (MOLINA, 2007).

Existem dois tipos principais de osso, o esponjoso (trabecular) e o cortical. O osso cortical corresponde a 80% do esqueleto e constitui a parte externa do osso, proporcionando a força mecânica além de manter uma resposta metabólica. O osso esponjoso corresponde a 20%, sendo a parte interna dos ossos longos, corpos vertebrais e pelve, sendo mais importante do ponto de vista metabólico que o cortical. O osso trabecular é oito vezes mais ativo em

remodelação que o cortical, por isso que em qualquer doença osteometabólica, a perda óssea ocorre inicialmente em ossos predominantemente trabeculares (COMARCK, 2003).

Um dos principais fatores da perda óssea relacionada com a idade é a diminuição na produção hormonal. O processo de perda óssea é progressivo, começando em torno de 50 anos nos homens e na menopausa em mulheres, e essa perda prossegue em uma velocidade média de 1% por ano até o final da vida. A perda aguda do osso que acompanha a menopausa nas mulheres envolve a maior parte do esqueleto, porém afeta particularmente o componente trabecular. Nos homens, a perda óssea está ligada a um declínio da função gonadal relacionado com a idade e deve-se a uma diminuição da formação óssea (HOLICK & KRANE, 2002; MOLINA, 2007).

8. DETERMINAÇÃO DA MASSA ÓSSEA

A medição da massa óssea é o melhor indicador mensurável do padrão ósseo e é útil na avaliação do risco de fraturas osteoporóticas. Várias técnicas estão disponíveis para estimar a massa ou densidade esqueléticas. A mais amplamente utilizada para diagnóstico e acompanhamento da osteoporose é a medida da absorção de dupla energia de raios X (DXA). Os locais mais importantes a serem medidos são a coluna lombar (L1-L4 ou L2-L4) e o colo do fêmur. O antebraço distal, o calcânhar e as falanges são outros sítios que podem ser avaliados (LIMA *et al*, 2009).

Na técnica da DXA, duas energias de raios X são empregadas para estimar a área de tecido mineralizado, e o conteúdo mineral é dividido pela área, que corrige parcialmente o tamanho corporal. A DMO areal (g/cm^2) é calculada dividindo-se o conteúdo mineral ósseo (g), pela área projetada da região específica. Entretanto, essa correção é apenas parcial, pois a DXA é uma técnica de imagem bidimensional e não pode avaliar a profundidade ou o comprimento anteroposterior do osso. Dessa maneira, as pessoas de pequena estatura tendem a apresentar uma DMO menor que a média (HOLICK & KRANE, 2002).

A influência do tamanho do osso na medida da DMO é ilustrada (FIGURA 3), considerando o efeito ao duplicar a medida linear de um osso hipotético. O conteúdo mineral ósseo (*bone mineral content* – BMC) é a quantidade total de osso mineral (g) na amostra. A DMO areal é calculada dividindo-se BMC pela área projetada. Os dois exemplos de ossos aparentemente apresentam a mesma DMO volumétrica (vDMO), conteúdo mineral ósseo dividido pelo volume. No entanto, a DMO areal (conteúdo mineral ósseo dividido pela área) da

maior amostra parece ser o dobro da DMO areal da menor amostra. Esse fenômeno sugere que pessoas altas e baixas podem ter, enganosamente, elevada e baixa DMO, respectivamente (CARTER *et al*, 1992).

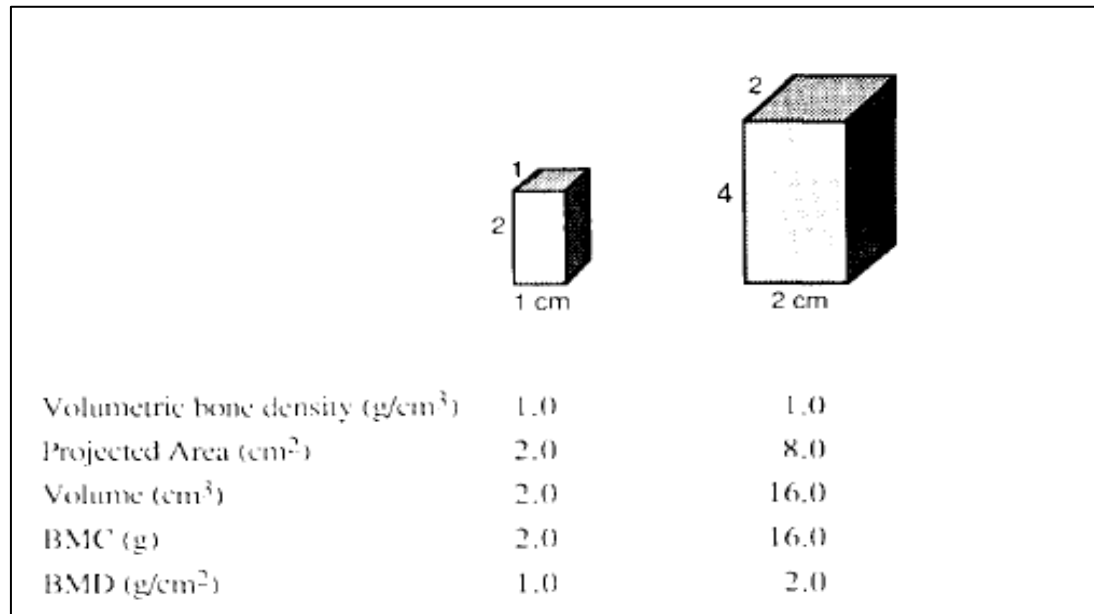


Figura 2. Efeito do tamanho da amostra sobre os parâmetros ósseos comumente medidos (CARTER *et al*, 1992).

Uma vez que demonstraram que a DMO pode ser enganosa, quando utilizada para comparar ossos de diferentes tamanhos, devido a desvios inerentes causadas por diferenças de espessura do osso, Carter e cols. (1992) propuseram a utilização de uma vDMO (g/cm³), estimada matematicamente em L1-L4. A seguinte equação foi utilizada $vDMO = \alpha/\beta$, na qual α é a DMO (g/cm²) da coluna lombar de L1-L4 e β é a raiz quadrada da área do osso (CARTER *et al*, 1992).

Tornou-se uma prática padronizada relacionar os resultados a valores “normais” usando os escores T, que comparam os resultados individuais com aqueles de uma população jovem de raça e sexo equivalentes. Como alternativa, os escores Z comparam os resultados individuais com aqueles de uma população de idade equivalente, também compatível com raça e sexo. Para cada desvio-padrão (DP) de diminuição na DMO em relação ao adulto jovem (pico de massa óssea), o risco de fraturas se eleva em 1,5 a 3 vezes (LIMA, 2009).

A OMS propõe os seguintes critérios diagnósticos para osteoporose, levando em consideração o escore T:

- Normal: DMO $\geq$ -1 DP em relação ao adulto jovem (escore T)

- Osteopenia: DMO entre -1 DP e -2,4 DP
- Osteoporose: $DMO \leq -2,5$ DP
- Osteoporose grave: $DMO \leq -2,5$ DP, associada a uma ou mais fraturas patológicas.

Vale a pena ressaltar que a DMO não é o único determinante do risco de fraturas osteoporóticas. A qualidade óssea é também muito importante, e sua determinação é multifatorial, envolvendo elementos como a DMO, distribuição geométrica da massa óssea e sua microarquitetura trabecular, a remodelação óssea, elementos genéticos, micro lesões, área corporal, fatores ambientais, etc. (LIMA *et al*, 2009).

9. OSTEOPOROSE

Osteoporose é habitualmente definida como uma doença caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a um maior risco para fraturas (RAISZ & RODAN, 2003). Operacionalmente ela é definida como uma densidade óssea que cai 2,5 DP abaixo da média, também referida como um escore T menor ou igual a -2,5. Ela representa o distúrbio osteometabólico mais comum, predominando no sexo feminino, e se constitui em um importante problema de saúde pública (BROWN *et al*, 2003).

A osteoporose pode ser primária ou secundária. Osteoporose primária é a forma mais comum e resulta de uma perda óssea relacionada à perda da função ovariana na menopausa ou ao envelhecimento. Osteoporose secundária é aquela causada por medicações ou condições mórbidas que predisõem à perda da massa óssea. O fator etiológico mais comum, em ambos os sexos, é o uso crônico de glicocorticoides em doses suprafisiológicas. Outras condições envolvidas incluem distúrbios hormonais (síndrome de Cushing, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo, hiperprolactinemia, hipogonadismo, etc.), neoplasias (sobretudo o mieloma múltiplo), distúrbios gastrointestinais (doença celíaca e outros que cursam com má absorção intestinal), insuficiência renal crônica, imobilização prolongada, artrite reumatoide, anorexia, etc. (LIMA *et al*, 2009).

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da osteoporose. Os dois principais determinantes do risco são o pico de massa óssea (quantidade máxima de osso mineral acumulada) e a velocidade de perda óssea. O pico de massa óssea é alcançado até o final da segunda década, sendo influenciado pela genética (até 85%) e por fatores exógenos. A perda

óssea pré- e pós-menopausa é inevitável e faz parte do processo normal de envelhecimento. Quanto maior o pico de massa óssea alcançado, maior será a DMO à época da menopausa e, conseqüentemente, menor o risco de fraturas osteoporóticas no futuro (RAISZ & RODAN, 2003).

Entre os fatores ambientais que interferem com o risco de osteoporose, podemos citar fatores nutricionais (dieta vegetariana e dieta rica em sódio ou fosfato, ou pobre em cálcio, desnutrição), estilo de vida (sedentarismo, tabagismo, consumo excessivo de cafeína ou de bebidas alcoólicas), status hormonal (puberdade atrasada, menopausa precoce), baixo peso, uso prolongado de medicamentos (glicocorticoides, lítio, inibidores de bomba de prótons, etc.) (LIMA *et al*, 2009).

10. FRATURAS VERTEBRAIS

As fraturas ósseas são a principal causa de morbidade e de mortalidade associadas à osteoporose. O impacto econômico de fraturas osteoporóticas para o sistema de saúde é grande e crescente. Com o aumento da expectativa de vida populacional, e com o conseqüente aumento do número de idosos, espera-se um incremento nos gastos em assistência médica relacionados a essa condição. Nos Estados Unidos, o custo médico direto associado a fraturas osteoporóticas é estimado em 36,2 bilhões de dólares (VANESS & TOSTESON, 2005).

Embora frequentemente não diagnosticadas, as fraturas vertebrais são as fraturas osteoporóticas mais comuns. Entretanto, apenas um terço delas é reconhecido clinicamente, pois muitas são relativamente assintomáticas sendo identificadas acidentalmente durante uma radiografia realizada por outros motivos. As fraturas vertebrais raramente necessitam de hospitalização, porém estão associadas à redução na qualidade de vida, a um aumento na morbidade e mortalidade, e a um risco aumentado de outras fraturas (EL MAGHRAOUI *et al*, 2009). As fraturas múltiplas levam à redução da altura, cifose e à dor e desconforto secundários relacionados à biomecânica do dorso. As fraturas torácicas podem estar associadas a sintomas abdominais, incluindo distensão, saciedade precoce e constipação (HOLICK & KRANE, 2002).

As fraturas vertebrais estão associadas a redução da função pulmonar, dor crônica no dorso, redução da altura, cifose, desconforto abdominal, perda de independência e morte. A taxa de mortalidade em 05 anos após uma fratura vertebral clínica é cerca de 20% maior do que esperado, sendo mais elevada em homens do que em mulheres. A mortalidade aumenta

como número de fraturas vertebrais (ENSRUD *et al*, 2000). Novas fraturas vertebrais, mesmo as não reconhecidas clinicamente, estão associadas a maior dor nas costas e limitação funcional (HASSERIUS *et al*, 2003). A presença de fraturas vertebrais é um fator de risco para futuras fraturas ósseas, independente da DMO.

O método padrão para avaliar fratura vertebral é a radiografia da coluna vertebral toracolombar. No entanto, não existe um padrão de ouro para a definição da fratura vertebral osteoporótica. Muitos métodos foram desenvolvidos para a interpretação de raios X da coluna vertebral, entre eles o método semiquantitativo de Genant (GENANT *et al*, 1993), o qual tem sido usado como um substituto padrão-ouro em uma série de estudos sobre osteoporose. Este método é mais objetivo e reproduzível quando comparado com outros métodos qualitativos (JIANG *et al*, 2004).

A morfometria vertebral, usando a DXA, tem um grande potencial para uso clínico na detecção de fraturas vertebrais, por ser uma técnica rápida e com pouca radiação (LEWIECKI & LASTER, 2006). Existe, também, a conveniência para o paciente sendo feita no mesmo momento e com o mesmo equipamento usado na determinação da DMO pelo DXA. Com o paciente em decúbito lateral, imagens laterais da coluna vertebral de T4 a L4 são obtidas usando-se o DXA. Usando um cursor, seis pontos são marcados em cada corpo vertebral, nas margens anterior, média e posterior. A partir desses pontos são medidas as alturas anterior (AA), média (AM) e posterior (AP) do corpo vertebral. Em seguida são calculadas as razões: AA/AP (cunha), AM/AP (biconcavidade) e AP/AP^{+1} ou AP/AP^{-1} (esmagamento), onde AP^{+1} e AP^{-1} são, respectivamente, a altura posterior da vértebra acima e abaixo da examinada (GENANT *et al*, 1993).

As fraturas vertebrais são classificadas de acordo com o método semiquantitativo de Genant em: fratura grau 1 (leve), redução da altura vertebral de 20 a 25%; grau 2 (moderado) redução de 26 a 40%, e grau 3 (grave) redução de mais de 40%.⁶³ (FIGURAS 4 E 5)

A morfometria vertebral pode ainda detectar calcificações na aorta abdominal, um importante marcador de doença cardiovascular subclínica. Alguns estudos prévios sugerem que a severidade na calcificação da aorta, avaliada pela DXA, está associada com uma maior prevalência de fraturas vertebrais na população geral (RAJZBAUM *et al*, 2005; SZULC *et al*, 2008).

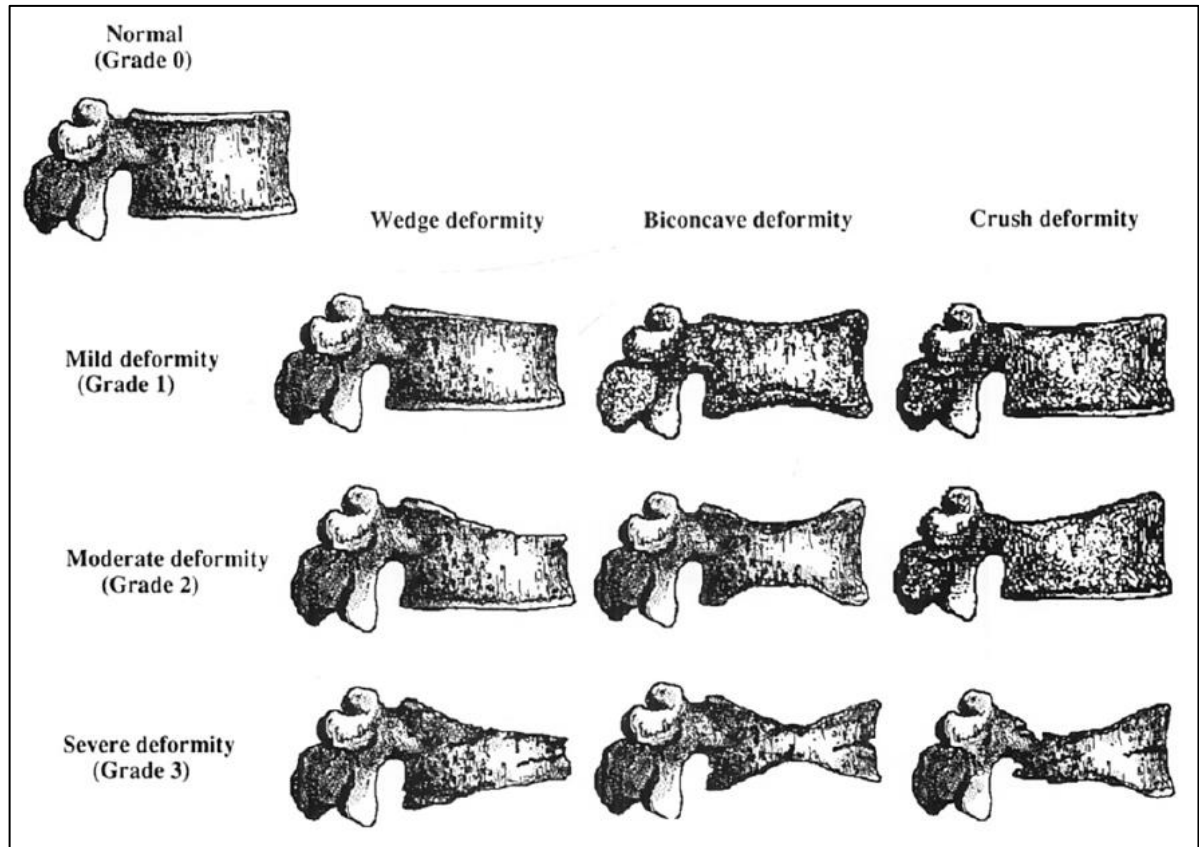


Figura 3. Classificação visual semiquantitativa das deformidades vertebrais. Representação gráfica. (Normal: grau 0; Deformidade leve: grau 1; moderada: grau 2; grave: grau 3. Deformidade em cunha, bicôncava e em esmagamento (GENANT *et al*, 1993).

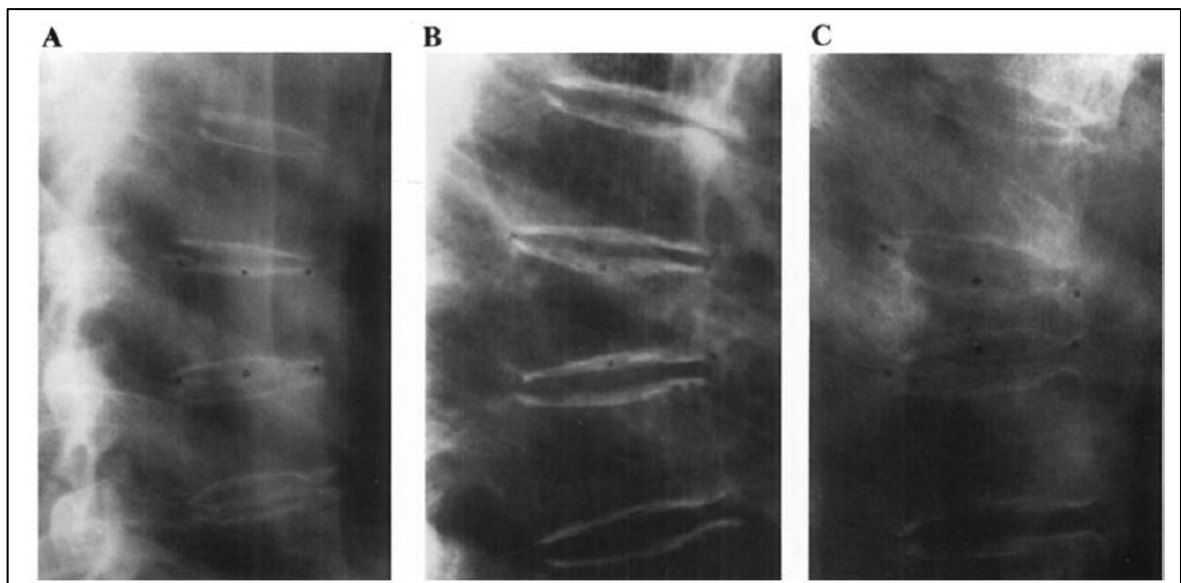


Figura 4 – Classificação visual semiquantitativa das deformidades vertebrais. Representação radiográfica: (A) Leve, grau 1, fratura em cunha de vértebra torácica. (B) Moderada, grau 2, fratura em cunha de vértebra torácica. (C) Grave: grau 3, fratura em cunha e em esmagamento de vértebra torácica (GENANT *et al*, 1993).

11. GH E METABOLISMO ÓSSEO

GH e IGF-1 exercem um significativo papel na regulação do metabolismo ósseo. Durante o período pré-puberal, o GH estimula o crescimento ósseo longitudinal. O eixo GH-IGF constitui a via final mediante a qual a maioria dos fatores que atuam no processo de crescimento exerce sua ação. O recrutamento das células a partir da zona de reserva da cartilagem de crescimento (diferenciação dos condrócitos) parece ser determinado pela ação direta do GH, enquanto a hiperplasia e a hipertrofia das células recrutadas (expansão clonal) dependem da ação dos IGFs (CLAYTON & GILL, 2001; OHLSSON *et al*, 1998). Durante as fases de adolescência e adulto jovem, o GH estimula a maturação esquelética até o pico de massa óssea ser atingido.

No adulto, o eixo GH-IGF exerce um papel importante na manutenção da massa óssea, ao regular a remodelação óssea. A primeira evidência da importância do GH no remodelamento ósseo ocorreu em 1972, após a administração de GH em cães adultos foi demonstrado aumento de sua massa óssea (HARRIS & HEANEY, 1969). Os efeitos do GH no tecido ósseo são mediados através de uma complexa interação entre GH, IGFs e IGFBPs circulantes, e IGFs e IGFBPs sintetizados localmente, agindo de maneira autócrina e parácrina (UELAND *et al*, 2011). No osso, IGF-1e IGF-2 são produzidos por osteoblastos e estimulam a formação óssea e a síntese de colágeno. O IGF-1 também estimula a formação e ação de osteoclastos.

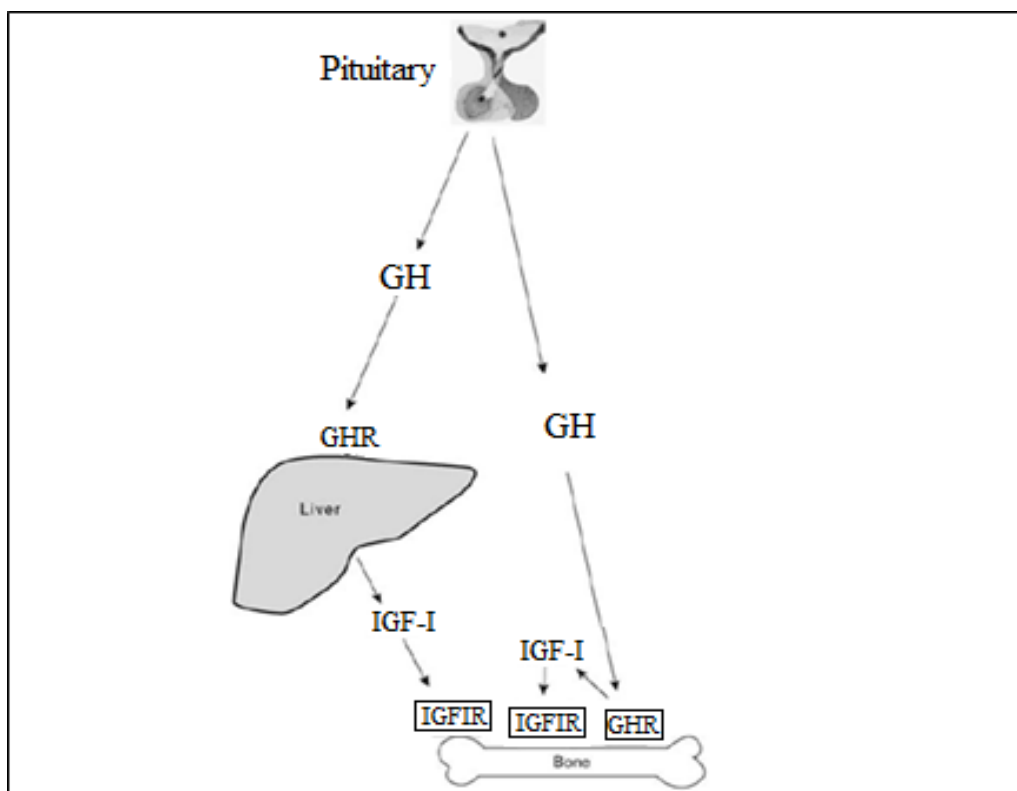


Figura 5. Representação do eixo somatotrófico e efeitos do IGF-1 sistêmico e parácrino no osso. GH, *growth hormone*; GHR, *growth hormone receptor*; IGF-I, *insulin-like growth factor I*; IGFIR, *IGF-I receptor* (TRITOS & BILLER, 2009).

Estudos *in vitro* mostraram que o GH e o IGF-1 se ligam a pré-osteoblastos e aos osteoblastos maduros para induzir suas diferenciação e proliferação, enquanto também regulam a diferenciação e ativação dos osteoclastos, proporcionando um mecanismo para acoplar formação e reabsorção ósseas (MOCHIZUKI *et al*, 1992; PATEL *et al*, 2002).

A concentração de IGF-1 na matriz óssea de mulheres está positivamente associada a estimativas histológicas de formação e reabsorção óssea. Os níveis de IGF-1 circulante estão positivamente correlacionados com a DMO em mulheres com osteoporose e homens com osteoporose idiopática (KURLAND *et al*, 1997; SUGIMOTO *et al*, 1997). Uma associação positiva entre os níveis de IGF-2 e DMO também foi observada em mulheres e homens idosos. Também existem evidências que indicam uma relação inversa entre níveis de IGF-1 e a idade cronológica (GILLBERG *et al*, 2002).

Os níveis de GH declinam com o envelhecimento. A secreção de GH reduz aproximadamente 14% a cada década de vida do adulto, após a puberdade. Dessa forma, um eixo GH disfuncionante pode, assim, desempenhar um papel na patogênese da osteoporose pós-menopausa e senil (PADOVA *et al*, 2011).

12. DGH E MASSA ÓSSEA

Em humanos, a DGH está associada a uma formação óssea reduzida. Pacientes com DGH de início na infância apresentam baixa estatura e menor DMO, mesmo quando ajustada para o tamanho pequeno de sua estrutura óssea (BARONCELLI *et al*, 2003). Pacientes com DGH iniciada na idade adulta também apresentam menor DMO. Entretanto, DMO vertebral é significativamente menor na DGH de início precoce comparada à DGH iniciada na fase adulta (MURRAY *et al*, 2004; TRITOS & BILLER, 2009).

A comparação dos resultados da DMO em adultos com DGH revela um maior grau de osteopenia na DGH de início na infância. Parece, portanto, que a idade de início da DGH é um importante fator na determinação da severidade da osteopenia associada aos baixos níveis de GH. Isso pode estar relacionado, em parte, à idade em que a mineralização óssea é finalizada. O pico de massa óssea é atingido precocemente, até a terceira década de vida. Assim, adultos que desenvolvem DGH após os 30 anos de idade também desenvolvem osteopenia, porém cada vez menos severa com o aumento da idade (HOLMES *et al*, 1994).

A DGH serve como um modelo para estudo do efeito do GH sobre o metabolismo ósseo. Além dos já estudados efeitos da administração do GH na cartilagem epifiseal, levando a um aumento do crescimento linear na criança e no adolescente, muitas evidências indicam que a reposição do GH está associada com um aumento na remodelação óssea (TRITOS & BILLER, 2009).

Indivíduos com deficiência isolada de GH pela mutação (c.57+1G>A) no receptor do gene do GHRH, em Itabaianinha/SE, apresentam DMO volumétrica normal da coluna lombar e fêmur, apesar de apresentarem menor DMO areal (EPITÁCIO-PEREIRA *et al*, 2013).

Esses indivíduos também apresentam menor resistência óssea, mensurada pela ultrassonografia do calcâneo, comparado aos controles. O tratamento com GH de depósito, administrado a cada 15 dias durante 06 meses nos indivíduos adultos com DIGH melhorou esta rigidez óssea, devido à indução de um padrão anabólico no remodelamento ósseo (DE PAULA *et al*, 2009). Marcadores de formação óssea, como osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e pró-peptídeo carboxiterminal do pró-colágeno tipo I, e marcadores de reabsorção óssea como piridinolina, hidroxipiridinolina, telopeptídeo do colágeno tipo I e hidroxiprolina aumentam na terapia de reposição do GH. O aumento na remodelação óssea é observado poucos meses após o início da reposição, antes do aumento na DMO. A expansão do espaço de remodelamento ósseo pode levar a uma redução inicial da DMO durante o primeiro ano de uso do GH, com subsequente aumento na DMO. Sugere-se que o aumento na força muscular

em resposta à reposição do GH contribua com esse efeito positiva sobre a DMO (BAUM *et al*, 1996; DE PAULA *et al*, 2009; KLEFTER & FELDT-ASMUSSEN, 2009).

13. ATEROGÊNESE E EIXO GH/IGF-1

As doenças cardiovasculares constituem outro grave problema de saúde pública associado ao processo de envelhecimento. No Brasil, as doenças do aparelho circulatório representam a principal causa de morte, sendo responsáveis por 335.213 óbitos entre os 1.170.498 óbitos ocorridos em 2011. (SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE MORTALIDADE, 2011)

Aterosclerose consiste no acúmulo de lipídios, células inflamatórias e fibrose tecidual na camada íntima, o que causa aumento da espessura intimal das artérias de grande e médio calibre. Seus principais fatores de risco são: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, níveis elevados de LDL, baixos níveis de HDL, hiperhomocisteinemia, resistência à insulina, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, estados pró-coagulantes, mediadores inflamatórios e imunológicos e marcadores genéticos (ROSS, 1999).

A aterogênese é um processo multifatorial, comumente associado aos fatores de risco cardiovascular. O papel do eixo GH-IGF-1 permanece controverso. Estudos demonstraram que níveis baixos de IGF-I estão associados a um aumento do risco cardiovascular e doença cardíaca isquêmica na população geral (JUUL *et al*, 2002). LAUGHLIN e cols. observaram que níveis baixos circulantes de IGF-I e IGFBP-I estão associados a risco aumentado de mortalidade por doença cardíaca isquêmica em idosos, independentemente da prevalência de doença isquêmica cardíaca e fatores de risco de doenças cardiovasculares (LAUGHLIN *et al*, 2004).

Adultos com DGH apresentam mortalidade cardiovascular e cerebrovascular elevada. Tem sido proposto que esse aumento esteja associado à influência da DGH sobre fatores de risco para aterosclerose, como obesidade central, dislipidemia (aumento do colesterol total, dos triglicérides, do LDL e redução do HDL) e elevados níveis de proteína C reativa (BENGTTSSON, 1998; BÜLOW *et al*, 2000; GOLLA *et al*, 2005).

Indivíduos portadores de DIGH de Itabaianinha apresentam redução de massa magra, maior porcentagem de massa gorda, obesidade central (BARRETTO *et al*, 1999; BARRETO-FILHO *et al*, 2002), níveis elevados de LDL (OLIVEIRA *et al*, 2010), pressão arterial sistólica (GLEESON *et al*, 2002). Apesar de tais fatores de risco cardiovascular, esses

indivíduos não apresentam evidência de aterosclerose prematura (OLIVEIRA *et al*, 2006) nem de resistência insulínica (OLIVEIRA *et al*, 2012), resultando em uma longevidade normal (AGUIAR-OLIVEIRA *et al*, 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. et al. Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 2, p. 714–721, 2010.
- AL-DAMLUJI, S. Adrenergic control of the secretion of pituitary hormones. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, v.7, n. 2, p. 355-392, 1993.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006.
- ARVAT, E. et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interections with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 3, p. 1169-1174, 2001.
- BARONCELLI, G. I. et al. Acquisition of bone mass in normal individuals and in patients with growth hormone deficiency. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 16, n. 2, p. 327-335, 2003.
- BARRETO-FILHO, J. A. et al. Familial isolated growth hormone deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 5, p. 2018-2023, 2002.
- BARRETTO, E. S. A. et al. Serum leptin and body composition in children with familial GH deficiency (GHD) due to a mutation in the growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 51, n. 5, p. 559-564, 1999.
- BAUM, H. B. et al. Effects of physiologic growth hormone therapy on bone density and body composition inpatients with adult-onset growth hormone deficiency: a randomized, placebo-controlled trial. **Ann Intern Med**, v. 125, n. 11, p. 883-890, 1996.

BAUMANN, G.; MAHESHWARI, H. The dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. **Acta Paediatr Suppl**, v. 423, p. 33-38, 1997.

BENGTSSON, B. A. Untreated growth hormone deficiency explains premature mortality in patients with hypopituitarism. **Growth Horm IGF Res**, v. 8, p. 77–80, 1998.

BOGUSZEWSKI, C. L. Genética molecular do eixo GH-IGF-I. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 1, p. 5-14, 2001.

BROWN, J.; JONES, E. Y.; FORBES, B. E. Keeping IGF-II under control: lessons from the IGF-II-IGF2R Crystal structure. **Trends Biochem Sci**, v. 34, n. 12, p. 612-619, 2009.

BROWN, S. A.; ROSEN, C. J. Osteoporosis. **Med Clin North Am**, v. 87, n. 5, p. 1039-1063, 2003.

BÜLOW, B. et al. Hypopituitary females have a high incidence of cardiovascular morbidity and an increased prevalence of cardiovascular risk factors. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 2, p. 574–584, 2000.

CARTER, D. R.; BOUXSEIN, M. L.; MARCUS, R. New approaches for interpreting projected bone densitometry data. **J Bone Miner Res**, v. 7, n. 2, p. 137-145, 1992.

CLAYTON, P. E.; GILL, M. S. Normal growth and its endocrine control. In: BROOK, C. G. D.; HINDMARSH, P. C. **Clinical Pediatric Endocrinology**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001. p 95-114.

COMARCK, D. H. Tecido Conjuntivo Denso, Cartilagem, Ossos e Articulações. In: _____. **Fundamentos de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 129-155.

DAVIDSON, M. B. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. **Endocr Rev**, v. 8, n. 2, p. 115-131, 1987.

DE PAULA, F. J. et al. Consequences of lifetime isolated growth hormone (GH) deficiency and effects of short-term GH treatment on bone in adults with a mutation in the GHRH-receptor gene. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 70, n. 1, p. 35-40, 2009.

DI LUIGI, L. et al. Acute effect of physical exercise on serum insulin-like growth factor-binding protein 2 and 3 in healthy men: role of exercise-linked growth hormone secretion. **Int J Sports Med**, v. 22, n. 2, p. 103-110, 2001.

EL MAGHRAOUI, A. et al. Vertebral fracture assessment in Moroccan women: prevalence and risk factors. **Maturitas**, v. 62, n. 2, p. 171-175, 2009.

ENSRUD, K. E. et al. Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. Fracture Intervention Trial Research Group. **J Am Geriatr Soc**, v. 48, n. 3, p. 241-249, 2000.

EPITÁCIO-PEREIRA, C. C. et al. Isolated GH deficiency due to a GHRH receptor mutation causes hip joint problems and genu valgum, and reduces size, but not density of trabecular and mixed bone. **J Clin Endocrinol Metab**, 2013. "In press".

GENANT, H. K. et al. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. **J Bone Miner Res**, v. 8, n. 9, p. 1137-1148, 1993.

GILLBERG, P. et al. Bone mineral density in femoral neck is positively correlated to circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein (IGFBP)-3 in Swedish men. **Calcif Tissue Int**, v. 70, n. 1, p. 22-29, 2002.

GIUSTINA, A.; VELDHUIS, J. D. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. **Endocr Rev**, v. 19, n. 6, p. 717-797, 1998.

GLEESON, H. K. et al. Lipid profiles in untreated severe congenital isolated growth hormone deficiency through the lifespan. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 57, n. 1, p. 89-95, 2002.

GOLA, M. et al. Clinical review: growth hormone and cardiovascular risk factors. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 3, p. 1864–1870, 2005.

GREENSPAN, F. S.; STREWLWER, G. J. **Basic e Clinical Endocrinology**. Stanford: Appleton & Longe, 1997.

GROWTH HORMONE RESEARCH SOCIETY. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency: summary statement of the Growth Hormone Research Society Workshop on Adult Growth Hormone Deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 2, p. 379-381, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J. H. Os hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 791-801.

HARRIS, W. H.; HEANEY, R.P. Effect of growth hormone on skeletal mass in adult dogs. **Nature**, v. 223, p. 403-404, 1969.

HASSERIUS, R. et al. Prevalent vertebral deformities predict increased mortality and increased fracture rate in both men and women: a 10-year population-based study of 598 individuals from the Swedish cohort in the European Vertebral Osteoporosis Study. **Osteoporos Int**, v. 14, n. 1, p. 61-68, 2003.

HAYASHIDA, C. Y. et al. Familial growth hormone deficiency with mutated GHRH receptor gene: clinical and hormonal findings in homozygous and heterozygous individuals from Itabaianinha. **Eur J Endocrinol**, v. 142, n. 6, p. 557-563, 2000.

HOLICK, M. F.; KRANE, S. M. Distúrbios do metabolismo ósseo e mineral. In: BRAUNWALD, E. et al. **Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2002. p. 2329-2387.

HOLMES, S. J. et al. Reduced bone mineral density in patients with adult onset growth hormone deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 78, n. 3, p. 669-674, 1994.

JIANG, G. et al. Comparison of methods for the visual identification of prevalent vertebral fracture in osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 15, n. 11, p. 887-96, 2004.

JOHANSSON, J. O. et al. Growth hormone-deficient adults are insulin-resistant. **Metabolism**, v. 44, n. 9, p. 1126-1129, 1995.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr Rev**, v.16, n. 1, p. 3-34, 1995.

JUUL, A. et al. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case control study. **Circulation**, v. 106, n. 2, p. 939-944, 2002.

KLEFTER, O.; FELDT-ASMUSSEN, U. Is increase in bone mineral content caused by increase in skeletal muscle mass/strength in adult patients with growth hormone (GH) treated GH deficiency? A systematic literature analysis. **Eur J Endocrinol**, v. 161, n. 2, p. 213-221, 2009.

KURLAND, E. S. et al. Insulin-like growth factor-I in men with idiopathic osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 9, p. 2799-2805, 1997.

LAUGHLIN, G. A. et al. The prospective associations of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 1, p. 114-120, 2004.

LEWIECKI, E. M.; LASTER, A. J. Clinical applications of vertebral fracture assessment by dual-energy x-ray absorptiometry. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 11, p. 4215-4222, 2006.

LIMA, J. G. et al. Manuseio da Osteoporose – Uma Visão Geral. In: VILAR, L. et al. **Endocrinologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p. 905-929.

MARTINELLI JUNIOR, C. E.; AGUIAR-OLIVEIRA M. H. Crescimento normal: avaliação e regulação endócrina. In: ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 366-389.

MARTINELLI JUNIOR, C. E.; CUSTÓDIO, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do eixo GH-sistema IGF. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.52, n. 5, p 717-725, 2008.

MARTINELLI JUNIOR, C. E. et al. Diagnóstico da Deficiência de Hormônio de Crescimento, a rigor de IGF-1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 1, p. 27-33, 2002.

MELMED, S.; KLEINBERG, D. Anterior pituitary. In: LARSEN, P. R. et al. **Williams Textbook of Endocrinology**. Filadélfia: W. B. Saunders, 2002, p. 177-280.

MENEZES, C. A. et al. Diagnóstico clínico e laboratorial da deficiência isolada do hormônio do crescimento em crianças e adolescentes portadores da mutação no gene do receptor do hormônio liberador do hormônio de crescimento em Itabaianinha, Sergipe. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 6, p. 371-378, 2004.

MOCHIZUKI, H. et al. Insulin like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1075-1080, 1992.

MOLINA, P. E. Glândulas paratireoides e regulação do Ca^{2+} e do PO_4 . In: **Fisiologia Endócrina**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2007, p. 95-119.

MURRAY, R. D. et al. Low bone mass is an infrequent feature of the adult growth hormone deficiency syndrome in middle-age adults and the elderly. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 3, p. 1124-1130, 2004.

OHLSSON, C. et al. Growth hormone and bone. **Endocr Rev**, v. 19, n. 1, p. 55-79, 1998.

OLIVEIRA, C. R. et al. Adipokine profile and urinary albumin excretion in isolated growth hormone deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 2, p. 693-698, 2010.

OLIVEIRA, C. R. et al. Insulin sensitivity and β -cell function in adults with lifetime, untreated isolated growth hormone deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 3, p. 1013-1019, 2012.

OLIVEIRA, J. L. M. et al. Lack of evidence of premature atherosclerosis in untreated severe isolated growth hormone deficiency due to a GHRH receptor mutation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 6, p. 2093-2099, 2006.

PADOVA, G. et al. Prevalence of osteoporosis and vertebral fractures in acromegalic patients. **Clin Cases in Miner Bone Metab**, v. 8, n. 3, p. 37-43, 2011.

PATEL, M. B. R. et al. Investigating the role of growth hormone-insulin-like growth factor (GH-IGF) axis a determinant of male bone mineral density (BMD). **Bone**, v. 37, n. 6, p. 833-841, 2002.

PHILLIPS, J. A. et al. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 10, p. 6372-6375, 1981.

RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. Pathogenesis of osteoporosis. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 32, n. 1, p. 15-24, 2003.

RAJZBAUM, G. et al. French women, fractures and aortic calcifications. **J Intern Med**, v. 257, n. 1, p. 117-119, 2005.

ROSÉN, T. et al. Cardiovascular risk factors in adult patients with growth hormone deficiency. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 129, n. 3, p. 195-200, 1993.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n.2, p. 115-126, 1999.

SALVATORI, R. et al. Detection of a recurring mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 57, n. 1, p. 77-80, 2002.

SALVATORI, R. et al. Three New Mutations in the Gene for the Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone Receptor in Familial Isolated GH Deficiency Type IB. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 1, p. 273-9, 2001.

SALVATORI, R. et al. Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 3, p. 917-923, 1999.

SHALET, S. M. et al. The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults. **Endocr Rev**, v. 19, n. 2, p. 203-223, 1998.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE MORTALIDADE. **Mortalidade-Brasil**. Datasus; Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 08 out. 2013.

SOUZA, A. H. O. **Estudo das crianças de Carretéis – deficiência familiar isolada do hormônio do crescimento**. 1997. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 1997.

SOUZA, A. H. O. et al. Hormônio do crescimento ou somatotrófico: novas perspectivas na deficiência isolada de GH a partir da descrição da mutação no gene do receptor do GHRH nos indivíduos da cidade de Itabaianinha, Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 406-413, 2004.

SUGIMOTO, T. et al. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein (IGFBP)-2, and IGFBP-3, in osteoporotic patients with and without spinal fractures. **J Bone Miner Res**, v. 12, n. 8, p. 1272-1279, 1997.

SZULC, P.; KIEL, D. P.; DELMAS, P. D. Calcifications in the abdominal aorta predict fractures in men: MINOS study. **J Bone Miner Res**, v. 23, n. 1, p. 95-102, 2008.

THORNER, M. O. et al. The anterior pituitary gland. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. **Textbook of Endocrinology**. Filadélfia: W. B. Saunders, 2002. p. 221-310.

TRITOS, N. A.; BILLER, B. M. K. Growth hormone and bone. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 16, n. 6, p. 425-422, 2009.

UELAND, T. et al. Increased serum and bone matrix levels of transforming growth factor β 1 in patients with GH deficiency in response to GH treatment. **Eur J Endocrinol**, v. 165, n. 3, p. 393-400, 2011.

VAISSMANM, M. et al. Deficiência do hormônio do crescimento (GH) em adultos – Como diagnosticar e tratar? In: VILAR, L. et al. **Endocrinologia Clínica**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p. 91-101.

VANESS, D. J.; TOSTESON, A. N. A. Estimating the opportunity costs of osteoporosis in the United States. **Topics Geriatric Rehab**, v. 21, n. 1, p. 4-16, 2005.

II. NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Author Guidelines for the **Endocrine**

1. MANUSCRIPT CATEGORIES

1.1 Original article

This contribution should contain original controlled experimental data of basic and clinical research. No firm word, table and figure and reference limit is given although the authors are invited not to exceed 3000 words and 150 references.

The more concise the articles will be the more publication space will be allowed for meritorious publications.

1.2 Review

This contribution is usually solicited by the Editors. If unsolicited, the authors are advised to contact the Editor-in-Chief (endocrine_eic@libero.it) with an outline of the proposed review and CV of the authors. This type of article does not have a strict limit in word and reference number although the editorial recommendation is that the article does not exceed 4000 words and 350 references.

1.3 Mini-Review

This contribution is also usually solicited by the Editors. If unsolicited, the authors are advised to contact the Editor-in-Chief (endocrine_eic@libero.it) with an outline of the proposed review and CV of the authors. This type of article has a word limit of 2000 and no more than 100 references.

1.4 New Horizons in

This contribution should be based on the outcomes of a scientific meeting and will be devoted to underline open issues as well as future basic and clinical research perspectives in

an endocrine field. This type of article has a word limit of 2000 and no more than 50 references.

Interested authors should contact directly the Editor-in-Chief (endocrine_eic@libero.it) submitting the meeting scientific program and an outline of their work.

1.5 Meta-analysis

This contribution should be based on a rigorous methodological/statistical approach described in detail in the methods section applied to a relevant clinical or basic issue.

This work could also be submitted to statistical revision. Word limit is 2000 with no more than 50 references.

1.6 Viewpoint

This contribution should be solicited by the Editors and deal with a controversial topic in either basic or clinical endocrinology on which the author, a leading expert in the field, is invited to express his views and interpretation of current literature.

This type of article has a word limit of 1000, 1 figure or table and no more than 30 references.

1.7 Editorial

This contribution should be solicited by the Editors and relates to the topic of one or more contributions published in the same issue of the journal.

This type of article has a word limit of 1000 and no more than 10 references.

1.8 Research Letter

This contribution contains particularly original preliminary basic or clinical data presented in a very concise way (no abstract, word limit of 1000, 1 table of figure and maximum 10 references).

1.9 Fellows corner

This contribution should be a short report (word limit of 1500, 1 table and/or 1 figure, maximum 25 references) containing a set of original research data or a critical revision of current literature on a basic or clinical topic discussed by an endocrine fellow with his/her mentor.

1.10 Book review

This contribution should be a short evaluation from an expert in the field on a relevant book in a certain area of endocrinology. This article should not exceed 750 words and no references are allowed.

1.11 Letter to the Editor

Text is limited to 750 words, with no abstract. There may be 1 figure, up to 3 references, and no more than 3 authors, with author affiliations only including main institution, place name and (state plus) country (i.e. no departments, etc).

1.12 Endocrine Imaging

Text is limited to 500 words, with no abstract, and illustrative of 1 Figure in which a particularly significant and original result of an imaging technique (e.g. MRI, CT, ultrasound) obtained during the diagnostic process of an endocrine disease should be included. No more than 3 references and 3 authors (with author affiliations only including main institution, place name and (state plus) country) are allowed.

1.13 Pros and Cons in Endocrine Practice

This contribution should deal with a controversial topic in endocrine practice in which pros and cons of an endocrine disease treatment or diagnostic process are examined and reported in a balanced and constructive way. A proposed algorithm or indication for an integrated approach should be produced. This type of article has a word limit of 2000, 1 figure

and 1 table, no more than 50 references and can be written by a single author reviewing the two sides of the topic or by two authors each dealing with one aspect of the topic.

1.14 Endocrine Methods and Techniques

This contribution contains the description of a previously unreported research method or modification of an already known method particularly relevant to the endocrine field. New laboratory assays for hormone measurement as well as new diagnostic techniques or new applications of a diagnostic technique are also eligible for this manuscript category. Data should be presented in a concise way (word limit of 1500, 1 table or figure and maximum 25 references).

1.15. Endocrine Trials

This contribution is devoted to registered clinical trials in which treatments for an endocrine or metabolic disease are studied. Manuscripts can deal with the detailed description of the protocol of a trial, can report data from interim analysis of an ongoing clinical trial, can report preliminary or final results of the trial as well as post-hoc analysis of the trial. No word, table and figure and reference limit is given although the authors are invited not to exceed 2500 words and 75 references.

1.16 Side Effects of Endocrine Treatments

Text is limited to 500 words, with no abstract and only one Figure if strictly necessary, with the description of a potential side effect not previously reported which occurred during the treatment with an endocrine drug or of an endocrine disease. No more than 3 references and 3 authors (with author affiliations only including main institution, place name and (state plus) country) are allowed.

2. MANUSCRIPT SUBMISSION

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or

explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

2.1 Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

2.2 Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

3. TITLE PAGE

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

4. ABSTRACT

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)

- Methods
- Results
- Conclusions
- Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

5. TEXT

5.1 Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

5.2 Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

5.3 Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

5.4 Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference

citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

5.5 Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

6. REFERENCES

6.1 Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

6.2 Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Hamburger, C.: Quasimonotonicity, regularity and duality for nonlinear systems of partial differential equations. *Ann. Mat. Pura Appl.* 169, 321–354 (1995)

- Article by DOI
Sajti, C.L., Georgio, S., Khodorkovsky, V., Marine, W.: New nanohybrid materials for biophotonics. *Appl. Phys. A* (2007). doi:10.1007/s00339-007-4137-z
- Book
Geddes, K.O., Czapor, S.R., Labahn, G.: *Algorithms for Computer Algebra*. Kluwer, Boston (1992)
- Book chapter
Broy, M.: Software engineering — from auxiliary to key technologies. In: Broy, M., Denert, E. (eds.) *Software Pioneers*, pp. 10–13. Springer, Heidelberg (2002)
- Online document
Cartwright, J.: Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1> (2007). Accessed 26 June 2007

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see: www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

7. TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

8. ARTWORK AND ILLUSTRATION GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

8.1 Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

8.2 Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

8.3 Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

8.4 Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

8.5 Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

8.6 Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1,

A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

8.7 Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

8.8 Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

8.9 Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format.

Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions.

In such cases, material from other sources should be used.

8.10 Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

9. ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIALS

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter.

This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

9.1 Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

9.2 Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

9.3 Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

9.4 Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

9.5 Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

9.6 Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

9.7 Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

9.8 Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

9.9 Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

10. SCIENTIFIC STYLE

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

11. INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

11.1 Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

11.2 Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

12. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

12.1 Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

12.2 Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

12.3 Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

12.4 Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

12.5 Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

12.6 Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

III. ARTIGO CIENTÍFICO

Maria I.T Farias¹, Anita H. O. Souza¹, Roberto Salvatori², Gabriella M. F. Silva¹, João A. M. Santana¹, Francisco A. Pereira¹, Francisco J. A. de Paula³, Eugenia H. O. Valença¹, Enaldo V Melo¹, Rita A. A. Barbosa¹, Rossana M C Pereira¹, Miburge B. Gois-Junior¹ and Manuel H. Aguiar-Oliveira¹.

Lifetime, untreated isolated GH deficiency due to a GH releasing hormone receptor mutation has beneficial consequences on bone status in older individuals, and does not influence their abdominal aorta calcification

¹Division of Endocrinology, Department of Medicine, School of Medicine, Federal University of Sergipe, Aracaju, Brazil

²Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Department of Internal Medicine, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

³Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Corresponding author:

Roberto Salvatori, MD,

Division of Endocrinology,

Johns Hopkins University School of Medicine,

1830 East Monument street suite #333,

Baltimore, MD 21287

Fax (410) 955-3921 Tel (410) 955-3921

e-mail: salvator@jhmi.edu

Abstract

Purpose: The GH/IGF-I axis has essential roles in regulating bone and vascular status. The age-related decrease in GH secretion (“somatopause”) may contribute to osteoporosis and atherosclerosis, commonly observed in the elderly. Adult-onset GH deficiency (GHD) has been reported to be associated with reduced bone mineral density (BMD), increased risk of fractures, and premature atherosclerosis. We have shown that young adult individuals with isolated GHD (IGHD) due to a homozygous for the c.57+1G>A GHRH receptor gene mutation have normal volumetric BMD (vBMD), and not develop premature atherosclerosis, despite adverse risk factor profile. However, the bone and vascular impact of lifetime GHD on the aging process remains unknown.

Methods: We studied a group of ten older IGHD subjects (≥ 60 yrs) homozygous for the mutation, comparing them with 20 age- and gender-matched controls. Areal BMD was measured, and vBMD was calculated at the lumbar spine and total hip. Vertebral fractures and abdominal aortic calcifications were also assessed.

Results: Areal BMD was lower in IGHD, but vBMD was similar in the two groups. The percent of fractured individuals was similar, but the mean number of fractures per individual was lower in IGHD than CO. Calcium score was similar in the two groups. A positive correlation was found between calcium score and number of fractures.

Conclusions: Untreated lifetime IGHD has beneficial consequences on bone status and does not have a deleterious effect on abdominal aorta calcification.

Key words: Isolated GH deficiency; aging; osteoporosis; vertebral fractures; vascular calcification.

Introduction

Osteoporotic fractures and cardiovascular disease are top ranked public health problems, intimately linked to aging. In the U.S., the direct medical costs associated with osteoporotic fractures and cardiovascular events are estimated at \$36.2 billion and \$400 billion per year, respectively [1, 2]. As life expectancy is increasing with a consequent increase in the number of elderly individuals, the financial and health-related costs of both conditions will naturally increase in the next decades. It is interesting that while bone mineralization reduces during aging, calcium contents increases in vessels, as part of atherosclerosis development [3].

Vertebral fractures (VFs) are the most common complication of osteoporosis, associated with reduced quality of life, increased morbidity and mortality, and increased risk of future vertebral and non-vertebral fractures [4,5]. Vertebral fracture assessment (VFA), using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), has great potential for clinical use in detecting both VFs and abdominal aortic calcifications (AAC), an important marker of subclinical cardiovascular (CV) disease [6].

Growth hormone (GH) and its principal mediator factor, insulin like growth factor type I (IGF-I) regulate both bone remodeling and vascular endothelial cells function. In bone, the GH/ IGF-I axis promotes the differentiation and proliferation of mature osteoblasts and regulates osteoclastic differentiation and activity, favoring bone anabolism [7-10]. GH and IGF-I are also very important for the development of smooth muscular cells necessary to the establishment of atheromas [11]. Intriguingly, the reduction in endogenous GH secretion that occurs with age (“somatopause”) has been suggested to be not only a contributing factor for the age-related decline in BMD [12] but also for the emergence of atherosclerosis [13].

Adult-onset GH deficient (AOGHD) individuals have reduced BMD, with mild increased risk of fractures [14, 15], and increased atherosclerosis [16, 17]. However, AOGHD patients frequently lack multiple pituitary hormones, whose deficits and replacements may contribute to abnormal bone and vascular structure. Furthermore, the age of onset of GHD in these patients is often unknown, as the underlying pathological process (mostly pituitary tumors) that causes GHD may remain undiagnosed for many years. Childhood onset isolated GHD (IGHD) individuals are commonly treated with GH replacement, precluding conclusions about the long-term bone and vascular consequences of lack of GH.

We have identified large kindred of IGHD patients with severe short stature due to a *null* homozygous GHRH receptor gene (*GHRHR*) mutation (c.57 + 1G>A), with approximately 100 affected individuals over seven generations, residing in Itabaianinha County, in the Brazilian Northeast [18]. These IGHD individuals present very low serum GH and IGF-I [19], and have reduction in fat free mass and an increase in fat mass

percentage with central distribution [20,21]. They also have increased systolic blood pressure [22], low-density lipoprotein-cholesterol and C-reactive protein levels [23], but normal leptin and high adiponectin [23] serum levels. Despite their risk factors, they have no evidence of insulin resistance [24] or premature coronary or carotid atherosclerosis [25], resulting in normal longevity [26]. Recently, we have reported that these IGHD individuals in adulthood have normal volumetric BMD (vBMD) despite low areal BMD [27]. However, the consequences of untreated IGHD on vBMD in older individuals of this cohort are still unknown. Here we report the bone status and AAC in ten IGHD individuals ≥ 60 years, and compare them with 20 age- and gender-matched controls from the same area.

Subjects and Methods

Subjects

In a case-control study, performed in Itabaianinha County, in the Northeastern Brazilian state of Sergipe, IGHD and control (CO) subjects were recruited by advertising placed in the local Dwarfs Association building and by word of mouth. Inclusion criteria were age ≥ 60 yr. IGHD individuals were genotyped to be homozygous for the c.57+1G>A *GHRHR* mutation, whereas controls (CO) were homozygous for the wild-type *GHRHR* allele. Exclusion criteria were: known history of chronic disease (DM, rheumatologic, hepatic, renal and osteometabolic) and use of glucocorticoids, anticonvulsants, GH, thyroid hormone and osteoporosis medications. Ten IGHD subjects (5 males, range: 60 to 88 yrs) and 20 CO (10 males, range: 60-94yrs) were enrolled.

Both the Federal University of Sergipe and the Johns Hopkins University Institutional Review Boards approved these studies, and all subjects gave written informed consent.

Anthropometric measurement

Height and body weight were measured and body mass index (BMI) was calculated by the formula: weight (kilograms)/height (meters)². As we pooled both genders in the analyses, height, weight and BMI standard deviation scores were calculated by using <http://www.phsim.man.ac.uk/SDSCalculator/SDSCalculator.aspx>.

Laboratory assessment

Insulin was measured by a solid-phase, enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay IMMULITE 2000® (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd., USA), with sensitivity of 2 μ IU/ml, and intraassay and interassay variabilities of 4.2 and 5.1%, respectively. Insulin resistance was estimated using the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA_{IR}) with the formula: fasting serum insulin (μ IU/ml) x fasting plasma glucose (mmol/l)/22.5 [28].

IGF-I was measured by a solid-phase, enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay IMMULITE 2000® (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd., USA), with sensitivity of 25ng/ml. Intraassay and interassay variabilities were 3.1 and 6.1%, respectively. Nine of ten IGHD individuals presented IGF-I levels <25 ng/mL. In these individuals we considered the value of 25ng/ml to calculate the mean and standard deviation.

Bone mineral density (BMD) measurement

Bone mineral density was assessed by DXA using the Discovery W-Hologic apparatus (Hologic Inc., Waltham, MA). BMD was measured at lumbar spine, femoral neck and total hip, and expressed in absolute values (g/cm^2). The exams were all performed by the same operator according to rigid positioning criteria standardized for each target site. Because areal BMD can be misleading when used to compare bones of different sizes, volumetric density of the lumbar spine (vBMD) and total hip (vBMDTH) were mathematically estimated. For vBMD we used L1-L4, instead of L2-L4 proposed by Carter et al [29], and based on the current recommendation by the ISCD. The following equations were used [29, 30, 31]:

Lumbar spine: $\text{vBMDL14} (\text{g}/\text{cm}^3) = \text{BMD} (\text{g}/\text{cm}^2) \text{ of the lumbar spine (L1-L4)} / \text{square root of the bone area (cm}^2\text{) of the lumbar spine (L1-L4)}$.

Total hip: $\text{vBMDTH} (\text{g}/\text{cm}^3) = \text{BMDTH} (\text{g}/\text{cm}^2) / \text{square root of the bone area (cm}^2\text{) of the total hip}$.

The coefficient of variation for the BMD measurements in normal subjects was 1% at both lumbar spine and femoral neck.

Vertebral Fracture Assessment (VFA)

For assessment of vertebral fractures, lateral images from T4 to L4 were evaluated with the patient in a lateral decubitus position. Using a translucent digitizer and a cursor, six points were marked on each vertebral body, at the anterior, middle and posterior margins of the vertebral endplates. From these points, anterior (h_a), middle (h_m), and posterior (h_p) heights and the following ratios were calculated: h_a/h_p (wedging), h_m/h_p (biconcavity) and h_p/h_p^{+1} or h_p/h_p^{-1} (crushing), where h_p^{+1} and h_p^{-1} , respectively, indicate h_p of the vertebra above or below the one under examination [32]. Vertebral fractures were classified according to the Genant semi-quantitative methodology, where grade 1 (mild) fracture is a reduction in vertebral height of 20-25%, grade 2 (moderate) a reduction of 26-40%, and grade 3 (severe) a reduction of over 40% [33].

Abdominal aortic calcification

Aortic calcification was assessed from VFA scans. The calcifications in the anterior and posterior walls of the abdominal aorta adjacent to the first four lumbar vertebrae were assessed. Analysis of cardiovascular risk was performed based on calcium score: no risk (absence of calcification) coded zero, low risk (1-2 calcifications), coded 1, moderate risk (3-4 calcifications), coded 2 and high risk (5 or more calcifications), coded 3. A mean code of this risk was calculated in both groups.

Statistical analysis

Values for continuous variables were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Comparison between the groups was performed by independent samples t test. The frequency of type and grade of fractures was analyzed by using Fisher's exact test. Spearman correlation was used for the correlation between variables. The statistical software SPSS/PC 11.5 (Statistical Packet for Social Science, Inc., Chicago, IL) was used. *P* values of 0.05 or less were considered to be statistically significant.

Results

As shown in table 1, the groups were matched for age, gender, and BMI. As expected, height and weight in absolute values or standard deviation score were lower in IGHD than CO. The age of menopause was similar in the women of both groups. IGF-I serum levels were significantly lower in IGHD compared with control subjects ($p < 0.0001$). Circulating insulin levels were also lower in IGHD ($p = 0.049$).

Table 2 summarizes areal BMD measurements and the calculated volumetric BMD (vBMD). IGHD presented significantly decreased areal BMD at the lumbar spine, femoral neck and total hip, but vBMD at L1-L4 and total hip was not different between groups.

The number of individuals with VFs was similar in IGHD (five in ten, 50%) and CO (six in 20, 30%), $p = 0.15$, but the mean number of fractures per individual was lower in IGHD (2.8, 14 fractures in five individuals) than CO (5.33, 32 fractures in six individuals, $p = 0.018$). In IGHD individuals, there were 11 biconcave, three crush and none wedge fractures. In CO group, there were 17 biconcave, six crush and nine wedge fractures. In IGHD there was no severe fracture; eight fractures were graded as mild and six as moderate. In CO, 12 fractures were graded as mild, 17 as moderate and three as severe.

The calcium score was negative in nine of ten IGHD (90%) and in 16 of 20 of CO (80%), $p = 0.373$. The remainder IGHD subject had moderate risk. One CO individual presented mild risk, another moderate, whereas two had high risk. The mean value of this risk was similar in IGHD and control (0.20 ± 0.63 and 0.45 ± 0.99).

In the pooled GHD individuals and controls, there was no correlation between vBMDL1-4 and the number of fractures but a significant negative correlation was found between vBMDTH and the number of fractures ($r = -0.421$, $p = 0.021$). A significant positive correlation was found between calcium score and the number of fractures ($r = 0.534$, $p = 0.002$).

Discussion

We have recently shown in a younger group that adults (age 38.16 ± 12.17) with congenital untreated IGHD (despite low areal BMD) have normal calculated vBMD [27]. Here we studied older individuals from the same kindred. There was no previous literature on vBMD in old individuals with congenital IGHD due to inactivating *GHRHR* mutation, as the only previous study included 4 young individuals [27, 31]. Similarly, studies in GH resistant individuals (i.e., Laron syndrome) included only subjects younger than the ones we have studied [34, 35]. The present study shows that the observation of normal vBMD is extended to older subjects, and it is reflected in a similar incidence of morphometry VFs in comparison to controls. In fact, the number of VFs per individual was actually lower in IGHD than in controls. It is also noteworthy that elderly IGHD individuals present also normal z-scores of areal BMD in the total hip. Therefore, in this kindred GHD seems not to exert the same deleterious effect on BMD as in normal individuals who become GHD as adults [36-38]. Accordingly, despite the fact that the Itabaianinha individuals older than 60 years are physically very active in a rural environment, there has been no report of hip fractures even in individuals older than 90 yrs.

The observation that the mean number of fractures per individual was lower in IGHD than CO suggests that IGHD individuals are less prone to re-fracture. This could be explained by the “mechanostat theory”, which proposes that bones adapt their strength to keep the strain caused by physiological loads close to a set point. Because the largest physiological loads are caused by muscle contractions, there should be a close relationship between bone strength and muscle force or size [39]. IGHD individuals may be well adapted to their body size, and to the reduced muscle mass, being less prone to fractures. It would appear therefore that—at least in terms of VFs—it is better have very low GH and IGF-I throughout life than to have normal levels during adulthood and reducing them with aging through somatopause.

Genetically modified animal models allow the acquisition of novel information about IGF-I and GH actions on the skeleton. Most likely the major function of IGF-I within bone is to increase the osteoblast activity, thereby stimulating bone formation. However, IGF-I can also stimulate RANK-L synthesis, enhancing osteoclastogenesis, as suggested by the observation that IGF-I knockout mice exhibit decreased number of osteoclast [40]. The murine equivalent of the kindred we have studied (mice with mutated *GHRHR* gene) have reduced cortical bone, but normal trabecular bone volume [41]. Unfortunately, one limitation of the present is that DXA technique is that it does not permit the individual evaluation of cortical and trabecular bone to determine if this is the case in human subjects as well.

Only about one third of radiographically identified VFs are clinically diagnosed [42]. Whether clinically recognized or not, VFs are associated with an increase in back pain and disability, and lower quality of life [43], neither of them present in our IGHD individuals [44]. The prevalence of VFs in CO group was similar to the one reported in normal Brazilian women of mean age of 65.7 ± 6.3 years (34.1 %) [43], re-enforcing our finding of a favorable bone phenotype in congenital lifetime IGHD. Accordingly, working with this community for longer than two decades and knowing every IGHD patient personally, we did not observe any hip fracture. Furthermore, going back as far as 1892, there is no death certificate reporting hip fracture as cause of death in any of the IGHD subjects [26].

Physiological processes related to growth may involve significant “costs” in relation to aging and longevity, predisposing to age associated disease as diabetes and cancer [45]. Our data suggest that having a normal GH- IGF I axis and an adult normal size can also involve significant “cost”, in terms of VFs in elderly individuals [26].

Radiographic evidence of AAC has been shown to be a strong predictor of incident coronary heart disease, stroke, heart failure, and intermittent claudication, independent of traditional clinical cardiovascular risk factors [6]. In our study, calcium score was similar in IGHD individuals and control subjects. This confirms that, despite several cardiovascular risks factor [21], these subjects do not develop early atherosclerosis in the abdominal aorta, confirming previous findings of coronary and carotid arteries [25].

Our finding of a significant positive correlation between calcium score and the number of fractures is supported by previous studies [46-49]. Both fractures and cardiovascular events are major causes of morbidity and mortality in elderly [50-52]. The present data re-enforce the need for further studies to analyze the relationship(s) that exist between bone loss and cardiovascular disease.

Finally, older IGHD subjects have lower insulin levels, but similar HOMA_{ir}. This fits with previous data from younger members of this kindred, showing reduced β -cell function and increased insulin sensitivity, resulting in a neutral net effect on the risk of diabetes [24, 53].

In summary, congenital, lifetime IGHD has beneficial consequences in bone status in old age, and does not have deleterious effects on abdominal aorta calcification. In this specific and arguably unique kindred, IGHD seems delay some bone features of aging.

Acknowledgements

We thank the Clinic CLIMEDI (Av. Barao de Maruim, 570, Aracaju - SE, 49000-000) for the BMD measurements.

Ethical standards

The Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe approved the protocol. Written informed consent was obtained from all subjects.

Conflict of interest

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

References

1. Vaness DJ, Tosteson ANA. Estimating the opportunity costs of osteoporosis in the United States. *Topics Geriatric Rehab.* 21, 4-16 (2005)
2. Mensah GA, Brown DW. An overview of cardiovascular disease burden in the United States. *Health Aff (Millwood).* 26, 38-48 (2007)
3. Watanabe PC, Dias FC, Issa JP, Monteiro SA, de Paula FJ, Tiossi R. Elongated styloid process and atheroma in panoramic radiography and its relationship with systemic osteoporosis and osteopenia. *Osteoporos Int.* 21, 831-836 (2010)
4. Lewiecki EM, Laster AJ. Clinical review: clinical applications of vertebral fracture assessment by dual-energy x-ray absorptiometry. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 4215-4222 (2006)
5. El Maghraoui A, Morjane F, Nouijai A, Achemlal L, Bezza A, Ghozlan I. Vertebral fracture assessment in Moroccan women: prevalence and risk factors. *Maturitas.* 62, 171-175 (2009)
6. Schousboe JT, Taylor BC, Kiel DP, Ensrud KE, Wilson KE, McCloskey EV. Abdominal aortic calcification detected on lateral spine images from a bone densitometer predicts incident myocardial infarction or stroke in older women. *J Bone Miner Res.* 23, 409-416 (2008)
7. Patel MBR, Arden NK, Masterson LM, Phillips DIW, Swaminathan R, Syddall HE, Byrne CD, Wood PJ, Cooper C, Holt RI, Hertfordshire Cohort Study Group. Investigating the role of growth hormone-insulin-like growth factor (GH-IGF) axis as a determinant of male bone mineral density (BMD). *Bone.* 37, 833-841 (2005)
8. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, Tanaka K, Kumegawa M. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology.* 131, 1075-1080 (1992)
9. Gillberg P, Olofsson H, Mallmin H, Blum WF, Ljunghall S, Nilsson AG. Bone mineral density in femoral neck is positively correlated to circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein (IGFBP)-3 in Swedish men. *Calcif Tissue Int.* 70, 22-29 (2002)
10. Ohlsson C, Bengtsson B-A, Isaksson OGP, Andreassen TT, Slootweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev.* 19, 55-79 (1998)
11. Delafontaine P, Song, YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 435-444 (2004)

12. Rudman D. Growth hormone, body composition, and aging. *J Am Geriatr Soc.* 33, 800-807 (1985)
13. Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, Shai SY, Delafontaine P. Aging, atherosclerosis and IGF-I. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67, 626-639 (2012)
14. Baroncelli GI, Bertelloni S, Sodini F, Saggese G. Acquisition of bone mass in normal individuals and in patients with growth hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 16, 327-335 (2003)
15. Wüster C, Abs R, Bengtsson BA, Bennmarker H, Feldt-Rasmussen U, Hernberg-Ståhl E, Monson JP, Westberg B, Wilton P. The influence of growth hormone deficiency, growth hormone replacement therapy, and other aspects of hypopituitarism on fracture rate and bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 16, 398-405 (2001)
16. Rosén T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet.* 336, 285-288 (1990)
17. Gola M, Bonadonna S, Doga M, Giustina A. Clinical Review: growth hormone and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 1864-1870 (2005).
18. Salvatori R, Hayashida CY, Aguiar-Oliveira MH, Phillips JA 3rd, Souza AH, Gondo RG, Toledo SP, Conceição MM, Prince M, Maheshwari HG, Baumann G, Levine MA. Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 917-923 (1999)
19. Aguiar-Oliveira MH, Gill MS, de A Barretto ES, Alcântara MR, Miraki-Moud F, Menezes CA, Souza AH, Martinelli CE, Pereira FA, Salvatori R, Levine MA, Shalet SM, Camacho-Hubner C, Clayton PE. Effect of severe growth hormone (GH) deficiency due to a mutation in the GH-releasing hormone receptor on insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and ternary complex formation throughout life. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 4118-4126 (1999)
20. de A Barretto ES, Gill MS, De Freitas ME, Magalhães MM, Souza AH, Aguiar-Oliveira MH, Clayton PE. Serum leptin and body composition in children with familial GH deficiency (GHD) due to a mutation in growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. *Clin Endocrinol (Oxf).* 51, 559-564 (1999)
21. Barreto-Filho JA, Alcântara MR, Salvatori R, Barreto MA, Sousa AC, Bastos V, Souza AH, Pereira RM, Clayton PE, Gill MS, Aguiar-Oliveira MH. Familial isolated growth hormone deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 2018-2023 (2002)

22. Gleeson HK, Souza AH, Gill MS, Wieringa GE, Barretto ES, Barretto-Filho JA, Shalet SM, Aguiar-Oliveira MH, Clayton PE. Lipid profiles in untreated severe congenital isolated growth hormone deficiency through the lifespan. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 57, 89-95 (2002)
23. Oliveira CR, Salvatori R, Meneguz-Moreno RA, Aguiar-Oliveira MH, Pereira RM, Valença EH, Araújo VP, Farias NT, Silveira DC, Vieira JG, Barreto-Filho JA. Adipokine profile and urinary albumin excretion in isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 95, 693-698 (2010)
24. Oliveira CR, Salvatori R, Barreto-Filho JA, Rocha IE, Mari A, Pereira RM, Campos VC, Menezes M, Gomes E, Meneguz-Moreno RA, Araújo VP, Leite NT, Nascimento-Junior AC, Farias MI, Viscente TA, Araújo RD, Melo EV, Aguiar-Oliveira MH. Insulin sensitivity and β -cell function in adults with lifetime, untreated isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 97, 1013-1019 (2012)
25. Menezes Oliveira JL, Marques-Santos C, Barreto-Filho JA, Ximenes Filho R, de Oliveira Britto AV, Oliveira Souza AH, Prado CM, Pereira Oliveira CR, Pereira RM, Ribeiro Vicente Tde A, Farias CT, Aguiar-Oliveira MH, Salvatori R. Lack of evidence of premature atherosclerosis in untreated severe isolated growth hormone deficiency due to a GHRH receptor mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 91, 2093-2099 (2006)
26. Aguiar-Oliveira MH, Oliveira FT, Pereira RM, Oliveira CR, Blackford A, Valença EH, Santos EG, Gois-Junior MB, Meneguz-Moreno RA, Araujo VP, Oliveira-Neto LA, Almeida RP, Santos MA, Farias NT, Silveira DC, Cabral GW, Calazans FR, Seabra JD, Lopes TF, Rodrigues EO, Porto LA, Oliveira IP, Melo EV, Martari M, Salvatori R. Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 95, 714–721 (2010)
27. Epitácio-Pereira CC, Silva GM, Salvatori R, Santana JA, Pereira FA, Gois-Junior MB, Britto AV, Oliveira CR, Souza AH, Santos EG, Campos VC, Pereira RM, Valença EH, Barbosa RA, Farias MI, de Paula FJ, Ribeiro TV, Oliveira MC, Aguiar-Oliveira MH. Isolated GH deficiency due to a GHRH receptor mutation causes hip joint problems and genu valgum, and reduces size, but not density of trabecular and mixed bone. *J Clin Endocrinol Metab*. Epub 2013 Sept 20.
28. Lansang MC, Williams GH, Carroll JS. Correlation between the glucose clamp technique and the homeostasis model assessment in hypertension. *Am J Hypertens*. 14, 51-53 (2001)
29. Carter DR, Bouxsein ML, Marcus R. New approaches for interpreting projected bone densitometry data. *J Bone Miner Res*. 7, 137-245 (1992)

30. Katzman DK, Bachrach LK, Carter DR, Marcus R. Clinical and anthropometric correlates of bone mineral acquisition in healthy adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 73, 1332-1339 (1991)
31. Maheshwari HG, Bouillon R, Nijs J, Oganov VS, Bakulin AV, Baumann G. The impact of congenital, severe, untreated growth hormone (GH) deficiency on bone size and density in young adults: insights from genetic GH-releasing hormone receptor deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 2614-2618 (2003)
32. Diacinti D, Guglielmi G, Pisani D, Diacinti D, Argirò R, Serafini C, Romagnoli E, Minisola S, Catalano C, David V. Vertebral morphometry by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) for osteoporotic vertebral fractures assessment (VFA). *Radiol Med.* 117, 1374-1385 (2012)
33. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res.* 8, 1137-1148 (1993)
34. Bachrach LK, Marcus R, Ott SM, Rosenbloom AL, Vasconez O, Martinez V, Martinez AL, Rosenfeld RG, Guevara-Aguirre J. Bone mineral, histomorphometry, and body composition in adults with growth hormone receptor deficiency. *J Bone Miner Res.* 13, 415-421 (1998)
35. Benbassat CA, Eshed V, Kamjin M, Laron Z. Are adult patients with Laron syndrome osteopenic? A comparison between dual-energy X-ray absorptiometry and volumetric bone densities. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 4586-4589 (2003)
36. Iranmanesh A, Lizarralde G, Veldhuis JD. Age and relative obesity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73(5):1081-8.
37. Wémeau JL. Calciotropic hormones and ageing. *Horm Res.* 43, 76 –79 (1995)
38. Perrini S, Laviola L, Carreira Mc, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF-I axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol.* 205, 201-210 (2010)
39. Schoenau E. From mechanostat theory to development of the "Functional Muscle-Bone-Unit". *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 5, 232-238 (2007)
40. Sims NA, Clément-Lacroix P, Da Ponte F, Bouali Y, Binart N, Moriggl R, Goffin V, Coschigano K, Gaillard-Kelly M, Kopchick J, Baron R, Kelly PA. Bone homeostasis in growth hormone receptor null mice is restored by IGF-I but independent of Stat5. *J Clin Invest.* 106, 1095–1103 (2000)
41. Beamer WH, Eicher EM. Stimulation of growth in the little mouse. *J Endocrinol.* 71, 37–45 (1976).

42. Fink HA, Milavetz DL, Palermo L, Nevitt MC, Cauley JA, Genant HK, Black DM, Ensrud KE. What proportional of incident radiographic vertebral deformities is clinically diagnosed and vice versa?. *J Bone Miner Res.* 20, 1216-1222 (2005)
43. de Oliveira Ferreira N, da Silva RB, Arthuso M, Pinto-Neto AM, Caserta N, Costa-Paiva L. Prevalence of vertebral fractures and quality of life in a sample of postmenopausal Brazilian women with osteoporosis. *Arch Osteoporos.* 7, 101-106 (2012)
44. Barbosa JA, Salvatori R, Oliveira CR, Pereira RM, Farias CT, Britto AV, Farias NT, Blackford A, Aguiar-Oliveira MH. Quality of life in congenital, untreated, lifetime isolated growth hormone deficiency. *Psychoneuroendocrinology.* 34, 894-900 (2009)
45. Anisimov VN, Bartke A. The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev in Oncol Hemat.* 87, 201–223 (2013)
46. Szulc P, Samelson EJ, Sornay-Rendu E, Chapurlat R, Kiel DP. Severity of aortic calcification is positively associated with vertebral fracture in older men—a densitometry study in the STRAMBO cohort. *Osteoporos Int.* 24, 1177-1848 (2013)
47. Rajzbaum G, Roger VL, Bézie Y, Chauffert M, Bréville P, Roux F, Safar ME, Blacher J. French women, fractures and aortic calcifications. *J Intern Med.* 257, 117–119 (2005)
48. Szulc P, Kiel DP, Delmas PD. Calcifications in the abdominal aorta predict fractures in men: MINOS study. *J Bone Miner Res.* 23, 95–102 (2008)
49. Iwamoto J, Matsumoto H, Takeda T, Sato Y, Uzawa M. A radiographic study on the associations of age and prevalence of vertebral fractures with abdominal aortic calcification in Japanese postmenopausal women and men. *J Osteoporos.* (2010). doi:10.4061/2010/748380
50. Tajeu GS, Delzell E, Smith W, Arora T, Curtis JR, Saag KG, Morrissey MA, Yun H, Kilgore ML. Death, Debility, and Destitution Following Hip Fracture. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* Epub 2013 Jul 19.
51. Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJ 3rd. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone and Miner Res.* 12, 24–35 (1997)
52. Morales-Torres J, Gutiérrez-Ureña S. The burden of osteoporosis in Latin America. *Osteoporos Int.* 15, 625–632 (2004)

53. Vicente TA, Rocha IE, Salvatori R, Oliveira CR, Pereira RM, Souza AH, Campos VC, Santos EG, Diniz RD, Valença EH, Epitácio-Pereira CC, Oliveira MC, Mari A, Aguiar-Oliveira MH. Lifetime congenital isolated GH deficiency does not protect from the development of diabetes. *Endocr Connect.* 2:112-7 (2013)

TABLE 1: Clinical and biochemical characteristics of the individuals in the control group (CO) and in the group with isolated growth hormone deficiency (IGHD). Values are means $\pm$ standard deviation (SD)

	IGHD (n=10)	CO (n=20)	P
Sex (M)	5	10	1
Age	71.0 $\pm$ 10.18	69.75 $\pm$ 10.47	0.758
Age of menopause	49.75 $\pm$ 3.68	47.33 $\pm$ 5.19	0.423
Height (m)	1.20 $\pm$ 0.05	1.55 $\pm$ 0.08	<0.0001
Height SDS	-7.99 $\pm$ 0.55	-2.45 $\pm$ 1.07	<0.0001
Weight (kg)	40.68 $\pm$ 8.92	65.52 $\pm$ 10.71	<0.0001
Weight SDS	-4.88 $\pm$ 3.72	-0.13 $\pm$ 1.53	0.003
BMI (kg/m²)	28.90 $\pm$ 8.80	27.22 $\pm$ 4.02	0.477
BMI SDS	1.11 $\pm$ 2.14	1.17 $\pm$ 1.04	0.918
IGF-I (ng/mL)	26.96 $\pm$ 6.20	108.57 $\pm$ 61.42	<0.0001
Glucose (mg/dL)	109.00 $\pm$ 28.02	90.85 $\pm$ 18.23	0.086
Insulin (uUI/mL)	2.56 $\pm$ 1.77	3.96 $\pm$ 2.54	0.049
HOMA_{IR}	0.73 $\pm$ 0.69	0.89 $\pm$ 0.61	0.475

TABLE 2: Areal bone mineral density (BMD) measurements and calculated volumetric BMD (vBMD) in IGHD individuals and controls. Values are means $\pm$ standard deviation (SD)

	DIGH	CO	P
BMDL1 (g/cm²)	0.764 $\pm$ 0.07	0.943 $\pm$ 0.18	0.001
BMDL2 (g/cm²)	0.740 $\pm$ 0.08	1.000 $\pm$ 0.21	< 0.0001
BMDL3 (g/cm²)	0.760 $\pm$ 0.12	1.086 $\pm$ 0.25	<0.0001
BMDL4 (g/cm²)	0.706 $\pm$ 0.12	1.108 $\pm$ 0.26	<0.0001
BMD L1-4 (g/cm²)	0.743 $\pm$ 0.08	1.041 $\pm$ 0.22	<0.0001
AREA L1-4 (cm²)	29.876 $\pm$ 3.71	50.748 $\pm$ 5.73	<0.0001
vBMDL14 (g/cm³)	0.137 $\pm$ 0.02	0.145 $\pm$ 0.02	0.350
T SCORE L1-4	-3.58 $\pm$ 0.58	-1.16 $\pm$ 1.66	<0.0001
Z SCORE L1-4	-1.64 $\pm$ 0.89	0.09 $\pm$ 1.39	0.001
BMDTH (g/cm²)	0.804 $\pm$ 0.09	0.956 $\pm$ 0.16	0.002
TH bone area (cm²)	22.139 $\pm$ 4.13	32.280 $\pm$ 3.83	<0.0001
vBMDTH (g/cm³)	0.169 $\pm$ 0.26	0.172 $\pm$ 0.16	0.756
T- SCORE TH	-1.74 $\pm$ 0.74	-0.60 $\pm$ 1.25	0.004
Z-SCORE TH	-0.05 $\pm$ 0.81	0.61 $\pm$ 1.07	0.097
BMDFN (g/cm²)	0.621 $\pm$ 0.09	0.839 $\pm$ 0.12	<0.0001

TH: total hip, **FN:** Bone mineral density femoral neck

TABLE 3: Type of fractures. Absolute values and (%)

Type of fractures	DIGH, n=14	CO, n= 32	p
Biconcave	11 (78.6)	17 (53.1)	0.047
Crush	3 (21.4)	6 (18.8)	0.506
Wedge	0 (00)	9 (28.1)	0.041

TABLE 4: Grade of fractures. Absolute values and (%)

Grade of fractures	DIGH, n=14	CO, n= 32	p
Mild	8 (57.1)	12 (37.5)	0.109
Moderate	6 (42.9)	17 (53.1)	0.308
Severe	0 (00)	3 (9.4)	0.543