



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ROSSANA MARIA CAHINO PEREIRA

**COMPOSIÇÃO CORPORAL, PERFIL METABÓLICO
E INFLAMATÓRIO NA HETEROZIGOSE PARA UMA
MUTAÇÃO NO GENE DO RECEPTOR DO GHRH**

**ARACAJU
2007**

ROSSANA MARIA CAHINO PEREIRA

**COMPOSIÇÃO CORPORAL, PERFIL METABÓLICO
E INFLAMATÓRIO NA HETEROZIGOSE PARA UMA
MUTAÇÃO NO GENE DO RECEPTOR DO GHRH**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da
Universidade Federal de Sergipe, para
obtenção do grau de Mestre em Ciências da
Saúde.

Área de Concentração: Estudos Clínicos e Laboratoriais em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Manuel Herminio de Aguiar-Oliveira

**ARACAJU
2007**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da Saúde/UFS

P436c Pereira, Rossana Maria Cahino
Composição corporal, perfil metabólico e inflamatório na heterozigose para uma mutação no gene do receptor do GHRH / Rossana Maria Cahino Pereira. -- Aracaju, 2007.
114f.
Orientador: Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa em Medicina.

1. Hormônio do crescimento humano 2. Mutação no receptor do GHRH 3. Heterozigose 4. Variação fenotípica 5. Endocrinologia I. Título

CDU 612.43:577.17

ROSSANA MARIA CAHINO PEREIRA

**COMPOSIÇÃO CORPORAL, PERFIL METABÓLICO
E INFLAMATÓRIO NA HETEROZIGOSE PARA UMA
MUTAÇÃO NO GENE DO RECEPTOR DO GHRH**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da
Universidade Federal de Sergipe, para
obtenção do grau de Mestre em Ciências da
Saúde.

APROVADA EM: 16/04/2007

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR: PROF. DR. MANUEL HERMÍNIO AGUIAR-OLIVEIRA - UFS

1ª EXAMINADORA: PROF^a. DR^a. LUCILA LEICO KAGOHARA ELIAS – FMRP/USP

2º EXAMINADOR: PROF. DR. JOSÉ AUGUSTO SOARES BARRETO-FILHO - UFS

PARECER

AGRADECIMENTOS

Aos colegas que fazem parte do projeto **“Conseqüências de deficiência isolada e vitalícia do GH”** onde comecei a trilhar o mundo da pesquisa e a admirar muito mais pessoas como: Dr. Manuel Hermínio de Aguiar-Oliveira, Dr. Roberto Salvatori, Dr. José Augusto Soares Barreto-Filho, a Ivanilde, Maria do Carmo e tantos outros como: Dra Joselina, Dra Celi, Viviane, Carla Raquel, Marta Regina, Dr Menilson, Franciele, Jorge, Acadêmicos (as) Catarine, Tábita, Diego, Érica e a Comunidade de Itabaianinha.

Aos Meus Familiares, meu Pai (Sempre presente), minha Mãe, Tia Inalda e Irmãos, Cunhados e Sobrinhos agradeço o apoio recebido, principalmente nestes dois anos de Mestrado.

Aos meus amigos, em especial a THOMAS quero agradecer o incentivo mesmo diante das dúvidas e incertezas. Aos amigos que por ventura hoje não estão tão perto de mim, mas sei que no fundo torcem para tudo dê certo.

Às Instituições de Apoio:

- Universidade Federal de Sergipe, ao Núcleo de Pós Graduação em Medicina, aos Professores e amigos que lá fiz.
- Ao Hospital Universitário e a direção na pessoa de Dr^a Ângela Maria da Silva pelo apoio recebido.
- Ao Laboratório do H.U. na pessoa de Dr^a Flávia Oliveira da Costa (amiga querida) e também a todos que formam a sua equipe: Lúcia, Djane, Ívina, Fábio enfim a todos que direta ou indiretamente colaboraram para meu sucesso.
- FAP – Fundação de Apoio a Pesquisa de Sergipe – Funtec 02/2002
- National Institute of Health, National Institute of diabetes and Digestive and Kidney Disease. Grant Number – 1R01DK065718-01A1
- University Johns Hopkins – Na pessoa de Dr Roberto Salvatori, que sempre me inspira muito no mundo da pesquisa e que nos recebeu de braços abertos quando de nossa visita aos EUA.
- FAPESB – Nas pessoas que administram os projetos desenvolvidos e pela prontidão com que são atendidos nossos pedidos.

- ENDOCLÍNICA PIO XII, onde contamos com a indispensável colaboração de Sandra Maria Pereira Oliveira, amiga e irmã, e funcionários: Dra Aline, Ana Paula, Edimilson, Rosimeire Gabriel, Vera Lúcia, Hozana e Erionaldo, estes, amigos de longa data de quem gosto muito, Agradeço de Coração.

Ao meu bom Deus e aos Irmãos de Luz, que sei me acompanham dia e noite em cada momento de minha vida, hoje e sempre, o meu: MUITO OBRIGADA!!!

“Andei.
Por caminhos difíceis, eu sei.
Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr.
E, assim, cada passo que der, tentarei fazer o melhor que puder.
Aprendi.
Não tanto quanto quis, mas vi que, conhecendo
o universo ao meu redor, aprendo a me conhecer melhor,
e assim escutarei o tempo, que ensinará
a tomar a decisão certa em cada momento.
E partirei, em busca de muitos ideais.
Mas sei, que hoje se encontram meu passado, futuro e presente.
Hoje sinto em mim a emoção da despedida.
Hoje é um ponto de chegada e, ao mesmo tempo,
ponto de partida...
Se em horas de encontros pode haver tantos desencontros, que a
hora da separação seja, tão somente, a hora de um verdadeiro,
profundo e coletivo encontro. De tudo ficarão três coisas: a certeza
de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a
certeza de ser interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo
de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte,
da procura um encontro.”

Encontro Marcado
(Fernando Sabino)

RESUMO

Diferentes formas de Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento (DIGH) são de herança autossômica recessiva. A mais comum (tipo IB) é frequentemente causada por mutações bi-alélicas no gene do receptor de GHRH (GHRHR). Embora portadores heterozigotos da mutação do gene do GHRHR pareçam normais, o tamanho pequeno da maior parte das famílias e o fato que a estatura é um complexo determinado por características poligênicas levaram-nos a analisar cuidadosamente a hipótese de um fenótipo para a heterozigose. Para testar a hipótese de que a heterozigose para uma mutação do GHRHR poderia estar associado a um fenótipo intermediário foi estudada uma extensa família com DIGH familiar (Coorte de Itabaianinha/Sergipe). Nesta população a DIGH é causada por uma mutação nula em homozigose do gene do receptor do GHRHR. Os adultos e crianças com DIGH têm severa baixa estatura, massa magra reduzida e aumento de: percentagem (%) de massa gorda (% MG), cintura, relação cintura/quadril, Colesterol total, LDL Colesterol, Proteína C Reativa alta sensibilidade (PCRas) e a diminuição do Modelo Homeostático do Índice de Resistência à Insulina ($HOMA_{IR}$). Nós estudamos 76 indivíduos adultos entre 25 e 75 anos de idade heterozigotos (WT/MT) para esta mutação e comparamos pareados para a idade e sexo com 77 indivíduos controles homozigotos para o alelo normal (WT/WT) da mesma população. O DNA genômico foi genotipado através da técnica de Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE). Não foi encontrada nenhuma diferença entre os indivíduos na altura dos adultos e níveis séricos de IGF-I entre os dois grupos. O peso, o índice de massa corpórea (IMC), dobras cutâneas, circunferência da cintura e quadril e massa magra (MM) estavam reduzidos no grupo de indivíduos WT/MT. A % de MG e a relação cintura/quadril foram semelhantes entre os dois grupos. A insulina e o $HOMA_{IR}$ foram mais baixos no grupo WT/MT. Os outros parâmetros bioquímicos (colesterol total e frações, Triglicérides, Lipoproteína (a) (LP (a)), Proteína C Reativa alta sensibilidade (PCRas) não foram diferentes entre os dois grupos. Em conclusão, a heterozigose para uma mutação nula no gene do receptor do GHRH não é associada com redução da estatura final nem nos níveis séricos de IGF-I, mas, causa alterações na composição corporal e aumento do $HOMA_{IR}$. Estes efeitos parecem não ser modulados por alterações nas concentrações séricas de IGF-I).

Palavras-chave: Receptor do GHRH, mutação, heterozigose, fenótipo.

ABSTRACT

Different forms of isolated GH deficiency (IGHD) have an autosomal recessive mode of inheritance. The most common one (type IB) is often caused by bi-allelic mutations in the GHRH receptor (GHRHR) gene (*GHRHR*). Although heterozygous carriers of *GHRHR* mutations appear normal, the small size of most of the families and the fact that stature is a complex and polygenic trait prevented so far a careful analysis of their phenotype. To test the hypothesis that heterozygosity for a *GHRHR* mutation may be associated with a mild phenotype, we studied large Brazilian kindred with familial IGHD (Itabaianinha cohort). In this population, GHD is caused by a homozygous *null* mutation of the *GHRHR*. Adults and children with GHD have severe short stature, reduced lean mass, increased % fat mass, increased waist to hip (W/H) ratio, increased total and LDL-cholesterol and C-reactive protein (CRP_{us}), increased systolic blood pressure, and increased insulin sensitivity. We studied 77 adult subjects (age 25-75) heterozygous for the mutation (WT/MT) and compared them with age and sex-matched controls homozygous for the wild-type allele (WT/WT) from the same population. Genotyping was performed by denaturing gradient gel electrophoresis from genomic DNA. We found no difference in adult height; blood pressure and standard deviation score for serum IGF-I between the two groups. Body weight, body mass index, skin folds, waist, hip, lean and fat mass were all reduced in WT/MT subjects. %FM and W/P ratio were similar in the two groups. Fasting insulin and in HOMA_{IR} were lower in WT/M than in WT/WT. The other biochemical parameters (total and fractionated cholesterol, triglycerides, Lp (a), CRP_{us}) were not different between the two groups. Our data shows that heterozygosity for a *null GHRHR* mutation is not associated with reduction in adult stature or reduction in serum IGF-I, but it causes a parallel decline in fat and lean mass, and an increase in insulin sensitivity. Heterozygosis for a null *GHRHR* mutation is not associated with reduction in adult stature or in serum IGF-I, but is causes changes in body composition and increase in HOMA_{IR}. These effects do not seem to be modulated by changes circulating IGF-I.

Key words: GHRH receptor, mutation, heterozygosis, phenotype.

LISTA DE ABREVIATURAS

A = adenina

AR = Autossômico Recessivo

BE = Baixa estatura

C = Cintura

C/Q = Relação Cintura/Quadril

CO = Grupo Controle

DGH = Deficiência do Hormônio de Crescimento

DIGH = Deficiência Isolada do Hormônio de Crescimento

DGH-A = Deficiência do Hormônio do Crescimento em Adultos

DGGE = Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação

EDP a/i = Escore desvio padrão de altura para a idade

EDP IGF-I = Escore desvio padrão de IGF-I para a idade

G = Guanina

GH = Hormônio de Crescimento

GH1 = Gene do GH

GHBP = Proteína de ligação do GH

GHR = Receptor do GH

GHRH = Hormônio Liberador do Hormônio de Crescimento

GHRHR = Receptor do Hormônio Liberador do Hormônio de Crescimento

HTZ = **WT/MT** = Heterozigotos

HMZ = **WT/WT** = Homozigotos Normais

HDLc = Lipoproteína de alto peso molecular

HOMAir = Índice de Resistência a Insulina – Modelo Homeostático

IGF = Fator de crescimento insulina- símile

IGF-I = Fator de crescimento insulina- símile tipo I

IMC = Índice de Massa Corpórea

IVS1 = Íntron I

LDL = Lipoproteína de Baixo Peso Molecular

Lp (a) = Lipoproteína (a)

MG = Massa Gorda

% MG = Percentagem de Massa Gorda

MM = Massa Magra

MT/MT = Homozigotos afetados

mRNA = RNA Mensageiro

N = Número de indivíduos para cada variável

NCHS = *National Center of Health Statistics*

NE = Não Exequível

NS = Não significativa

P = Nível descritivo de probabilidade

PCRas = Proteína C Reativa alta sensibilidade

Q = Quadril

RMN = Ressonância Nuclear Magnética

SC = Superfície Corporal

SRIF = Somatostatina

WT = *Wild Type* – Indivíduo normal

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	micro
$\pm$	desvio padrão
$<$	menor do que
$>$	maior do que
$\leq$	menor ou igual do que
$\geq$	maior ou igual do que
β	beta
ng/ml	nanograma/mililitro
mg/dl	miligrama/decilitro
mg/L	miligrama/litro
mm	milímetro
p	probabilidade de significância
Kg/m ²	quilograma/metro quadrado
%	porcentagem
cm	centímetro
Kg	quilograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das seqüências de <i>íntrons</i> e <i>éxons</i>	21
Figura 2. Esquema representativo da regulação intrínseca do eixo GH- sistema IGF.....	22
Figura 3. Gráfico mostrando o declínio do GH por faixas etárias.....	24
Figura 4. Esquema gráfico da mudança na secreção do IGF-I sérico com incremento para a idade.....	26
Figura 5. Itabaianinha, Sergipe, Brasil.....	36
Figura 6. Família da comunidade de Itabaianinha, Sergipe, Brasil.....	37
Figura 7. <i>Screening</i> para homozigose e heterozigose da mutação de Itabaianinha por DGGE.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratificação dos Heterozigotos (WT/MT) e Homozigotos Normais (WT/WT) segundo sexo e idade.....	46
Tabela 2. Dados Antropométricos e Escore Desvio Padrão do IGF-I sérico (EDP-IGF-I).....	47
Tabela 3. Média da Composição Corporal (Média $\pm$ Desvio Padrão) em indivíduos.....	48
Tabela 4. Dados Bioquímicos (Média $\pm$ Desvio Padrão) em indivíduos.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Aspectos preliminares da mutação de Itabaianinha	18
2.2 Terminologia Genética	19
2.3 Eixo Hipotálamo – Hipofisário	22
2.4 Hipófise	22
2.5 Hormônio de Crescimento (GH)	23
2.6 Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF-I)	25
2.7 Deficiência Isolada do Hormônio de Crescimento (DIGH)	27
2.8 Heterozigose na DIGH	30
2.9 Proteína C Reativa Alta Sensibilidade (PCRas) e Lipoproteína (a) (LP(a))	31
2.9.1 Proteína C Reativa Alta Sensibilidade (PCRas)	31
2.9.2 Lipoproteína (a) (LP(a))	31
3 OBJETIVOS	34
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
4.1 Casuística	36
4.1.1 População estudada	36
4.2 Métodos	38
4.2.1 Pré-seleção	38
4.2.2 Coleta do DNA e Genotipagem	39
4.2.3 Dados Antropométricos	40
4.2.3 Dados Laboratoriais	42
4.3 Análise Estatística	44
5 RESULTADOS	46
5.1 População Estudada	46
5.2 Dados Antropométricos e níveis de IGF-I	47
5.3 Pregas Cutâneas e Composição Corporal	48
5.4 Dados Laboratoriais	49
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	58

ARTIGO ACEITO E PUBLICADO ELETRONICAMENTE.....	66
APÊNDICE 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91
APÊNDICE 2 Medidas Antropométricas.....	99
APÊNDICE 3 Exames Laboratoriais	103
APÊNDICE 4 Medidas e Pregas Cutâneas	107
ANEXO 1 Parecer do CEP e CONEP.....	112
ANEXO 2 Valores de Referência – Laboratório.....	114

1 INTRODUÇÃO

A deficiência isolada do hormônio do crescimento (DIGH) tem uma ocorrência familiar em 5 a 30 % dos casos. Vários modelos de herança têm sido descritos, sendo o mais freqüente o autossômico recessivo (AR) (MULLIS, 2005). A forma mais comum de mutação AR (DIGH 1B) é causada freqüentemente por mutações homozigóticas ou em heterozigose composta do gene do receptor do hormônio liberador do GH (GHRHR) (SALVATORI et al., 2001b). A maioria das mutações no GHRHR parece ser específica a certa região geográfica, com exceção de uma (L144H) que documentamos em Aquidabã (Sergipe/Brasil) e na Espanha com uma origem comum e na Pensilvânia (EUA) com uma origem diferente (SALVATORI et al., 2002b). Apesar dos heterozigotos (HTZ) para a mutação no GHRHR parecerem normais o pequeno tamanho da maioria das famílias descritas até o momento e a determinação provavelmente poligênica da estatura adulta dificultam uma análise cuidadosa do seu fenótipo.

O conceito de que uma doença recessiva requer um mau funcionamento de ambos os alelos, paterno e materno, tem sido desafiado por alguns exemplos mostrando que indivíduos HTZ para a mutação recessiva exibem um fenótipo discreto, de alguma forma intermediário entre os homozigotos (HMZ) e indivíduos normais, por exemplo, mutações inativadoras em homozigose do gene do receptor da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) causam hipercolesterolemia severa e doença arterial coronariana prematura, enquanto HTZ levam a hipercolesterolemia moderada e doença arterial coronariana em uma idade mais tardia (JANSEN et al., 2002). Mutações em homozigose do gene do receptor sensor do cálcio causam hiperparatireoidismo neonatal severo enquanto as mutações em heterozigose causam hipercalcemia, hipocalciúrica familiar benigna (HENDY et al., 2000). Mutação em homozigose do gene do receptor B do peptídeo atrial natriurético causa displasia óssea severa (displasia acromesomélica) enquanto HTZ apresentam apenas uma baixa estatura discreta (OLNEY et al., 2006). Finalmente, a obesidade é mais marcada em HMZ que em HTZ portadores de mutações do gene do receptor da melanocortina tipo quatro (FAROOQI et al., 2003).

Por analogia, para os exemplos acima, nós hipotetizamos que uma mutação do GHRHR nos indivíduos HTZ pode ser associada com um grau moderado de deficiência de GH que pode não ser tão evidente no exame físico inicial. Este assunto é pertinente à

população geral, porque estão sendo descritas com frequência crescentes mutações do gene do GHRHR em diferentes áreas do mundo (SALVATORI et al., 2001a; 2002a; 2002b; WAJNRAJCH et al., 1996). Além disso, o fato que em várias famílias de afetados os indivíduos HTZ combinam mutações em alelos distintos de GHRHR defeituosos sugere que estas mutações podem ser bastante prevalentes na população em geral (SALVATORI et al., 2001a; 2001b; 2002b). Dados obtidos dos anões de Sindh do Paquistão, que tem uma mutação HMZ nula no gene do GHRHR, mutação E72X (BAUMANN; MAHESHAWARI, 1997) sugeriram um “atraso de crescimento ou talvez, déficit estatural de adultos em heterozigose” (MAHESHAWARI et al., 1998), mas suas conclusões são prejudicadas devido ao pequeno número da amostra. Nós identificamos uma grande família com DIGH familiar, com 105 indivíduos afetados em mais de 7 gerações, residindo no município brasileiro de Itabaianinha a noroeste do estado de Sergipe. Nesta população, a DIGH é uma mutação causada por uma mutação homozigótica no início do íntron 1 (IVSI + 1 G → A) do gene do GHRHR (SALVATORI et al., 1999). Os adultos e crianças desta família têm níveis muito baixos de GH e IGF-I, MM diminuída, aumento da % MG, relação cintura/quadril aumentada, aumento dos níveis de LDL colesterol e PCRs, aumento da pressão sanguínea sistólica, nenhuma resistência à insulina e evidência de aterosclerose prematura (BARRETTO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2006). Em um estudo preliminar, foi sugerido que os indivíduos HTZ tinham um nível sérico de IGF-I mais baixos que os indivíduos HMZ normais (HAYASHIDA et al., 2000), mas a idade heterogênea e o pequeno número de indivíduos HTZ comparados aos controles dificultaram as conclusões finais do estudo. Aqui estudamos um número significativamente maior de indivíduos HTZ para a mutação IVSI + 1 G → A no gene do GHRHR, e os comparamos com controles para mesma idade e sexo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos preliminares da mutação de Itabaianinha

O município de Itabaianinha situa-se a sudoeste de Sergipe, ficando a aproximadamente 154 Km de Aracaju. Lá existe um grande número de pessoas com acentuada baixa estatura proporcionada, sem a presença de retardo mental, sem mal formações congênitas e sem deformidades ósseas. Todos os indivíduos afetados ou seus ancestrais nasceram em um pequeno aglomerado rural a noroeste do município de Itabaianinha denominado Carretéis e arredores (Cerretéis, Patu, Olhos D'Água, Tapera, Mutuca, Altos, Queimadinhos, Muquém, Campinhos, Pedra Branca, Terra Vermelha, Fundão e Água Boa). A maioria migrou para a sede do município a procura de melhores condições de trabalho, poucos ainda subsistem da atividade agrícola, artesanato e olarias. O estudo foi realizado em Itabaianinha. Todas as famílias estudadas tinham pelo menos um indivíduo fenotipicamente afetado (SOUZA, 1997).

A herança é autossômica recessiva. Através da biologia molecular Salvatori et al. (1999), comprovaram que o fenótipo de indivíduos afetados, é devido a uma mutação do tipo *splice* na posição 5' no início do *íntron* 1 (IVS1 + 1, G $\rightarrow$ A) do gene do receptor do GHRH (genótipo MUT/MUT). Homozigotos afetados têm baixa estatura e não respondem a estímulos para liberar GH, além de concentrações reduzidas de IGF- I.

Embora outras três citações (BAUMANN; MAHESHWARI, 1997; NETCHINE et al., 1998; WAJNRAJCH et al., 1996) de uma mesma mutação no gene do receptor do GHRH já tenham sido descritas no subcontinente indiano, a descoberta da mutação de Itabaianinha demonstra de forma inequívoca a importância vital do GHRH e que defeitos no seu receptor causam severa baixa estatura.

Foi sugerida a existência de um fenótipo parcial nos Heterozigotos de Sindh (BAUMANN; MAHESHWARI, 1997) com uma diferente mutação no gene do receptor do GHRH, representados por níveis baixos de IGF-I e com discreto retardo do crescimento e talvez déficit estatural no adulto. Os níveis reduzidos de IGF-I devem corresponder a uma secreção hipofisária menor de GH pela pituitária.

2.2 Terminologia Genética

Necessário se faz alguns esclarecimentos sobre termos genéticos que serão usados no decorrer do tema. Segundo Thompson, McInnes e Hutington (1993), a história familiar é importante: pode ser proveitosa ao diagnóstico, muitas vezes revela que um distúrbio é genético, pode oferecer informações sobre a história natural de uma doença e a variedade de sua expressão, e ainda esclarecer o padrão da herança, permitindo que se estime o risco de recorrência em outros familiares.

- **Genótipo:** é a sua constituição genética, seja coletivamente em todos os loci ou, mais tipicamente num *locus* isolado.

- **Fenótipo:** é a expressão observável de um genótipo como um caráter morfológico, bioquímico ou molecular.

- **Fenótipo Dominante:** quando expressado da mesma maneira em homozigotos e heterozigotos.

- **Fenótipo Recessivo:** é expresso somente em homozigotos, ou para caracteres ligados ao X.

- **Fenótipo Parcial:** é expresso em heterozigotos, onde têm um gen mutado e outro não.

- **Homozigoto:** quando uma pessoa tem um par de alelos idênticos.

- **Heterozigoto:** quando os alelos são diferentes.

- **Mutação:** em genética pode ter dois sentidos, para indicar uma nova alteração genética que não era previamente conhecida numa família (*de novo*) e, às vezes, só para indicar um alelo anormal.

- **Herança Autossômica Recessiva:** expressam-se apenas em homozigotos, que, portanto devem ter herdado um alelo mutante de cada genitor. Como este distúrbio deve ser herdado de ambos os pais, o risco de qualquer portador ter um filho afetado depende em parte da frequência de portadores na população, que no caso em estudo é grande devido a alta taxa de casamentos consangüíneos e, portanto, ambos os sexos têm a mesma probabilidade de serem afetados.

- **Herança Autossômica Dominante:** as pessoas afetadas geralmente são heterozigóticas. O fenótipo aparece em todas as gerações, e toda pessoa afetada tem um genitor afetado, tendo, portanto um risco de 50% de herdar o caráter.

- **Íntron:** são seqüências intercalares, inicialmente transcritas em RNA no núcleo, mas não estão presentes no mRNA maduro no citoplasma, e, portanto não são

representados no produto protéico final (FIGURA 1). Os *íntrons* alternam-se com as seqüências codificadoras ou *éxons*, que codificam a seqüência de aminoácidos do produto. A transcrição de um gene inclui os *íntrons* e *éxons*, e passa além do fim das seqüências codificadoras.

- **Deleção:** é a perda de um segmento cromossômico, resultando em desequilíbrio do mesmo. Pequenas deleções dentro de genes, ou estendendo-se sobre vários genes contíguos, são mecanismos reconhecidos de mutação.

- **Mutação *Missense*:** substituição de uma base, resultando em substituição de um aminoácido.

- **Mutação *Nonsense*:** Introdução de um *códon* de finalização prematuro (TAA, TAG ou TGA) na seqüência codificadora, resultando na síntese de uma proteína truncada com função reduzida ou ausente.

- **Mutação *Silenciosa*:** Troca de nucleotídeo sem haver mudança no aminoácido.

- **Mutação *nula*:** Mutação que abole completamente a função da proteína acometida.

- **Mutação no sítio do *Splice*:** Alteram a remoção da seqüência intrônica. O *íntron* não é removido e permanece como parte da molécula de mRNA, alterando o produto protéico. A proteína traduzida será diferente da original.

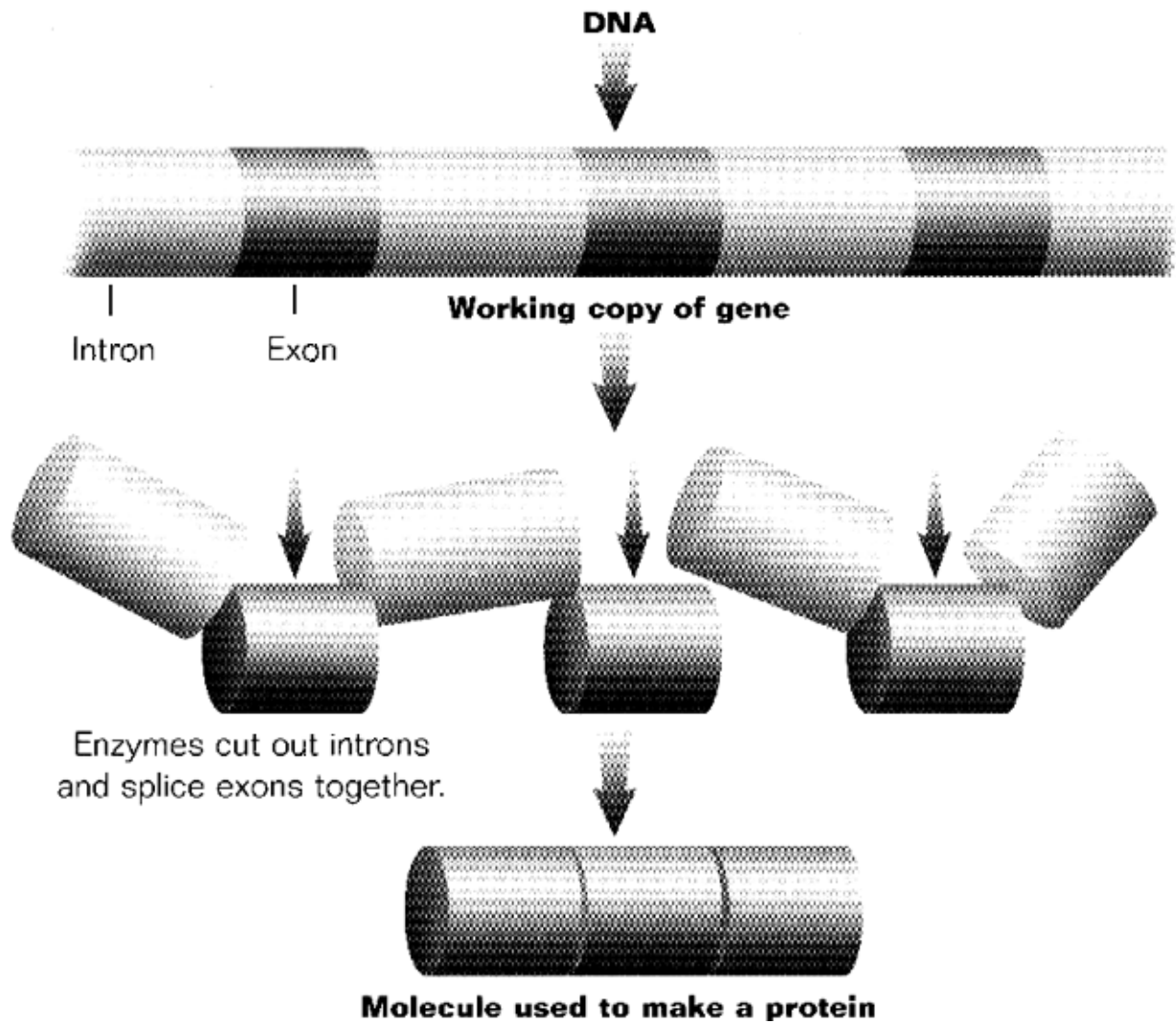


Figura 1. Esquema representativo das seqüências de íntrons e éxons.

Fonte: Long & Slichter, capítulo 15 (ghs.gresham.k12.or.us/.../chpt15/intron.htm)

2.3 Eixo Hipotálamo – Hipofisário

Há muito se conhece a relação morfofuncional entre o hipotálamo e a hipófise posterior. Há uma estreita conexão entre o hipotálamo e a hipófise anterior através de uma circulação tipo porta. Substâncias neurohormonais, liberadas por centros hipotalâmicos são levadas à hipófise anterior graças a este sistema vascular influenciando a síntese e liberação dos hormônios hipofisários. Estas substâncias são chamadas fatores liberadores do hipotálamo. As relações entre o hipotálamo, à hipófise e as glândulas alvos podem ser representadas conforme o esquema abaixo (FIGURA 2) (MARTINELLI JÚNIOR et al., 2002):

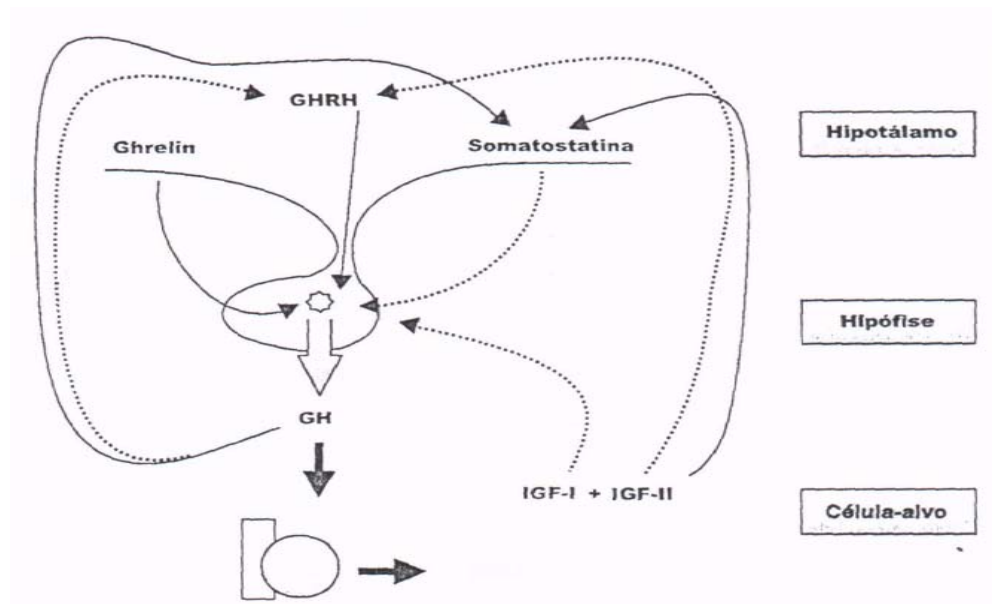


Figura 2. Esquema representativo da regulação intrínseca do Eixo GH-IGF. Setas **cheias** representam ação estimuladora e as setas **pontilhadas** ações inibidoras dos hormônios representados.

2.4 Hipófise

O controle do sistema endócrino é exercido pelos núcleos neuronais hipotalâmicos que, por sua vez, entram em contacto com neurônios de diversas áreas cerebrais. No hipotálamo são produzidos polipeptídios que estimulam ou inibem as secreções adeno-

hipofisárias, dentre as quais citamos o Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH).

A hipófise (também denominada pituitária) é uma pequena glândula com cerca de 1 cm de diâmetro e peso de 0,5 a 1 g. Localiza-se na sela túrcica, na base do cérebro e está ligada ao hipotálamo pelo pedúnculo hipofisário (THORNER et al., 1992).

Além de regular a liberação hormonal, os hormônios hipofiseotróficos controlam a diferenciação celular, sua proliferação e a secreção hormonal (CORONHO; PETROIANER; MATOS SANTANA, 2001).

Henry (1995) cita que a região hipotalâmica produz hormônios de liberação e inibição que têm como função controlar a síntese e a liberação dos hormônios da hipófise anterior. Os mecanismos de “feedback”, pelos quais um hormônio influencia sua própria secreção ou a secreção de outro hormônio, operam em ambos os níveis, hipofisário e hipotalâmico.

Alguns hormônios hipotalâmicos estimulam mais de um hormônio hipofisário; por exemplo, o hormônio estimulador de tireotrofina (TRH) é um potente liberador de tireotrofina (TSH) e, em algumas circunstâncias, também de hormônio de crescimento (GH) e corticotrofina (ACTH). Outros são inibidores: A Somatostatina inibe o GH e TSH, a Dopamina é o principal inibidor da Prolactina (PRL) e do TSH, Gonadotrofinas e em algumas circunstâncias do GH (HENRY, 1995).

2.5 Hormônio de Crescimento (GH)

O GH é secretado pelos somatotrofos e têm na sua estrutura molecular 191 aminoácidos com peso molecular de 22.000 daltons. Em uma hipófise normal encontramos 3 a 5 mg de GH aproximadamente, com secreção diária em torno de 500 a 875 ng de GH. (GREENSPAN; STREWLWER, 1997; ISSELBACHER et al., 1998; THORNER et al., 1992).

O GH é produzido no lobo anterior da hipófise, ou seja, na adenohipófise e tem como órgão alvo o fígado. A secreção do GH hipofisário está sob controle de dois peptídeos hipotalâmicos: GH Releasing-Hormone (GHRH) e Somatostatina ou Somatotropin-Releasing-Inhibiting Hormone (SRIF). Uma vez secretado, o GH age através de um receptor, cuja forma circulante, o Growth-Hormone binding-peptide (GHBP), representa a sua porção extracelular,

estimulando a produção de Insulin-Like Growth Factor (IGF-I) (CORONHO; PETROIANER; MATOS SANTANA, 2001).

O GHRH é o principal estimulador da secreção de GH, que é secretado em pulsos com um ritmo ultradiano em que a amplitude e frequência dos pulsos aumentam, em crianças e adultos jovens, 1 hora após o início do sono profundo (SALVATORI et al., 1999).

A secreção do GH é modificada pela idade, diminuindo acentuadamente após a quarta década, pelo estágio metabólico, como por variações glicêmicas, ingestão de proteínas e por outros hormônios; é estimulada por estrógenos, progesterona, andrógenos, hormônios tireóideos e suprimida por glicorticóides. Sua concentração é extremamente elevada durante os períodos fetais e neonatais, declinando rapidamente após o nascimento. Durante a infância, seu padrão de secreção é relativamente estável até a puberdade. Nesta fase, influenciada pelo aumento de esteróides sexuais, a secreção do GH aumenta consideravelmente, através de um substancial aumento na amplitude dos pulsos do GH. Após a meia-idade, a secreção do GH cai progressivamente, em torno de 10 a 15% por década, e na velhice, os níveis de GH são semelhantes aos de um adulto jovem com deficiência de GH (FIGURA 3). Seus níveis também diminuem com o aumento de peso, onde sua concentração é deprimida por ácidos graxos e hiperglicemia, e estimulada por hipoglicemia e ingestão protéica (CORONHO; PETROIANER; MATOS SANTANA, 2001).

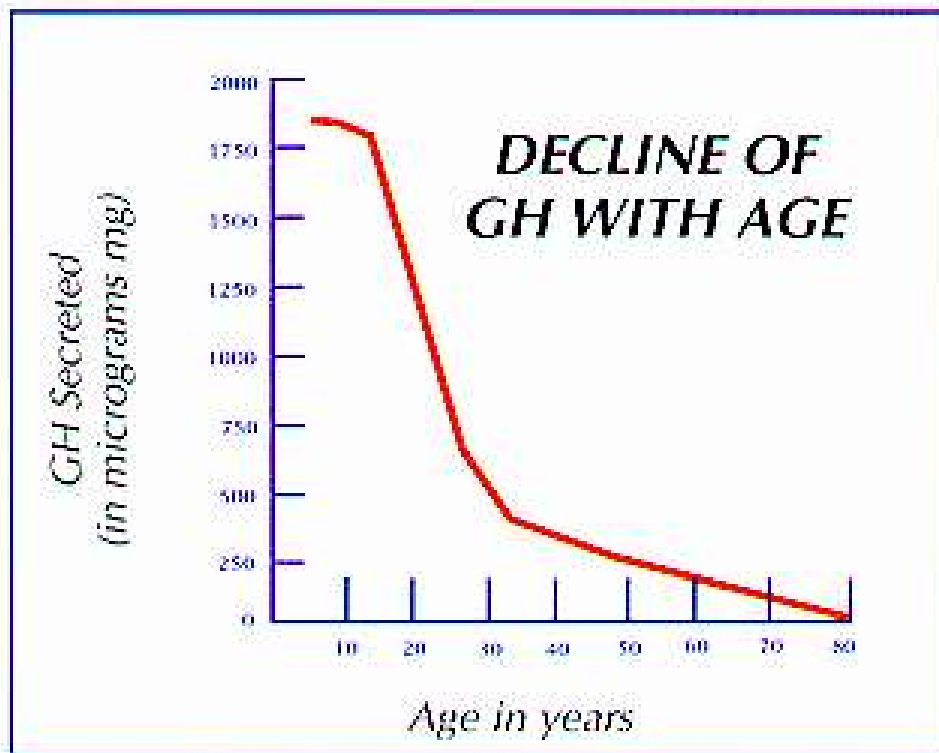


Figura 3. Gráfico mostrando o declínio do GH por faixas etárias.

Além de estar envolvido na diferenciação específica de certas células (células do crescimento ósseo, estimulando o processo de crescimento das cartilagens epifisárias e dos ossos longos, células musculares na etapa inicial da maturação), o GH exerce também efeitos metabólicos específicos como: aumento da utilização dos carboidratos, aumento da velocidade da síntese protéica nas células do organismo, resultando em balanço nitrogenado positivo, maior metabolização e utilização dos ácidos graxos do tecido adiposo, fazendo com que o GH produza efeito anabólico, lipolítico, e antagonista da insulina. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram sua ação antinatriurética, e que apesar da presença de receptores para IGF-I em células linfocitárias, não há imunodepressão na Deficiência Isolada do Hormônio de Crescimento (DIGH) (CUNEO et al., 1992, UNDERWOOD; VAN, 1992).

Um dos efeitos do GH é promover o crescimento através da síntese protéica, que ocorre em tecidos como ossos, cartilagens, esqueleto e sistema eritropoiético. As ações do GH resultam do efeito direto do hormônio sobre as cartilagens de crescimento e do seu efeito indireto mediado pelo IGF-I. Para estimular a síntese de IGF-I, o GH acopla-se ao seu receptor celular, uma proteína cujo gene está localizado no cromossomo 5. Deleções ou mutações resultam da síndrome de Laron ou na Insensibilidade ao GH, descrita inicialmente em 1966 por LARON (CORONHO; PETROIANER; MATOS SANTANA, 2001).

2.6 Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF – I)

Segundo Smith et al. (1993), grande parte dos efeitos do GH ocorre pela ação do IGF-I, um polipeptídeo de 79 aminoácidos, muito semelhante à pró-insulina, que é sintetizado no fígado, por ação do GH. A dosagem do IGF-I tem sido atualmente método de escolha para o diagnóstico de deficiência de GH, principalmente porque sua meia-vida biológica é mais longa, ou seja, 2 a 4 horas que a do GH que é de 20 minutos, propiciando assim uma visão mais integrada do fenômeno através de uma dosagem única de IGF-I.

Os IGFs circulam ligadas as proteínas de ligação denominadas IGFBPs, estas são classificadas de 1 a 6, sendo que as IGFBPs de 1 a 4 têm maior concentração na circulação sanguínea, e a mais importante delas são a IGFBP3; 40% dos receptores periféricos têm afinidade semelhante tanto para insulina, como para IGF-I em vários tipos de células, mas nos fibroblastos, condrócitos e osteoblastos existe maior concentração de receptores específicos para IGF-I (SMITH et al., 1993).

Os efeitos do IGF-I em humanos são semelhantes aos do GH, isto é, incrementam o crescimento linear, diminuem ácidos graxos e triglicérides, promovem aumento da síntese protéica e da excreção do nitrogênio, mas são antagônicos no metabolismo da glicose sendo o GH hiperglicemiante e o IGF-I hipoglicemiante (JULL et al., 1994). O IGF-I semelhante ao GH apresenta uma concentração máxima com o fim da puberdade e decrescendo a seguir (FIGURA 4).

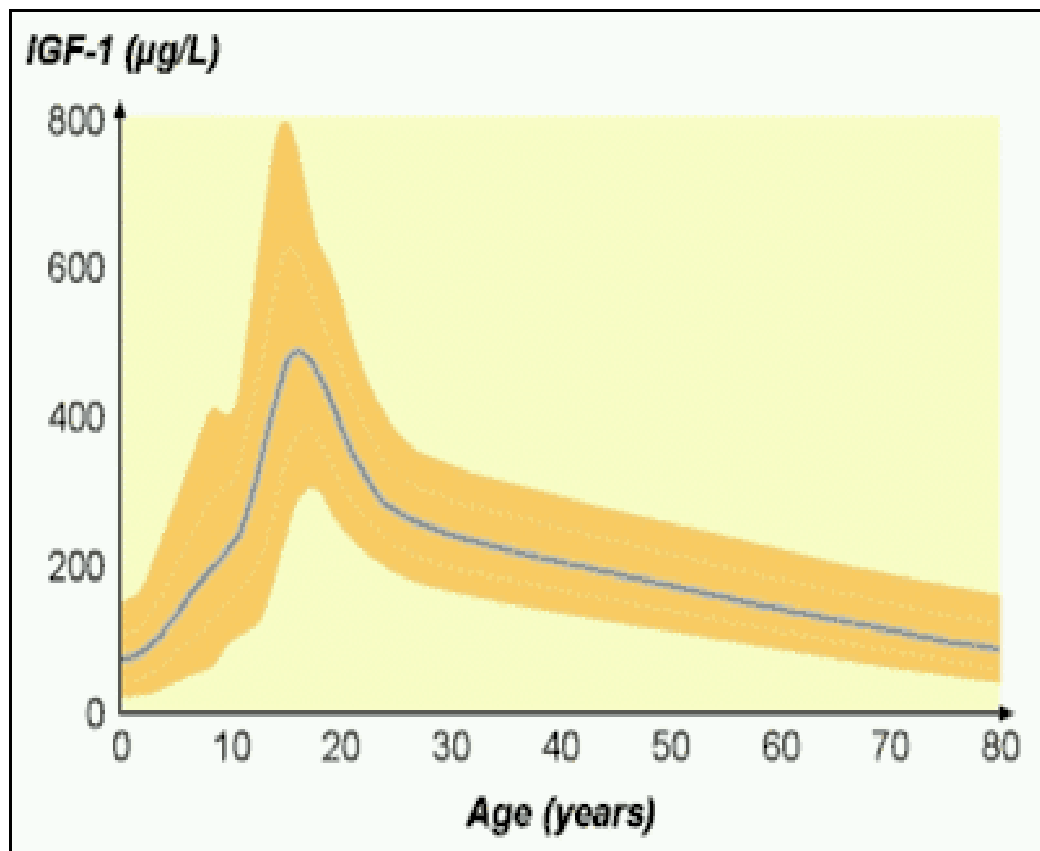


Figura 4. Esquema gráfico da mudança na secreção do IGF-I sérico com incremento para a idade. Modificado por JULL et al, 1994.

Os mecanismos responsáveis pela redução da secreção de GH no idoso são ainda obscuros, mas são provavelmente múltiplos: mudança na composição do corpo (obesidade), hiperglicemia, e redução da dopamina e nora-adrenalina do cérebro, todos os anteriores aumentando secreção de somatostatina e diminuindo secreção de GHRH pelo hipotálamo. “Somatopausa” também é observada em outros mamíferos, como ratos (SONNTAG et al., 1980). Realmente, ratos mostram uma redução progressiva de responsividade pituitária a GHRH com o avançar da idade depois de nascimento (CEDA et al., 1986; SONNTAG; HYLKA; MEITES, 1983). De forma interessante, Korytko, Zeitler e Cutter (1996)

recentemente acharam que a concentração do mRNA de GHRHR em pituitárias de ratos em idade-dependente: é mais alto durante a vida intra-uterina, declina durante o período perinatal, aumento no tempo da maturação sexual e declina novamente depois.

Sabe-se que, após o pico puberal, ocorre um declínio progressivo na atividade do eixo GH/IGF-1 com o passar da idade, sendo que, acima dos 60 anos, muitos indivíduos normais apresentam secreção de GH nas 24 horas, indistinguível da dos pacientes adultos com deficiência de GH por lesões hipotálamo-hipofisárias (DGHA). Este fenômeno fisiológico apresenta paralelo com vários aspectos clínicos encontrados na DGHA, tais como aumento da gordura visceral e subcutânea, redução da massa magra, osteoporose, distúrbios neuropsicológicos e psiquiátricos.

2.7 Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento (DIGH)

A deficiência isolada do hormônio de crescimento (DIGH) é estimada em 1/3480 a 1/10000 nascimentos vivos. Enquanto a maioria desses casos é esporádica, e causados por uma variedade de danos hipotalâmicos ou pituitários, isto, sugere que causas genéticas podem explicar melhor que os defeitos estruturais a DIGH em uma grande porção de casos. A incidência de DIGH familiar, definida com o aparecimento de DIGH em dois parentes de primeiro grau, é controversa e tem sido estimada em 5 a 30% dos casos. Em Itabaianinha estudamos o maior grupo com DIGH familiar, com 105 indivíduos afetados (SOUZA, 1997).

A deficiência parcial ou completa de GH é uma das causas mais importantes da baixa estatura em crianças. O paciente típico com DIGH é pequeno (estatura inferior a $-2DP$), proporcional, com discreto sobrepeso e adiposidade abdominal, voz e fâcies características (“aparência de anjo barroco”, “nariz em cela” e “voz em falsete”). O atraso da idade óssea que reflete o nível de maturação fisiológica da criança é um achado frequente. Várias crianças podem apresentar convulsões devido a hipoglicemia.

De acordo com Savage et al. (1993), a DIGH Familiar e Não Familiar fez diagnóstico diferencial com a Síndrome de insensibilidade ao GH descrita pela primeira vez em 1966, por Laron, em 3 irmãos israelitas, no Paquistão, e tem origens autossômicas recessiva, caracterizando-se por severo retardo no crescimento e níveis séricos do GH normais ou altos e com IGF-I baixos. As síndromes de insensibilidade ao GH (IGH) classificam-se em primária e secundária. A primária Síndrome de Laron é uma deficiência nos receptores do GH

e a secundária é adquirida e muitas vezes de forma transitória, associando-se a desnutrição e doenças do fígado.

Segundo Nishi et al. (1990), os níveis séricos de GH e o padrão de herança classificam a DIGH em 4 tipos: IA – autossômica recessiva com GH sérico ausente. IB- autossômica recessiva com GH sérico diminuído. II- autossômica dominante com GH sérico diminuído. III- recessiva ligada ao sexo com GH sérico diminuído. Eventualmente podem ser detectadas novas mutações. A mutação de Itabaianinha se enquadra no tipo IB.

A DIGH IA é a forma mais severa de DIGH, com retardo de crescimento já aparente nos 6 primeiros meses de vida, associado por vezes com quadros de hipoglicemia. As crianças respondem bem inicialmente ao tratamento com GH exógeno, mas muitas delas desenvolvem anticorpos anti-GH que irão bloquear a ação do hormônio recombinante e a boa resposta terapêutica (COGAN; PHILLIPS, 1998; PHILLIPS, 1999).

Na DIGH IB os indivíduos têm baixa estatura, níveis plasmáticos de GH baixos, porém detectáveis e uma boa resposta ao tratamento com GH exógeno, sem desenvolvimento de anticorpos bloqueadores. A explicação mais provável para estas diferenças com a DIGH IA é que os defeitos genéticos na DIGH IB resultam de moléculas mutantes de GH com uma sequência de aminoácidos distinta do GH normal (COGAN; PHILLIPS, 1998; PHILLIPS, 1999).

Na DIGH II os indivíduos têm sempre um dos pais com o problema e a severidade das manifestações clínicas varia entre os parentes afetados. Os níveis de GH são baixos, mas, detectáveis e respondem bem ao tratamento com GH exógeno. Os indivíduos são heterozigotos e as mutações são “dominantes negativas”, isto é, o alelo mutante prevalece sobre o não afetado e consegue interferir na síntese e/ou liberação da molécula normal do GH (COGAN; PHILLIPS, 1998). Os indivíduos DIGH tipo II apresentam níveis séricos de GH baixos, mas detectáveis, geralmente com boa resposta ao tratamento com GH (BOGUSZEWSKI, 2001).

Já na DIGH tipo III as manifestações clínicas costumam ser distinta nas diferentes famílias e está ligada ao cromossomo X (COGAN; PHILLIPS, 1998). A DIGH tipo III apresenta manifestações clínicas distintas nas diferentes famílias. Alguns pacientes podem apresentar agamaglobulinemia associada à deficiência de GH, sugerindo que o tipo III de DIGH pode se dever a defeitos em genes contíguos ou a mutações em múltiplos *locus* (BOGUSZEWSKI, 2001).

A primeira mutação no gene do GHRHR levando a DIGH tipo IB foi descrita em três famílias do subcontinente indiano, das quais a mais conhecida é a dos “Anões de Sindh” (MAHESHWARI et al., 1998). Nessa família encontrou-se uma a mutação GAG→TAG no códon 72, correspondente ao aminoácido residual 50 na proteína madura do GHRHR. O “nanismo de Sindh” representa o homólogo humano do *little mouse* descrito em 1976, em que a mutação no GHRHR abole o sítio de ligação para o GHRH, o que leva a uma resistência a eles, hipoplasia pituitária e deficiência isolada de GH (BAUMANN; MAHESHWARI, 1997). O segundo tipo de mutação do GHRHR foi descrito em 105 indivíduos da região de Carretéis e arredores, em Itabaianinha-SE. Trata-se de uma mutação homozigótica tipo *splice* no início do íntron I no sítio doador de emendas, onde a G (Guanina) foi substituída pela A (Adenina) (IVS1+1 G→A). Essa mutação impede a síntese de RNA mensageiro (mRNA) do GHRHR, resultando em um receptor de GHRH completamente truncado, o que conduz a uma deficiência severa de GH (HAYASHIDA et al., 2000; SALVATORI et al., 1999; 2001b; 2002b). Estudos sobre DIGH em Itabaianinha foram publicados envolvendo: genética, diagnóstico, história natural, conseqüências metabólicas, cardiovasculares (AGUIAR-OLIVEIRA et al., 1999; BARRETO et al., 1999; BARRETO FILHO et al., 2002; GLEESON et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006; SALVATORI et al., 1999; SALVATORI et al., 2002a), resposta de GH a estímulos com secretagogos (GONDO et al., 2001; SALVATORI et al., 2006) e morfologia da hipófise (OLIVEIRA et al., 2003) e tireóide (ALCÂNTARA et al., 2006).

Em adultos, a DIGH caracteriza-se clinicamente por: alterações na composição corporal com redução da massa magra, da água corporal total, da densidade mineral óssea, e aumento dos níveis de leptina e da massa gorda (obesidade central), contribuindo para a resistência insulínica (AMATO et al., 1993; BARRETO et al., 1999; JOHANSSON et al., 1996); alterações no perfil lipídico traduzidas por aumento de colesterol total, triglicérides, lipoproteína de baixo peso molecular (LDL), apolipoproteína B e redução da lipoproteína de alto peso molecular (HDL) (DAVIDSON, 1987); pressão sistólica elevada (BARRETO-FILHO et al., 2002), aumento do fibrinogênio e da atividade do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), principalmente na DGH iniciada na infância. Somados à obesidade central e às alterações lipídicas características da DGH, associa-se a uma maior morbimortalidade cardiovascular (JOHANSSON et al., 1993; ROSEN; BENGTTSSON, 1990). Apresentam outras características como pele fina e seca com redução da sudorese, redução da capacidade física e alteração do bem-estar psicológico (humor deprimido, fadiga e diminuição da memória) (SOUZA et al., 1999).

2.8 Heterozigose na DIGH

A estatura da população em geral é determinada pela hereditariedade. Esta herança é poligênica, mas, nem todos os genes envolvidos são conhecidos (CARAKUSHANSKY et al., 2003). Sabe-se também que a estatura final de um indivíduo é atingida no final da puberdade e, além de fatores hereditários a altura dos pais e também outros ancestrais pode ser influenciada por fatores ambientais durante a gestação, infância e puberdade. Até o momento a totalidade dos genes que contribuem para o crescimento normal ainda não é conhecida e, várias causas de baixa estatura, com padrão de herança mendeliana foram atribuídas a mutações em genes que favorecem o crescimento. O catálogo *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, 2006) contém mais de 400 doenças hereditárias que causam baixa estatura, e tem sido uma ferramenta útil de pesquisa.

Sabe-se atualmente que 1% a 5% das crianças com baixa estatura idiopática pode apresentar mutações heterozigóticas no gene do receptor do GH (GHR), causando uma síndrome de resistência parcial ao GH (ATTIE, 2000; WOODS et al., 1997). Como salientado anteriormente, as mutações no receptor do GHRH são responsáveis por pelo menos 10% das causas genéticas de deficiência isolada de GH, sendo algumas mutações homozigotas recessivas e outras heterozigotas compostas (SALVATORI et al., 2001b). Em analogia com a heterozigose para a mutação do GHR, mutações heterozigóticas no gene de GHRHR, causando uma redução de 50% da concentração deste receptor, poderiam estar associadas com déficit estatural decorrente de deficiências moderadas de GH e IGF-I. Este fenótipo parcial foi sugerido nos indivíduos heterozigotos para a mutação E72X no gene do receptor do GHRH no Paquistão (BAUMANN; MAHESHAWARI, 1997).

A altura e os níveis de IGF-I apresentam grande variabilidade em diferentes grupos etários. Este fato torna difícil a verificação do impacto da heterozigose, a partir de descrições de famílias isoladas. Em Itabaianinha existem mais de 2000 heterozigotos para a mutação IVS1+1G→A constituindo-se, provavelmente, na única possibilidade de verificar a existência de um fenótipo parcial na heterozigose para mutações no gene do GHRHR.

2.9 Proteína C Reativa alta sensibilidade (PCRas) e Lipoproteína (a) (LP(a))

2.9.1 Proteína C Reativa alta sensibilidade (PCRas)

A medida de PCRas é útil como marcador biológico da inflamação e tradicionalmente é utilizada para diagnóstico e monitorização das doenças infecciosas e auto-imunes (ROBERTS et al., 2000). A alta sensibilidade da PCRas pode ser usada como um marcador de risco independente para a identificação de indivíduos com risco para doença cardiovascular futura. A PCRas é um marcador inflamatório validado como preditor de risco cardiovascular em indivíduos aparentemente saudáveis (RIDKER, 2003). Medidas de PCRas, quando usadas junto com avaliação de laboratório e clínica tradicional de síndromes coronarianas agudas, podem ser útil como um marcador independente para eventos reincidentes, em pacientes com doença coronariana estável ou síndromes coronarianas agudas.

Em vários estados da doença que resultam em dano de tecido, infecção ou inflamação aguda, valores de PCRas podem subir além do normal. Como valores de PCRas elevados sempre são associados com mudanças patológicas os ensaios de PCRas fornecem informações úteis para a diagnose, terapia e monitoramento de processos inflamatórios e associados à doença cardíaca. Aumentos dos valores de PCRas não são específicos e não deveriam ser interpretados sem uma história clínica completa. Estudos mostraram que a medida de PCRas através de ensaios de alta sensibilidade são um preditor independente de forte risco para futuras doenças cardiovascular e vascular periférica. A PCRas é bastante elevada nos indivíduos com DIGH de Itabaianinha (OLIVEIRA et al., 2006). Dados ainda não publicados demonstraram que a DIGH e o IGF-I são os principais preditores da elevação da PCRas (MARQUES-SANTOS, 2006).

2.9.2 Lipoproteína (a) (Lp (a))

A doença coronariana é a causa principal de morte no E.U.A. e muitos outros países ocidentais industrializados. A maioria dos casos de doença de coração é causada fundamentalmente pela aterosclerose a acumulação de depósitos gordurosos nas paredes da artéria. Algumas causas de aterosclerose e doença do coração estão agora claras. Pressão alta,

diabete, fumo e outros fatores parecem aumentar a probabilidade de doença do coração. Dietas ricas em colesterol e gorduras saturadas contribuem à elevação dos níveis de lípidos no sangue e para a progressão da aterosclerose. A concentração de lipoproteínas, também é outro fator de risco importante. Descoberto por Berg em 1963, a Lp (a) tem papel importante nesta patologia. A medida da Lp (a), junto com outros testes é importante para avaliar a aterosclerose e doença cardiovascular específica em populações. A Lp (a) é composta de duas proteínas, APO (a) [Apolipoproteína (a)] e APO B-100, que são ligados por pontes de dissulfeto. APO (a) é uma proteína glicosilada única na Lp (a); APO B-100 é achada em outras lipoproteínas incluindo LDL (TIETZ, 1999).

A dosagem da Lp (a) tem significado clínico semelhante à dosagem do LDL colesterol embora menos dependente de dieta e efeitos farmacológicos e provavelmente associados a fatores genéticos.

3 OBJETIVOS

Tendo em vista o grande número de Heterozigotos na população de Itabaianinha, resolvemos estudar as repercussões da heterozigose nestes indivíduos. Desta forma o objetivo geral do presente trabalho é:

- Verificar a existência de fenótipo parcial dos heterozigotos para a mutação IVS1+1 G→A no receptor do GHRH em adultos de Itabaianinha-Se.

E os objetivos específicos são:

- Verificar a presença de déficit estatural nos heterozigotos adultos para a mutação IVS1+1 G→A no gene do receptor do GHRH.
- Verificar se a heterozigose para a referida mutação está associada à redução de níveis séricos de IGF-I nos indivíduos adultos.
- Estudar a composição corporal nos indivíduos adultos heterozigotos de Itabaianinha.
- Estudar o perfil metabólico e inflamatório nos indivíduos adultos heterozigotos de Itabaianinha.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 População Estudada

O Município de Itabaianinha situa-se na zona oeste do Centro-Sul do Estado de Sergipe, possui cerca de 35 mil habitantes e área territorial de 478 km², distando da capital Aracaju 154 km. A agricultura e as olarias artesanais são as atividades de sustento das famílias. Embora oriundos do meio rural, a grande maioria dos anões e seus familiares estão em fase de urbanização. A DIGH dessa região é uma doença autossômica recessiva com alto grau de consangüinidade (SALVATORI et al., 1999; SOUZA et al., 2004). A frequência fenotípica da DIGH em Itabaianinha (FIGURA 5) é bastante elevada, chegando a 1:279. Torna-se maior ainda se considerarmos Carretéis, berço dos anões, é um aglomerado rural a 14 km ao norte da sede do município (composto de treze povoados), onde chega a 1:32 (SOUZA, 1997).

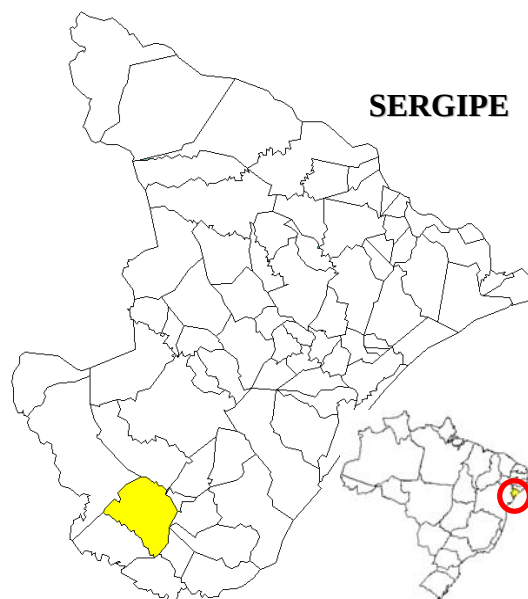


Figura 5. Itabaianinha, Sergipe, Brasil.

Assumindo que a dispersão normal de altura de um indivíduo adulto na população brasileira é semelhante à observada na população nos Estados Unidos (HAMILL et al., 1979), calculamos que para descobrir uma diferença de altura de 5 centímetros entre HTZ (WT/MT) e HMZ (WT/WT) nos membros de uma família com um poder de 80%, precisaríamos de 75 indivíduos por grupo.

A Figura 6 mostra uma família da comunidade de Itabaianinha com uma mãe, filhos e neto.



Figura 6. Família da comunidade de Itabaianinha, Sergipe, Brasil.

O número de heterozigotos foi estimado pelo teorema de Hardy-Weinberg como a seguir:

Fórmula: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$
--

Onde:

p: frequência do gene normal

q: frequência do gene com a mutação IVS1+1G→A

p^2 : frequência do genótipo dos homozigotos normais

2pq: frequência do genótipo dos heterozigotos

q^2 : frequência do genótipo dos homozigotos afetados. Em Itabaianinha é de 1 para 279 indivíduos, ou seja, de 0,36%

q^2 : 0,36%: 0,0036

q: 0,06

Como só existe a possibilidade de ter o gene normal ou o gene alterado:

$p+q=1$

Se q: 0,06, p: 0,94

Então: p^2 : 0,8836 ou 88,36%,

2pq: 0,1128 ou 11,28%

Portanto, o número estimado de heterozigotos para a população de Itabaianinha de 19821 habitantes é de 2236 indivíduos.

4.2 Métodos

4.2.1 Pré-Seleção

Foi realizado um estudo transversal em 153 indivíduos. Apresentaram-se para triagem 240 indivíduos parentes de anões de 1º, 2º e 3º graus foram incluídos nesta primeira etapa que constituía a genotipagem destes indivíduos para posterior inclusão nos grupos dos Heterozigotos (WT/MT) e Homozigotos normais (WT/WT). Todos estes indivíduos foram recrutados através da “Associação do Crescimento Físico e Humano de Itabaianinha” sendo solicitados aos anões que seus parentes comparecessem para uma reunião prévia onde foram

explicados os objetivos do estudo e assinados os Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos pelos critérios de inclusão pré-estabelecidos. Os critérios de inclusão eram:

- Indivíduos entre 25 a 75 anos de idade;
- Parentes de anões em primeiro, segundo e terceiro grau (primeiro grau seriam os pais, filhos e irmãos; segundo grau os avós, netos, tios e sobrinhos e o terceiro grau primos, bisavós e bisnetos);
- Ausência de história de doenças que influenciam a estatura final (mal-absorção, doença renal, uso de corticóide).

Foi solicitado que todos comparecessem em jejum de 12 horas. Depois de ser entrevistado o indivíduo começava a cumprir as etapas estabelecidas para o protocolo padronizado para este estudo.

Três indivíduos HTZ foram diagnosticados com Hipotireoidismo primário (por aumento moderado do TSH) sendo incluídos unicamente na análise da altura.

4.2.2 Coleta do DNA e Genotipagem

Foi colhido o DNA de todos os indivíduos através de cotonete bucal da seguinte maneira: O indivíduo era instruído para lavar a boca 03 vezes e em seguida a pessoa, treinada para coleta, introduzia na cavidade oral do indivíduo, um cotonete com borda em escova e fazia uma fricção suave na face interna da bochecha. Em seguida este cotonete era acondicionando no invólucro, que já deveria estar identificado com o nome do indivíduo, data e lado da coleta e só então era lacrado e acondicionado em refrigeração para posterior envio para Universidade Johns Hopkins/EUA. Foram colhidos dois cotonetes de cada indivíduo, um do lado direito e um do lado esquerdo. A Genotipagem através do produto de PCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular de Dr Roberto Salvatori na Universidade Johns Hopkins, em Baltimore/EUA, pela técnica de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), onde o DNA é amplificado, os indivíduos Homozigotos normais (WT/WT) apresentam uma única banda, os Afetados (MUT/MUT) uma única banda mais lenta e os Heterozigotos (WT/MT) quatro bandas, a do alelo normal e a do alelo mutante e duas bandas mais lentas que representam heterodímeros gerados pelo anelamento das fitas anterior e posterior dos alelos de G e A durante a amplificação na reação de PCR (SALVATORI et al., 1999) (FIGURA 7).

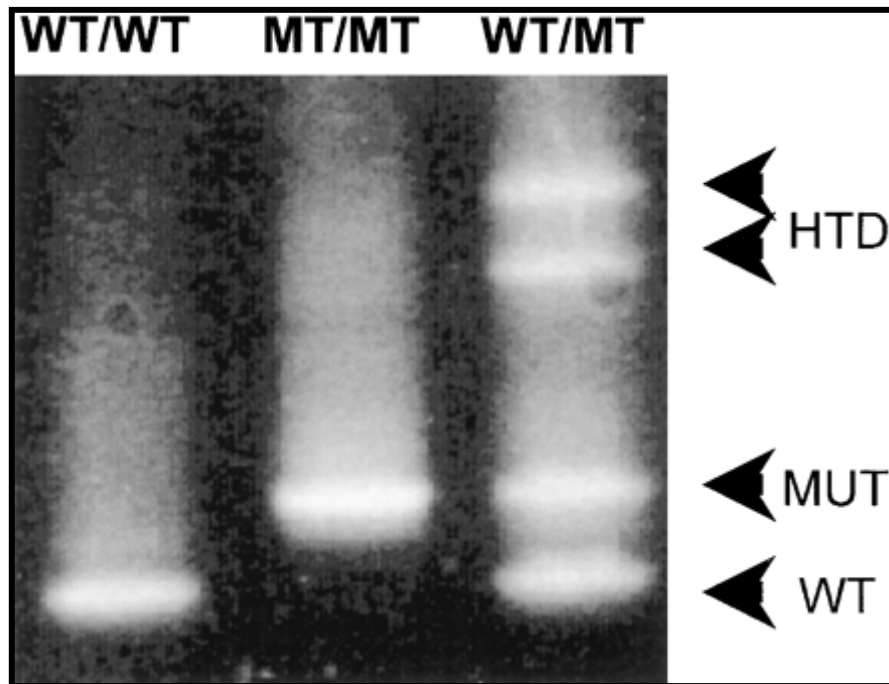


Figura 7: WT/WT apresentam uma única banda, MUT/MUT uma única banda mais lenta e os WT/MT quatro bandas, a do alelo normal e a do alelo mutante e duas bandas mais lentas que representam heterodímeros gerados pelo anelamento das fitas anterior e posterior dos alelos de G e A durante a amplificação do PCR (SALVATORI *et al*, 1999).

Foram identificados 76 indivíduos HTZ (WT/MT) e 77 HMZ (WT/WT) pareados para sexo e idade, que foram convidados em grupos de 20 para as etapas seguintes, realizados durante oito dias consecutivos.

4.2.3 Dados Antropométricos

No grupo de 240 voluntários foi achado 76 indivíduos WT/MT. Entre os indivíduos que participaram do estudo identificamos 77 WT/WT que foram pareados para sexo e idade, o mais próximo possível.

Foram anotados: sexo, idade (anos), peso (Kg), altura (m). Foi calculado o escore de desvio-padrão da altura para a idade (EDP a/i) de cada indivíduo de ambos os grupos, utilizando os dados do NCHS – *National Center of Health Statistics* e índice de massa corpórea foram calculados usando a fórmula: $\text{Peso}/(\text{Altura})^2 \text{ kg/m}^2$. A Superfície corporal (m^2) foi calculada usando-se a fórmula: $w^{0,425} \times h^{0,725} \times 71,84 \times 10^{-4}$, onde w é o peso em quilogramas, e h é a altura em centímetros (HAMILL *et al.*, 1979). Para determinação do peso

usamos uma balança digital da marca G.TECH, e as alturas foram medidas em antropômetro vertical portátil, com o indivíduo descalço sobre a plataforma, calcanhares juntos, nádegas e ombros em contato com o eixo vertical do instrumento e foi exercida leve pressão no processo mastóide para cima com a média de 03 medidas consecutivas realizada pela mesma pessoa. (BARRETTO et al., 1999; BARRETO-FILHO et al., 2002) (APÊNDICE 2). Foram medidos tríceps (mm), bíceps (mm), subescapular (mm), supra- ilíaco (mm), cintura (cm) e quadril (cm). O equipamento utilizado para estas medidas foi um adipômetro da marca Lange Skin fold Caliper (Cambridge, Md) do lado direito do corpo. Foi calculada a relação cintura/quadril para todos os indivíduos (DU BOIS, D.; DU BOIS, E., 1989).

Procedimentos para medidas das pregas cutâneas:

- Identificar e marcar os locais a serem medidos, sempre no hemisfério direito do avaliado.
- Destacar o tecido adiposo do tecido muscular utilizando os dedos polegar e indicador da mão esquerda, e segurar a prega cutânea até que a leitura da medida tenha sido realizada.
- Introduzir as hastes do compasso de dobras cutâneas (adipômetro) aproximadamente 1 centímetro abaixo dos dedos que estão segurando a prega, de forma que as mesmas fiquem perpendiculares à prega cutânea.
- Soltar completamente as mandíbulas do compasso (adipômetro), para que todas as pressões de suas molas possam atuar sobre o tecido medido.
- Executar a leitura da medida no máximo dois a três segundos após ter introduzido o compasso (adipômetro).
- Repetir todo esse processo três vezes não consecutivas, ou seja, medem-se todas as pregas cutâneas escolhidas, depois se mede novamente, e então mais uma vez.
- Adotar o valor mediano (intermediário) como sendo a medida da prega cutânea.
- Quando, entre o maior e o menor valor obtido em uma prega cutânea, houver uma diferença superior a 5%, deverá ser realizada uma nova série de medidas.
- A execução de medidas de pregas cutâneas pode ser feita em vários lugares do corpo:
 - Tríceps – É a medida na face posterior do braço, paralelamente ao eixo longitudinal, no ponto que compreende a metade da distância entre a borda súpero-lateral do acrômio e o olecrano.
 - Bíceps – É a medida no eixo longitudinal do braço, na sua face anterior, no ponto de maior circunferência aparente do ventre muscular do bíceps.

- Subescapular – A medida é executada obliquamente em relação ao eixo longitudinal, segundo a orientação dos arcos costais, sendo localizada a dois centímetros abaixo do ângulo inferior da escápula.
- Supra-iliaca – Foi obtida obliquamente em relação ao eixo longitudinal, na metade da distância entre o último arco costal e a crista ilíaca, sobre a linha axilar média. É necessário que o avaliado afaste o braço para trás para permitir a execução da medida.
- Cintura – Foi obtida durante a expiração, no ponto médio entre a espinha ilíaca ântero-superior e o arco costal inferior.
- Quadril - Medido na região sobre o trocânter maior de cada fêmur passando pela parte mais saliente das nádegas.

A Percentagem de Massa Gorda (% MG) e a Massa Gorda (MG em Kg) foram medidas usando-se o método do infravermelho, utilizando o aparelho FUTREX 5000NIR (BARRETO-FILHO et al., 2002; BRODIE; ESTON, 1992), técnica que tem, como princípio básico, a colocação de um transdutor de fibra ótica tangencial ao bíceps do indivíduo para medir a energia refletida na região em duas diferentes frequências. Uma equação de regressão múltipla é empregada para usar a informação em combinação com outros dados antropométricos para prever a composição corporal (WHO, 1988).

4.2.4 Dados Laboratoriais

Foi colhido 25 ml de sangue de cada indivíduo (BD Vacutainer). Era perguntado ao indivíduo se estava em jejum, fazíamos a glicemia digital, com um Glicosímetro ACCU-CHEK Advantage, da Roche e o restante de sangue era dividido em: 01 tubo de sangue total (BD Vacutainer K₃ EDTA, 5 ml) e 03 tubos para soro (BD Vacutainer SST Gel & Clot Activator, 6 ml). Os tubos eram identificados com o número de ordem de cada indivíduo (número da entrevista) e também seu nome completo. Estes tubos eram então acondicionados em um isopor mantido sob refrigeração. Os exames de sangue realizados foram os seguintes:

O IGF-I (ng/mL) (IRMA-imunoradiometria com dupla extração). O método apresenta sensibilidade de 0,8 ng/ml (Diagnostic Systems Laboratories 5600, Inc., Webster, Texas, EUA). O erro intra e extra ensaio são respectivamente 2,25% e 2,6%. O EDP do IGF-I sérico foi calculado subtraindo-se a média do nível do IGF-I sérico pela idade individual e dividindo-se este valor pela divergência padrão da idade fornecida na bula do fabricante.

A Glicemia (mg/dl) foi realizada na polpa digital através de um Glicosímetro ACCU-CHEK Advantage, da Roche.

O Colesterol Total (mg/dl), Triglicérides (mg/dl) foram medidos através do método colorimétrico enzimático Trinder (TRINDER, 1969).

O HDL-Colesterol (mg/dl), lipoproteína de alta densidade foi usado o método de ácido phosphotungstênio / magnésio e LDL-Colesterol (mg/dl), lipoproteína de baixa densidade, foi calculado indiretamente pela fórmula de Friedwald a seguir ► (LDL colesterol = colesterol total – HDL colesterol – Triglicérides /3) (BETTERIDGE; MORREL, 1998).

A Insulina (μ IU/mL) foi medida por ensaio quimioluminescente imunoradiométrico DPC – Diagnostic Products Corporation Corporate Offices 5210 Pacific Concourse Drive Los Angeles, CA), com sensibilidade de 2 μ IU/mL e o erro intra e extra ensaio respectivamente de 4,26% e 5,43%. O HOMA_{IR} (*Homeostasis model assesment of insulin resistance*) foi calculado mediante a fórmula: insulina (microU/mL) x glicemia (mMol/L) / 22,5; conversão da glicemia: mMol/L = 0,05551 x mg/dl (LANSANG; WILLIAMS; CARROLL, 2001).

A PCRas (mg/l) e Lp (a) (mg/dl) foram dosadas pelo método Nefelométrico (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany, com o kit CardioPhase hsCRP da Dade Behring e Image Immunochemistry System Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). As sensibilidades de PCRas e Lp (a) eram respectivamente 0,175 mg/l e 2 mg/dl. O erro intra e extra ensaio foram 3,5% e 3,4% e 5,0% e 6,5%, respectivamente.

A Insulina, PCRas e IGF-I foram dosados após terem sido estocados a –20°C. A Lp (a) foi dosada após ter sido estocada a 4°C. Todos os testes foram dosados de uma só vez após o final da coleta. Lipidogramas e Glicose eram dosados diariamente no Laboratório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

O estudo foi aprovado pelo CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, processo nº 029/2002 e pelo CONEP - Comissão Nacional de Ética e Pesquisa, ofício nº 1063 CONEP/CNS/MS (ANEXO 1). Os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido dispondo-se a participação e realização dos exames necessários (APÊNDICE 1). Os exames foram realizados entre março e outubro de 2006.

4.3 Análise Estatística

Os valores foram expressos em média e desvio padrão. Foram utilizados testes para amostras independentes utilizando o Teste *t*. Todos os cálculos estatísticos foram feitos através do programa SPSS/PC (Statistical Product and Service Solutions Inc., Chicago, IL) for Windows, versão 11.5 (2002). Insulina PCRas, Lp (a) e HOMA_{IR} foram transformados em logaritmo decimal antes das análises. Para avaliar o possível efeito da idade nas variáveis usou-se ANOVA one-way com teste de Bonferroni. Estimamos um P de 0,05 ou menos para ser considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 População Estudada

Os indivíduos foram separados em dois grupos: 76 indivíduos HTZ (WT/MT) e 77 indivíduos HMZ (WT/WT). Foram pareados para sexo e idade, conforme Tabela 1. 66,6% destes indivíduos estavam abaixo de 50 anos.

Tabela 1. Estratificação dos Heterozigotos (WT/MT) e Homozigotos Normais (WT/WT) segundo sexo e idade.

Idade	(WT / MT) 76		(WT / WT) 77		p
	Homem	Mulher	Homem	Mulher	
25 - 30 anos	10	09	07	04	0,223
31 - 40 anos	04	11	03	12	0,402
41 - 50 anos	03	13	07	18	0,176
51 - 60 anos	05	12	06	13	0,531
61 - 70 anos	03	04	01	04	0,290
71 - 75 anos	0	02	01	01	NE
TOTAL	25	51	25	52	0,497

Nota: p = é a probabilidade de percentagens de diferença de grupos por sexo em cada intervalo da idade; NE = não exequível.

Como esperado, houve uma representação maior dos indivíduos que foram parentes em primeiro grau de indivíduos com DIGH no grupo WT/MT (50,2 x 7,8 %, $p < 0,0001$). Nenhuma diferença na percentagem de parentes de segundo grau foi observada (19,7 % x 27,21 %). Os dois grupos foram similares na distribuição do sexo em todos os intervalos etários. A percentagem de cada categoria de idade foi similar em ambos os grupos com exceção de uma representação maior de indivíduos nos jovens (25 – 35 anos) no grupo WT/MT comparado com WT/WT (25 % x 14 %, $p = 0,009$). Nós mantivemos este grupo porque a idade não influencia estatura final e por definição IGF-I é ajustado pela idade. As diferenças significativas entre os dois grupos seriam mantidas se este intervalo fosse removido.

5.2 Dados Antropométricos e Níveis de IGF-I

Na Tabela 2, estão relacionados todos os dados Antropométricos e níveis de IGF-I e o Escore Desvio Padrão do IGF-I (média $\pm$ Desvio Padrão) dos 76 Heterozigotos (WT/MT) e dos 77 Homozigotos Normais (WT/WT). Não há nenhuma diferença na altura, EDP IGF entre os dois grupos. O mínimo e o máximo da altura nos dois grupos são HTZ (1,36 e 1,84 m) e HMZ (1,35 e 1,82 m). O Peso, IMC e Superfície Corporal dos HTZ eram menores que HMZ ($p = 0,003$; $0,002$ e $0,026$, respectivamente). Valores individuais estão relacionados nos anexos.

Tabela 2. Dados Antropométricos e Escore do Desvio Padrão do IGF-I sérico para idade (EDP-IGF-I/i) (Média $\pm$ Desvio Padrão) em indivíduos Heterozigotos para a mutação no gene do GHRHR (WT / MT) e indivíduos Homozigotos normais (WT/WT).

Características	WT/MT	WT/WT	P
Idade (anos)	43,76 $\pm$ 13,70 (n= 76)	45,03 $\pm$ 11,89 (n= 77)	0,539
Altura (m)	1,57 $\pm$ 0,098 (n= 76)	1,57 $\pm$ 0,977 (n= 77)	0,915
EDPa/i	-1,64 $\pm$ 1,27 (n= 76)	-1,66 $\pm$ 1,23 (n= 77)	0,922
Peso (kg)	59,56 $\pm$ 11,18 (n= 73)	65,85 $\pm$ 14,07 (n= 77)	0,003
IMC (kg/m ²)	23,91 $\pm$ 4,34 (n= 73)	26,35 $\pm$ 4,87 (n= 77)	0,001
Superfície Corporal	1,59 $\pm$ 0,17 (n= 73)	1,66 $\pm$ 0,20 (n= 77)	0,030
EDP IGF-I/i	-0,63 $\pm$ 1,29 (n= 72)	-0,93 $\pm$ 1,05 (n= 77)	0,119

Nota: n= número de indivíduos para cada variável; EDPa/i= Escore desvio padrão altura/idade; IMC= Índice da massa corpórea (Kg/m²); P= nível descritivo de probabilidade média $\pm$ desvio padrão; EDP IGF-I/i = Escore desvio padrão do IGF-I (IGF I -insulin like growth factor) para idade.

Se analisarmos os dados por sexo, as diferenças permanecem para peso corporal e para IMC.

5.3 Pregas Cutâneas e Composição Corporal

As medidas das pregas cutâneas como cintura, quadril e a massa magra Kg (MM em Kg), estão reduzidos no grupo HTZ em comparação com o grupo HMZ (TABELA 3). A percentagem de massa gorda (% MG) e a relação cintura/quadril são semelhantes nos dois grupos.

Tabela 3. Média da Composição Corporal (Média $\pm$ Desvio Padrão) em indivíduos Heterozigotos para a mutação no gene do GHRHR (WT/MT) e em indivíduos Homozigotos normais (WT/WT).

Variáveis	WT/MT	WT/WT	P
% Massa Gorda	20,53 $\pm$ 8,58 (n= 67)	21,95 $\pm$ 9,02 (n= 76)	0,336
Massa Gorda Kg	12,40 $\pm$ 6,32 (n= 72)	14,53 $\pm$ 7,23 (n= 76)	0,059
Massa Magra (Kg)	47,59 $\pm$ 10,03 (n= 72)	51,41 $\pm$ 12,16 (n= 76)	0,038
Triceps (mm)	16,70 $\pm$ 7,25 (n= 67)	19,83 $\pm$ 8,40 (n= 77)	0,019
Biceps (mm)	11,15 $\pm$ 6,49 (n= 67)	14,66 $\pm$ 7,74 (n= 77)	0,004
Sub - escapular (mm)	18,78 $\pm$ 7,44 (n= 67)	22,80 $\pm$ 9,31 (n= 77)	0,005
Supra ilíaca (mm)	17,52 $\pm$ 8,97 (n= 67)	22,20 $\pm$ 9,50 (n= 77)	0,003
Cintura (cm)	83,14 $\pm$ 11,45 (n= 72)	87,83 $\pm$ 12,17 (n= 77)	0,017
Quadril (cm)	94,81 $\pm$ 9,92 (n= 72)	98,48 $\pm$ 9,05 (n= 76)	0,020
Relação Cintura/Quadril	0,88 $\pm$ 0,078 (n= 72)	0,88 $\pm$ 0,069 (n= 76)	0,446

Nota: n= número de indivíduos para cada variável; P= nível descritivo de probabilidade; média $\pm$ desvio padrão.

No grupo HMZ não observamos nenhuma diferença significativa em nenhuma variável entre os grupos da idade. Nos grupos dos HTZ a % MG e a MG em Kg foram menores nos grupos das idades de 25-35 versus 40-50 anos (14,46 % $\pm$ 10,13 versus 27,67 % $\pm$ 8,3, p = 0,01; 9,47 Kg $\pm$ 6,67 versus 16,76 Kg $\pm$ 7,76, p = 0,047 respectivamente).

5.4. Dados Laboratoriais

Os dados Bioquímicos são mostrados na Tabela 4. A Insulina e o HOMA_{IR} são mais baixos no grupo HTZ em comparação com o grupo HMZ ($p = 0,004$ e $0,014$). Nos outros parâmetros não houve diferença entre os dois grupos.

Tabela 4. Dados Bioquímicos (Média $\pm$ Desvio Padrão) em indivíduos Heterozigotos para a mutação de GHRHR (WT/MT) e em indivíduos Homozigotos normal (WT/WT). HOMA_{IR} = Modelo Homeostático de Resistência à Insulina. Lp (a) = Lipoproteína (a). PCRas = Proteína de C-Reativa alta sensibilidade.

Variáveis	WT/MT	WT/WT	P
Colesterol Total (mg/dl)	184,79 $\pm$ 41,17 (n= 72)	179,77 $\pm$ 28,52 (n= 77)	0,392
LDL colesterol (mg/dl)	111,56 $\pm$ 30,79 (n= 71)	109,06 $\pm$ 22,81 (n= 77)	0,578
HDL colesterol (mg/dl)	45,41 $\pm$ 11,40 (n= 72)	47,16 $\pm$ 7,05 (n= 77)	0,258
Triglicerídes (mg/dl)	131,81 $\pm$ 107,11 (n= 72)	119,35 $\pm$ 46,88 (n= 77)	0,254
Glicemia de Jejum (mg/dl)	92,84 $\pm$ 11,67 (n= 72)	93,69 $\pm$ 9,78 (n= 76)	0,631
Insulina ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	3,06 $\pm$ 2,45 (n= 69)	4,09 $\pm$ 2,73 (n= 75)	0,004
HOMA_{IR}	0,71 $\pm$ 0,59 (n= 69)	0,98 $\pm$ 0,67 (n= 75)	0,014
Lp (a) (mg/dl)	30,78 $\pm$ 47,03 (n= 65)	21,03 $\pm$ 29,86 (n= 74)	0,750
PCRas (mg/L)	3,32 $\pm$ 7,41 (n= 65)	2,30 $\pm$ 2,34 (n= 75)	0,973

Nota: n= número de indivíduos para cada variável; P= nível descritivo de probabilidade; média $\pm$ desvio padrão; HOMA_{IR} modelo homeostático de resistência à insulina; LP (a)= Lipoproteína (a); PCRas= Proteína C Reativa alta sensibilidade.

6 DISCUSSÃO

Mutações do gene do GHRHR são causa relativamente freqüente de deficiência isolada de GH. O número de portadores HTZ é obviamente maior que os HMZ afetados e gera a pergunta se há um fenótipo clínico associado com a falta de um alelo funcional de GHRHR. Um trabalho prévio com a mutação Glu72X no Paquistão examinou 22 WT/MT e 5 WT/WT e não achou nenhuma diferença significativa no EDP da altura ($-1,89 \pm 1,1$ e $-1,51 \pm 1,8$ respectivamente) (MAHESHWARI et al., 1998). O EDP da altura de WT/MT adultos era mais alto que as crianças e adolescentes (-1.5 ± 0.7 e -2.73 ± 0.94 respectivamente) sugerindo que haploinsuficiência para o GHRHR pode causar atraso de crescimento em lugar de déficit estatural na vida adulta. Análise prévia da coorte de Itabaianinha tinha sugerido uma redução na altura dos adultos que foi achada, mas não foi significativa (HAYASHIDA et al., 2000). Ambas as análises estavam limitadas pelo número pequeno de indivíduos que podem não ter permitido determinar um efeito de heterozigose na altura final. O grande número de afetados em Itabaianinha nos permitiu responder esta pergunta em um número maior de indivíduos. Dado a homogeneidade de tal população, a prevalência de outro polimorfismo do gene que pode influenciar a estatura ou composição de corporal deveria ser semelhante entre indivíduos WT/MT e WT/WT. Nós usamos um grupo de indivíduos adultos para descobrir uma diferença de 5 cm entre os 2 grupos. Para evitar a variabilidade devido ao atraso de crescimento, estudamos só os indivíduos acima de 25 anos. A mutação IVS1+1G→A, no gene do receptor do GHRHR causa retenção de parte ou de todo o íntron 1, com introdução de um códon de parada prematuro e provavelmente falta completa da proteína madura do GHRHR. Dessa forma o alelo mutado não produziria nenhum receptor funcional. Como a proteína do GHRHR só é expressa na pituitária e na medula renal (GAYLINN, 2002), não podemos provar em nossos pacientes que a falta de um alelo reduz o nível do receptor para ser 50% dos indivíduos normais. Não obstante, nossos dados estabelecem que a heterozigose para uma mutação nula no gene do GHRHR não é associado com redução de estatura final de adulto ou redução em IGF-I sérico.

Contudo a falta de efeito de uma mutação nula na estatura final pode ser aplicada a indivíduos carregando mutações menos graves do ponto de vista funcional (mutação *missense*) que pode permitir expressão do receptor embora com função defeituosa (ALBA; SALVATORI, 2005).

Nossos dados necessariamente não se aplicam às mutações em outros genes envolvidos controlando secreção ou ação do GH. Embora tenha sido sugerido que 1 a 5% de crianças com baixa estatura idiopática possam apresentar mutações em heterozigose no gene do receptor do GH causando uma resistência parcial ao GH (GODDARD et al., 1997; SALERNO et al., 2001) em uma população homogênea, nenhuma diferença foi achada entre os indivíduos HTZ para a mutação E 180 no gene do receptor do GH em parentes normais da grande família dos anões de Laron do Equador (ROSENBLOOM et al., 1998).

Apesar da falta de diferença em estatura dos adultos nós achamos efeitos surpreendentes da heterozigose em relação ao peso e composição corporal. Indivíduos WT/MT são mais leves que indivíduos HMZ, com redução do IMC e SC. Semelhantemente cintura e circunferência do quadril eram menores em WT/MT, sem diferença na relação cintura/quadril. Estes dados parecem indicar que a heterozigose para a mutação do gene do receptor de GHRHR de Itabaianinha causa declínio paralelo de MG e MM embora mais marcado para MM. Redução de MM é achada comumente em adultos com deficiência de GH adquirida (MOLITCH et al., 2006), e nós a achamos em indivíduos GHD sem uso prévio de GH durante a sua vida (BARRETO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006), porém sem estudo no final da puberdade, e reversível com o tratamento com GH (GLEENSON et al., 2007). Assim não é inusitado que indivíduos WT/MT possam ter uma redução de MM. Contudo a redução em MM em indivíduos com GHD é normalmente associada com um aumento absoluto em Kg e da % MG (SNEL, 1995). Os indivíduos WT/MT têm pelo contrário, uma tendência da redução de MG em Kg ao invés de um possível aumento que poderia ser esperado no estado de deficiência leve do GH. Nossos resultados são concordantes com achados que adultos com deficiência parcial de GH tenham decréscimo de MM, porém sem redução significativa de MG em Kg e % (MURRAY; ADAMS; SHALET, 2004).

A única diferença bioquímica entre os dois grupos está no nível de insulina e no $HOMA_{IR}$, sugerindo que indivíduos WT/MT aumentaram a insulino sensibilidade, semelhantemente aos indivíduos com GHD (BARRETO-FILHO et al., 2002). Em animais com *Knock-out* do IGF-I hepático (baixos níveis de IGF-I e altos níveis de GH), bloqueando o efeito do GH aumenta a insulino sensibilidade sinalizando um efeito direto do GH na ação insulínica (YAKAR et al., 2004). Embora não termos avaliado a insulino sensibilidade diretamente pelo método de Clamp, é concebível que uma discreta redução na secreção do GH em indivíduos WT/MT poderia causar o incremento na sensibilidade insulínica apesar de nenhuma diferença nos níveis de IGF-I sérico. A sensibilidade à insulina aumentada foi associada com a longevidade (PAOLISSO et al., 1996), modelos animais estabeleceram o

caminho de sinalização do IGF-I como modulador chave para o envelhecimento em roedores e invertebrados (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*), sugerindo que a exposição reduzida dos tecidos ao IGF-I seja associada com um aumento de vida nestas espécies (YANG et al., 2005).

Nos seres humanos a sensibilidade à insulina declina normalmente durante o envelhecimento, a resistência à insulina é importante fator de risco, associado com uma variedade de fenótipos intermediários (hipertensão, aterosclerose, obesidade) que afeta a morbi-mortalidade entre as pessoas idosas. Envelhecer é um processo natural associado a várias mudanças fisiológicas e endócrinas. Efeitos catabólicos alteram a composição corporal causando uma diminuição da massa magra, acumulação de gordura e perda de densidade mineral óssea. Junto com estas mudanças a secreção de GH e níveis de IGF-I em indivíduos saudáveis sofrem um declínio gradual previsível (JUUL et al., 1994). Este fenômeno relativo ao GH e IGF-I foi nomeado de deficiência do envelhecimento normal ou Somatopausa e é atribuído à diminuição da atividade do eixo hipotalâmico – GH/IGF-I com diminuição da secreção do GH de aproximadamente 14% por década depois da meia-idade (LAMBERTS, 1997). Uma das características fisiológicas identificadas são as características dos idosos que têm a sensibilidade à insulina extremamente realçada comparado com indivíduos mais jovens. Mais recentemente, dados com 466 indivíduos saudáveis com idade variando entre 28 e 110 anos, demonstraram uma redução significativa da resistência à insulina nos indivíduos de 90-100 anos (BARBIERI et al., 2003) sugerindo que a variação da idade vai indicar uma resposta eficiente da insulina que tem impacto na longevidade em humanos. Estudos futuros se concentrarão em determinar a longevidade dos indivíduos WT/MT.

Estes dados vistos conjuntamente sugerem que efeitos individuais do GH possam ter limiares diferentes. É concebível que grau moderado de redução em secreção de GH (como pode ocorrer nos indivíduos WT/MT) pode causar aumento na sensibilidade à insulina e redução da MM enquanto redução no crescimento somático, e da secreção de IGF-I no fígado, aumento de MG, dos lipídeos sanguíneos podem precisar de déficit de GH mais acentuado.

É importante assinalar que a homogeneidade dos indivíduos estudados torna possível que as alterações na composição corporal não sejam devidas à mutação no receptor do GHRH, mas outras reações genéticas associadas com a mutação na coorte de Itabaianinha. Estudos em outros grupos familiares como os do Paquistão podem ajudar e resolver esta questão. Em adição, parentes de primeiro grau de indivíduos com DIGH foram mais freqüentes no WT/MT, adicionando um grau de variabilidade fenotípica entre os dois grupos.

Não acreditamos que isto altere nossos resultados, haja vista que todos os indivíduos pertencem à mesma população e crescem na mesma comunidade em expressão ambiental similar.

Em conclusão, nossos resultados dos dados para heterozigose para a Mutação IVS1 + 1G→A, no gene do receptor de GHRH não reduz estatura final, mas causa mudanças na composição corporal e indireta evidência de sensibilidade insulínica aumentada.

Qualquer que seja o mecanismo, a falta de alguma diferença do IGF-I sérico entre indivíduos WT/MT e indivíduos WT/WT sugere que os efeitos não são modulados pelos IGF-I sérico.

Futuros estudos serão realizados para determinar se a heterozigose para esta mutação é associada com redução detectável na secreção de GH.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- Existe um fenótipo parcial para os indivíduos Heterozigotos (WT/MT) para a Mutação IVS1 + 1 G → A no gene do receptor do GHRHR.
- Não foi achada a presença de déficit estatural nos indivíduos WT/MT para a mutação IVS1+1 G→A no gene do receptor do GHRH.
- Não houve redução nos níveis séricos de IGF-I entre os grupos WT/MT e Homozigotos normais (WT/WT).
- As dobras cutâneas: cintura, quadril e massa magra estavam reduzidos nos indivíduos WT/MT. O % de Massa Gorda e Relação Cintura/Quadril que são semelhantes entre os dois grupos.
- Não houve diferença dos níveis de Glicemia e Colesterol Total e LDL nos indivíduos WT/MT, não havendo diferença significativa entre os dois grupos.
- Insulina e $HOMA_{IR}$ foram mais baixo nos indivíduos WT/MT que nos indivíduos WT/WT, sugerindo indiretamente uma maior sensibilidade à Insulina. A PCRas e Lp (a) não apresentaram diferença entre os dois grupos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. et al.. Effect of 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**, v. 84, p. 4118-4126, 1999.
- ALBA, M.; SALVATORI, R. Naturally-occurring missense mutations in the human growth hormone-releasing hormone receptor alter ligand binding. **J.Endocrinol**, v.186, p.512-521, 2005.
- ALCÂNTARA, M.R.S. et al. Thyroid Morfology and Function in Adults with Untreated Isolated Growth Hormone Deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, n.3, p.860-864, 2006.
- AMATO, G. et al. Body composition, bone metabolism, and heart structure and function in growth hormone (GH) deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses. **J Clin Endocrinol Metab**, v.77, p.1671-1676, 1993.
- ATTIE, K.M. Genetic studies in idiopathic short stature. **Curr Opin Pediatr**. v.12, p.400-404, 2000.
- BARBIERI, M. et al. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.285, p.E1064-E1071, 2003.
- 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**, v.51, p.559-564, 1999.
- BARRETO-FILHO, J.A.S. et al. Familial Isolated Growth Hormone Deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p. 2018-2023, 2002.
- BAUMANN, G.; MAHESHWARI, H. Severe Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor Gene. **Acta Pediatric Suppl**, v.423, p.33-38, 1997.
- BETTERIDGE, D.J.; MORREL, J.M. **Clinician's guide to lipids and coronary heart disease**. 1. ed. London: Chapman and Hall Medical, 1998.
- BOGUSZEWSKI, C.L. Genética molecular do eixo GH-IGF-I. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.45, p.5-14, 2001.

BRODIE, D.A.; ESTON, R.G. Body Fat Estimations by Eletrical Impedance and Infra-Red Interactance. **Int J Sports Med**, v.13, p.5319-5325, 1992.

CARAKUSHANSKY, M. et al. A new missense mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene in familial isolated GH deficiency **European Journal of Endocrinology**, v.48, p.25-30, 2003.

CEDA, G.P. et al. Diminished pituitary responsiveness to growth hormone releasing factor in aging male rats. **Endocrinology**, v.18, p.2109, 1986.

COGAN, J.D.; PHILLIPS, J.A. 3rd. Growth disorders caused by genetic defects in the growth hormone pathway. **Adv Pediatr**, v.45, p. 337-361, 1998.

CORONHO, V; PETROIANER, A.; MATOS SANTANA, E. **Tratado de Endocrinologia e Cirurgia Endócrina**. Editora Guanabara Koogan, 2001. p.222-235.

CUNEO, R.C. et al. The Growth Hormone Deficiency in adults. **Clin Endocrinol**, v.37, p.387-397, 1992.

DAVIDSON, M.B. Effect of Growth Hormone on carbohydrate and lipid metabolism. **Endocr Rev**, v.8, p.115-131, 1987.

DU BOIS, D.; DU BOIS, E.F. Clinical calorimetry X. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. **Arch Intern Med**, v.17, p.863–871, 1989.

FAROOQI, I.S. et al. Clinical Spectrum of Obesity and mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. **N Engl J Med**, v.348, p.1085-1095, 2003.

GAYLINN, B.D. Growth hormone releasing hormone receptor. **Receptors Channels**, v.8, p.155-162, 2002.

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

GLEENSON, H.K. et al. Metabolic effects of growth hormone (GH) replacement in children and adolescents with severe isolated GH deficiency due to a GR. Receptor mutation. **Clin Endocrinol**, v.66, p. 466-474, 2007.

GODDARD, A.D. et al. Partial growth-hormone insensitivity: the role of growth-hormone receptor mutations in idiopathic short stature. **J Pediatr**, v.131, p.551-55, 1997.

GONDO, R.G. et al. Growth Hormone-Releasing Peptide-2 Stimulates GH Secretion in GH-Deficient Patients with Mutated GH-Releasing Hormone Receptor. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p.3279-3283, 2001.

GREENSPAN, F.S.; STREWLWER, G.J. **Basic & Clinical Endocrinology**. 5.ed. USA: Appleton & Longe, 1997.

HAMILL, P.V. et al. Physical growth: national for health statistics percentiles. **Am J Clin Nutr**, v.32, p.607, 1979.

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-SE. **Eur J Endocrinol**, v.142, p.557-563, 2000.

HENDY, G.N. et al. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. **Hum Mutat**, v.16, p.281-296, 2000.

HENRY, JOHN BERNARD M.S. **Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 18. ed. Editora Manole, 1995. p.351-353.

ISSELBACHER, K.J. et al. **Harrison: Medicina Interna**. 14. ed. 1998. p.2091-2120.

JANSEN, A.C. et al. Phenotypic variability in familial hypercholesterolemia: an update. **Curr Opin Lipidol**, v.13, p.165-171, 2002.

JOHANNSSON, G. et al. Two years of growth hormone (GH) treatment increases bone mineral content and density in hypopituitary patients with adult-onset GH deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, p.2865-2873, 1996.

JOHANSSON, J.O. et al. Cardiovascular risk factors in adults patients with growth hormone deficiency. **Acta Endocrinol**, v.129, p.195-200, 1993.

JULL, A. et al. Serun insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents , and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. **J Clin Endocrinol Metab**, v.78, p.744-752, 1994.

KORYTKO, A.I.; ZEITLER, P.; CUTTLER, L. Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in rats. **Endocrinology**. v.137, p.1326, 1996.

LAMBERTS, S.W. et al. The Endocrinology of aging. **Science** v.17, p.419-424, 1997.

LANSANG, M.C.; WILLIAMS, G.H.; CARROLL, J.S. Correlation between the glucose clamp technique and the homeostasis model assessment in hypertension. **Am J Hypertens**, v.14, p.51-53, 2001.

MAHESHWARI, H.G. et al. Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: Dwarfism of Sindh. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, p.4065-4074, 1998.

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

MARQUES-SANTOS, C. **Proteína C Reativa na Deficiência Isolada Monogênica do Hormônio de Crescimento**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, 2006.

MOLITCH, M.E. et al. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrin Metab**, v.91, p.1621-1634, 2006.

MULLIS, P.E. Genetic control of growth. **Eur J Endocrinol**, v.152, p.11-31, 2005.

MURRAY, R.D.; ADAMS, J.E.; SHALET, S.M. Adults with partial growth hormone deficiency have an adverse body composition. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, p.1586-1591, 2004.

NETCHINE, I. et al. Extensive Phenotypic analysis of a family with growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH – releasing hormone gene. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, p.432-436, 1998.

NISHI, Y. et al. Isolated Human Growth Hormone Deficiency Due to a HGH gene deletion with (TYPE IA) and without (the Israeli-type) HGH antibody formation during HGH therapy. Yokoama – Japão. **Acta Endocrinology** (Copenh), v.122, p.267-271, 1990.

OLIVEIRA, H.A. et al. Magnetic resonance imaging study of pituitary morphology in subjects homozygous and heterozygous for a null mutation of the GHRH receptor gene. **Eur J Endocrinol**, v.148, p.427-432, 2003.

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 Endocrin Metab**. v.91, p.2093-2099, 2006.

OLNEY, R.C. et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (*NPR2*) are associated with short stature. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, p.1229-1232, 2006.

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em:
<www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Acesso em: 11 de novembro de 2006.

PAOLISSO, G. et al. Glucose tolerance and insulin action in healthy centenarians. **Am J Physiol**, v.270, p.890-894, 1996.

PHILLIPS, J.A. Genetics defects of the growth hormone synthetic pathway. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.43, p.347-352, 1999.

RIDKER, P. M. Clinical application of C-reactive protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. **Circulation**, v.107, p.363-369, 2003.

ROBERTS, W.L. et al. Evaluation of four Automated High-Sensitivity C-Reactive Protein Methods: Implications for Clinical and Epidemiological Applications. **Clinical Chemistry**, v.46, p.461-468, 2000.

ROSEN, T.; BENGTSSON, B.A. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. **The Lancet**, v.336, p.285-288, 1990.

ROSENBLOOM, A.L. et al. Stature in Ecuadorians heterozygous for growth hormone receptor gene E180 splice mutation does not differ from that of homozygous normal relatives. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, p.2373-2375, 1998.

SALERNO, M. et al. Abnormal GH receptor signaling in children with idiopathic short stature. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.3882-3888, 2001.

SALVATORI, R. et al. Familial Isolated Growth Hormone Deficiency Due to a Novel Mutation in the Growth Hormone Releasing Hormone Receptor. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, p.917-923, 1999.

SALVATORI, R. et al. Isolated growth hormone deficiency due to compound heterozygosis for 2 new mutations in the growth hormone-releasing hormone receptor gene. **Clin Endocrinol**, v.54, p.681-687, 2001a.

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, p.273-279, 2001b.

SALVATORI, R. et al. Serum GH response to pharmacological stimuli and physical exercise in two siblings with two new inactivating mutations in the GH-releasing hormone receptor gene. **Eur J Endocrinol**, v.147, p.591-596, 2002a.

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

SALVATORI, R. et al., GH response to hypoglycemia and clonidine in the GH-releasing hormone resistance syndrome. **J. Endocrinol. Invest.** v.29, p. 805-808, 2006.

SAVAGE, M.O. et al. Clinical Features and Endocrine Status in patients with Growth Hormone Insensitivity (Laron Syndrome). **J Clin Endocrinol Metab**, v.77, p.1465-1471, 1993.

SMITH, W.J. et al. Use of Insulin – Like Growth Factor Protein - 2 (IGFBP-2), IGFBP – 3 and IGF-1 for assessing growth hormone status in short children. **J Clin Endocrinol Metab**, v.77, p.1294-1299, 1993.

SNEL, Y.E.M. et al. Magnetic resonance imaging-assessed adipose tissue and serum lipid and insulin concentrations in growth hormone-deficient adults. EFFECT OF GROWTH HORMONE REPLACEMENT. **Arterioscler Thrombs Vasc Biol**, v.15, p.1543-1548, 1995.

SONNTAG, W.E.; HYLKA, Y.W.; MEITES, J. Impaired ability of old male rats to secrete growth hormone *in vivo* but not *in vitro* in response to hpGRF (1-44). **Endocrinology**, v.113, p.2305, 1983.

SONNTAG, W.E. et al. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. **Endocrinology**, v.107, p.1875, 1980.

SOUZA, A.H.O. **Estudo Genético das Crianças de Carretéis – Deficiência Familiar Isolada do Hormônio de Crescimento – Itabaianinha – Sergipe**. 1997. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança), Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 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**, v.48, p.406-413, 2004.

SOUZA, A.H.O. et al. **Qualidade de vida de portadores da deficiência do hormônio do crescimento em Itabaianinha-SE**. 1999. Monografia (Especialização em Endocrinologia Genética), Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, 1999.

THOMPSON, M.; MCINNES, R.R.; HUTINGTON, F.W. **Genética Médica**. 5. ed. Toronto: W.B. Saunders Co, 1993.

THORNER, M.O. et al. The anterior pituitary gland. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W.(eds). **Textbook of Endocrinology**. 8.ed. Philadelphia: W.B. Saunders CO, 1992. p. 221-310.

TIETZ. **Textbook of Clinical Chemistry**. 3. ed. 1999. p. 820.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J Clin Path**, v.22, p.158-161, 1969.

UNDERWOOD, L.E.; VAN, W.Y.K.J.J. Normal and aberrant growth. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W.(eds). **Textbook of Endocrinology**. 8.ed. Philadelphia: W.B. Saunders CO, 1992. p. 1079-1138.

WAJNRAJCH, M.P. et al. Nonsense Mutation in the Human Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor causes Growth Failure Analogous to the Little (lit) Mouse. **Nat. Genet.**, v.12, p.88-90, 1996.

WHO. **Measuring obesity – Classification, and description of antropometric data**. Copenhagen: WHO, 1988.

WOODS, K.A. et al. Phenotype: relationships in growth hormone insensitivity syndrome. **J Clin Endocrinol Matab**, v.82, p.3529-3235, 1997.

YANG, J. et al. Control of aging and longevity by IGF-I signaling. **Exp. Gerontol** v.40, p.867-872, 2005.

YAKAR, S. et al. Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-I deficient mice. **J. Clin. Invest.**, v.113, p.96-105, 2004.

ARTIGO ACEITO E PUBLICADO ELETRONICAMENTE¹

Carta de aceitação do Paper pelo “The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism”

Roberto Salvatori
John Hopkins School of Medicine
Division of Endocrinology
1830 East Monument Street #333
Baltimore, MD
United States

Dear Dr. Salvatori:

We are pleased to inform you that your manuscript, # 07-0092 Version 3: "Heterozygosity for a Mutation in the Growth Hormone Releasing Hormone Receptor Gene Does Not Influence Adult Stature, But Affects Body Composition", has been accepted for publication in The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. Your paper will be published online within a few days and can be viewed at: <http://jcem.endojournals.org>.

The print version of your manuscript will appear in approximately three months. You will receive page proofs by email as a PDF attachment one month before publication. If you do not, please contact Erin Richardson at Cadmus Professional Communications to inquire (richardsons@cadmus.com). The page proofs will be accompanied by an invoice for publication charges.

Congratulations on acceptance of your manuscript. Thank you for giving us the opportunity to review and publish your paper.

Sincerely,

Paul W. Ladenson, M.D.
Editor-in-Chief

¹ Endereço eletrônico: <http://jcem.endojournals.org/cgi/rapidpdf/jc.2007-0092v1>

Heterozygosity for a Mutation in the Growth Hormone Releasing Hormone

Receptor Gene Does Not Influence Adult Stature, But Affects Body

Composition*²

Rossana M.C. Pereira, Manuel H. Aguiar-Oliveira, Alessia Sagazio, Carla R.P.Oliveira, Francielle T. Oliveira, Viviane C. Campos, Catarine T. Farias, Tábita A.R.Vicente, Miburge B.Gois Júnior, Joselina L.M. Oliveira, Celi Marques-Santos, Ívina E.S. Rocha, José A.S. Barreto-Filho, and Roberto Salvatori

Division of Endocrinology, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE Brazil 49060-100 (R.M.C.P., M.H.A.-O., C.R.P.O., F.T.O., V.C.C., C.T.F., T.A.R.V., M.B.G.J., J.L.M.O., C.M.-S., I.E.S.R., J.A.S.B.-F.), and Division of Endocrinology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore MD 21287 (A.S., R.S.)

DISCLOSURE STATEMENT: R.M.C.P., M.H.A.-O., A.S., C.R.P.O., F.T.O., V.C.C., C.T.F., T.A.R.V., M.B.G.J., J.L.M.O., C.M.-S., I.E.S.R., J.A.S.B.-F. have nothing to declare. R.S. receives grant support from Genentech (8/1/06-7/31/08).

*This is an un-copied author manuscript copyrighted by The Endocrine Society. This may not be duplicated or reproduced, other than for personal use or within the rule of “Fair Use of Copyrighted Materials” (section 107, Title 17, U.S. Code) without permission of the copyright owner, The Endocrine Society. From the time of acceptance following peer review, the full text of this manuscript is made freely available by The Endocrine Society at <http://www.endojournals.org/>. The final copy edited article can be found at <http://www.endojournals.org/>. The Endocrine Society disclaims any responsibility or liability for errors or omissions in this version of the manuscript or in any version derived from it by the National Institutes of Health or other parties. The citation of this article must include the following information: author(s), article title, journal title, year of publication and DOI.”

- Abbreviated title: Heterozygous GHRH receptor mutation
- Key terms: GHRH receptor, mutation, heterozygosity, phenotype
- Word count (excluding abstract, tables, acknowledgements, and references): 2820
- Clinical trial.gov identifier NCT00149708

Correspondence:

Roberto Salvatori, MD
Division of Endocrinology, Johns Hopkins University,
1830 East Monument St. #333, Baltimore MD 21287
Tel. (410) 955-3821; Fax (410) 955-8172
E-mail: salvator@jhmi.edu

² O Artigo apresentado segue as normas determinadas pelo periódico “The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism” ao qual foi submetido.

Abstract

Context: Bi-allelic mutations in the GHRH receptor (GHRHR) gene (*GHRHR*) are a frequent cause of isolated GH deficiency (IGHD). Although heterozygous carriers of these mutations appear normal, we hypothesized that heterozygosity for a *GHRHR* mutation may be associated with a sub-clinical phenotype. **Methods:** We studied members of a large Brazilian kindred with IGHD (Itabaianinha cohort) caused by a homozygous *null GHRHR* mutation. We compared 76 adult subjects (age 25-75 yrs) heterozygous for the mutation (WT/MT) with 77 sex-matched controls from the same population who are homozygous for the wild-type *GHRHR* allele (WT/WT). **Results:** We found no difference in adult height and standard deviation score for serum IGF-I between the two groups. Body weight, body mass index, skin folds, waist (W) and hip (H) circumferences, and lean mass were all reduced in WT/MT subjects. Percent fat mass and W/H ratio were similar in the two groups. Fasting insulin and Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance were lower in WT/MT. The other biochemical parameters (total and fractionated cholesterol, triglycerides, Lp(a), C-reactive protein) were not different between the two groups. **Conclusions:** Heterozygosity for a *null GHRHR* mutation is not associated with reduction in adult stature or in serum IGF-I, but it causes changes in body composition and possibly an increase in insulin sensitivity. These effects do not seem to be modulated by changes in circulating IGF-I.

Introduction

Isolated growth hormone (GH) deficiency (IGHD) has a familial occurrence (and therefore a likely genetic cause) in 5-30% of cases. Several modes of inheritance have been reported, the most frequent being autosomal recessive (AR) (1). The most common AR form (IGHD type IB) is often caused by homozygous (HMZ) or compound heterozygous (HTZ) mutations in the GH releasing hormone (GHRH) receptor (*GHRHR*) gene (*GHRHR*) (2). Most of the *GHRHR* mutations seem to be specific to a certain geographical region, with the exception of one (L144H), which has arisen independently in North America (USA) and Europe (Spain) (3). Although heterozygous carriers of *GHRHR* mutations appear normal, we hypothesized that they may have a mild, sub clinical phenotype. The concept that a recessive disease requires malfunction of both paternal and maternal alleles has been challenged by some examples showing that subjects HTZ for a recessive mutation exhibit a milder phenotype, intermediate between HMZ affected and normal individuals (“gene dosage effect”). This has been described, among others, for mutations in genes encoding for the low-density lipoprotein receptor, the calcium sensing receptor, the natriuretic peptide receptor-B, and the melanocortin 4 receptor (4-7).

In several families reported to date the affected subjects are compound heterozygous for two distinct *GHRHR* mutations, suggesting that faulty *GHRHR* alleles may not be very rare in the general population (2, 8-10). Data obtained from a large GHD kindred from Pakistan (also due to a HMZ *null GHRHR* mutation) (11), suggested a “slight growth delay and, perhaps, adult height deficit in the heterozygous state” (12), but the strength of the conclusions was reduced by the relatively small size of the sample. We have recently identified a large kindred of patients with familial IGHD, with 105 affected individuals over 7 generations, residing in Itabaianinha County, in the Northeastern Brazilian state of Sergipe. In

this population, IGHD is caused by a HMZ mutation in the splice donor site of intron 1 (IVS1+1G→A) of the *GHRHR* (13). GH-naïve adults and children from this kindred have very low serum GH and IGF-1, reduced fat free mass, increase in percentage of fat mass, increased waist to hip ratio, increased total and LDL-cholesterol and C-reactive protein (CRP) levels, and increased systolic blood pressure, but no insulin resistance and no evidence of premature atherosclerosis (14-17). In a preliminary study, HTZ subjects have been reported to have lower serum IGF-I than homozygous normal (18), but the small number of subjects and their heterogeneous age compared to controls prevented the drawing of final conclusions. Here we have studied a significantly larger number of subjects heterozygous for the mutation and compared them with age- and sex-matched controls.

Subjects and Methods

Subjects

Normal stature adult subjects aged 25-75 years from the Itabaianinha community who have first, second, or third degree relatives with history of GHD were recruited by advertisement on a local bulletin board and by word of mouth. The protocol was approved by both the Johns Hopkins University and the Federal University of Sergipe Ethics Committees. All subjects signed written informed consent. Subjects with history of childhood diseases known to influence adult stature such as malabsorption, renal failure, and exposure to chronic steroids were not included. Assuming that the standard deviation of adult height in the Brazilian population is similar to the one observed in the U.S. population (19), we have calculated that to detect a height difference of 5 centimeters between heterozygous (wild type/mutant, WT/MT) and normal (wild type/wild type, WT/WT) family members with a power of 80%, we needed 75 subjects per group. Subjects were initially asked to undergo collection of peripheral DNA by buccal swabs. Buccal swabs from a total of 240 adult individuals were collected, DNA was extracted by alkaline lysis, and genotyping for the IVS1+1 G→A mutation was carried out by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the amplified exon 1-intron 1 junction of the *GHRHR*, as previously described (13). In the group of the 240 volunteers, we found 76 WT/MUT subjects. Among the individuals who had enrolled in the study, we then identified 77 WT/WT subjects that were sex-matched and as age-matched as possible to the WT/MT group.

We asked them to report after an overnight fast to the local Little People Association building in daily groups of 20 during 8 consecutive days. Three WT/MUT subjects were subsequently diagnosed with primary hypothyroidism (by moderate increase in TSH), and

were only included in the height analysis. Due to logistical problems not every patient had all the variables assessed.

Anthropometric measurement

The subjects' height and body weight (BW) were measured with portable stadiometer and portable scale; body mass index (BMI) was calculated using the formula: weight in kg/height m²). Body surface area (in meters²) (BSA) was calculated using the formula: $w^{0.425} \times h^{0.725} \times 71.84 \times 10^{-4}$, where w is the weight in kilograms, and h is the height in centimeters (20). Triceps, biceps, sub scapular, and suprailiac skin folds were measured (in mm) with the subjects standing erect using the Lange Skin fold Caliper (Cambridge, MD) on the right side of the body. Hip (H) and waist (W) circumferences were measured (in cm) as described previously (20), and W/H ratio was calculated (21).

Fat mass (FM) and fat free mass (FFM) contents were measured using the infrared interactance method (22). This procedure involves placing a fiber optic probe tangentially to the belly of the subject's biceps brachial and measuring the reflected energy in the near-infrared region at two different frequencies. A multiple regression equation is employed to use the interactance information in combination with other anthropometric data to predict body composition (22).

Laboratory assessment

Total cholesterol, triglycerides and glucose were measured by the enzymatic Trinder colorimetric test (23). The HDL-C was separated using the phosphotungstic acid/magnesium chloride method and the LDL-C concentration was calculated indirectly (Friedwald formula). Insulin was measured by a solid-phase, two-site chemiluminescent immunometric assay, with the sensitivity of 2 µIU/mL (DPC – Diagnostic Products Corporation Corporate Offices 5210

Pacific Concourse Drive Los Angeles, CA) and intra- and the inter-assay variability were 4.26% and 5.43% respectively; IGF-I was measured by the immunoradiometric assay, with double extraction and an assay sensitivity of 0.8 ng/ml (5600 Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, USA). The intra- and the inter-assay variability were 2.25 % and 2.6 % respectively. SDS for serum IGF-I was calculated by subtracting the mean of IGF-I level of the age from the individual value and dividing this value by the standard deviation of the respective mean age given by the manufacturer.

Insulin resistance was estimated using the Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance ($HOMA_{IR}$) with the formula: fasting serum insulin ($\mu U/ml$) x fasting plasma glucose (mmol/l) / 22.5 (24). CRP and Lp(a) were measured by nephelometry (Dade Behring Marburg GmbH Marburg, Germany and Image Immunochemistry System Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA, respectively). CRP and Lp(a) sensitivities were 0.175 mg/l and 2mg/dl respectively. The intra- and the inter-assay variability were 3.5% and 3.4% and 5.0% and 6.5%, respectively.

Insulin, CRP, and IGF-I were measured in serum after storage at $-20^{\circ}C$. Lp(a) was measured in serum after storage at $4^{\circ}C$. All these samples were assayed together after the end of all the collections. Lipid profiles and serum glucose levels were measured daily in the clinical Laboratory of the Hospital of the Federal University of Sergipe.

Statistical analysis

Values for continuous variables are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed by independent samples t test by using the statistical software SPSS/PC 11, 5 (Statistical Packet for Social Science, Inc., Chicago, IL). Insulin, CRP, LP (a) and $HOMA_{IR}$ data were transformed into decimal logarithm before analyses. To assess a

possible effect of age on the variables, one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used.

P values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Results

Subject characteristics

Demographics of the subjects heterozygous for the *GHRHR* mutation (WT/ MT) and of the homozygous normal (WT/WT) subjects are shown in table 1. Sixty-six % were under 50 years of age. As expected, there was an over-representation of subjects that were first degree relatives of GHD subjects in the WT/MT group (55.2% vs. 7.8%, $p < 0.001$). No difference in percentage second degree relatives was observed (19.7% vs. 27.2%). The two groups were similar in sex distribution in all age categories. The percentage of each age category was similar in both groups, with the exception of an overrepresentation of younger subjects (25-30) in WT/MT compared to WT/WT (25% vs. 14%, $p = 0.009$). We kept this group as age would not influence final stature and (by definition, being age-adjusted) SDS IGF-I. The significant differences between the two groups reported below would be maintained even if this age group was removed from the analysis.

Anthropometric data and IGF-I levels

Anthropometric data (mean $\pm$ SD) are shown in table 2. There was no difference in height and SDS IGF-I between the two groups. The minimal and maximal heights were 1.35 and 1.82 m in WT/WT and 1.36 and 1.84 m in WT/MT. BW, BMI and BSA of WT/MT were lower than WT/WT. If one analyzes the data dividing subjects by sex, such differences remain for BW (62.6 ± 11.5 vs. 71.3 ± 13.6 kg, $p = 0.018$ for males, 57.9 ± 10.8 vs. 63.1 ± 13.6 kg

p=0.036 for females), and for BMI (22.8 ± 2.5 vs. 25.6 ± 4.3 kg/m² p= 0.06 for males; 24.5 ± 4.9 vs. 26.7 ± 5.1 kg/m² p=0.032 for females).

Body composition

Thickness of all the skin folds was reduced in WT/MT in comparison to WT/WT. Waist and hip circumferences and FFM were reduced in WT/MT in comparison to WT/WT. FM % and W/H ratio were similar in the two groups (table 3).

Biochemical data

Insulin and HOMA_{IR} were lower in WT/MT than in WT/WT (table 4). The other parameters (total and fractionated cholesterol, triglycerides, Lp(a), CRP) were not different between the two groups.

Effects of aging

In the WT/WT group we did not observe any significant difference in any of the variable across age groups. In the WT/MT group, absolute and percent fat mass were lower in the 25-30 than in the 40-50 group (9.47 ± 6.67 vs. 16.76 ± 7.76 Kg, p= 0.047; and 14.46 ± 10.13 vs. 27.67 ± 8.3 %, p=0.01).

Discussion

GHRHR mutations are a relatively frequent cause of autosomal recessive isolated GH deficiency (2). The number of HTZ carriers is obviously larger than the HMZ affected, generating the question of whether a sub-clinical phenotype is associated with the lack of one functional *GHRHR* allele. A previous paper addressing this issue in a Pakistani kindred with the Glu72X *GHRHR* mutation examined 22 WT/MT and 5 WT/WT and found no significant difference in height SDS (-1.89 ± 1.1 vs. -1.51 ± 1.8) (11). The height SDS of WT/MT adults was higher than children and adolescents (-1.5 ± 0.7 vs. -2.73 ± 0.94) suggesting that haploinsufficiency for the *GHRHR* may cause growth delay rather than growth arrest. Previous analysis of the Itabaianinha cohort had suggested a reduction in adult height, which was found to be not statistically significant (18). Both analyses were limited by the relatively small number of individuals, which may have not allowed the power of determining an effect of heterozygosity on final height. The unique size of the Itabaianinha pedigree allowed us to answer this question in a larger number of subjects. Given the fact that we recruited WT/MT and WT/WT subjects from the same population, the prevalence of other gene polymorphisms that may influence stature or body composition should be similar between the two groups. We used a group powered with enough individuals to detect a difference in final adult height of 5 cm between the 2 groups. To avoid the variability of growth delay, we only studied final adult stature in individuals aged 25 years and above. Our results prove that heterozygosity for a *null* *GHRHR* mutation is not associated with reduction in adult stature. In addition, no reduction in serum IGF-I was present in WT/MT subjects.

The IVS1+1G→A *GHRHR* mutation is predicted to cause retention of part or all of the very large intron 1, with introduction of a premature stop codon and likely complete lack of mature *GHRHR* protein. Therefore, the mutated allele would not produce any functional

receptor (*null* allele). As the *GHRHR* protein is expressed only in the pituitary and in the renal medulla (25), we cannot prove that in our patients the lack of one allele causes the receptor level to be 50% of that in normal subjects. However, the lack of effect of a *null* mutation on adult height can be applied to subjects carrying less disruptive mutations (such as missense mutations) that may allow expression of the receptor protein, albeit dysfunctional (26).

The lack of effect of heterozygosity for a *GHRHR* mutation on adult stature does not necessarily apply to mutations in other genes involved in controlling GH secretion or action. Although it has been suggested that a subgroup of children with idiopathic short stature have heterozygous mutations in the GH receptor gene causing a partial resistance to GH (27, 28), no difference in height was found between subjects HTZ for the GH receptor gene E180 splice mutation and normal relatives in a large kindred of patients with GH resistance from Ecuador (29).

Despite lack of difference in adult stature, we found some surprising effects of *GHRHR* mutation heterozygosity on body weight and body composition. WT/MT individuals weighed less than WT/WT subjects, with reduction in BMI and BSA. To determine which compartment was mainly responsible for such weight reduction, we studied body composition by infrared interactance. Although we are aware that dual energy X ray is the gold standard for these measurements, our technique allowed us to study the subjects locally. While FFM was lower in WT/MT, there was no significant difference in absolute or percent FM. Given a non-significant trend of FM to be lower in WT/MT, there was also no significant difference in %FM. Similarly, both waist and hip circumference were lower in WT/MT, with no difference in waist/hip ratio. These data seem to indicate that heterozygosity for the Itabaianinha *GHRHR* mutation causes a decline both in FM and FFM, albeit more marked for FFM. Reduction in FFM is commonly found in adults with acquired GHD (30), and we have found it in GH-naïve GHD patients from Itabaianinha throughout life span (15-17). However, the

reduction in FFM caused by GHD is usually associated with an increase in absolute and % FM (31). The WT/MT subjects have, on the contrary, a trend toward reduction in FFM. It is possible that individual effects of GH have different thresholds, although we cannot explain the fact that FM in WT/MT would not be expected in a status of mild GH deficiency. Our results, however, are reminiscent of the finding that adults with partial GHD have a decrease in FFM, but no significant reduction in absolute and % FM (32). Whatever the mechanism, the lack of any difference in serum IGF-I between WT/MT and WT/WT suggests that these effects are not modulated by serum IGF-I.

The only biochemical difference between the two groups was in insulin level and in HOMA_{IR}, suggesting that WT/MT have increased insulin sensitivity, similarly to GHD subjects (16). In liver-specific IGF-I knockout animals (that have low serum IGF-I and high GH levels) blocking the effect of GH enhances insulin sensitivity, pointing to a direct effect of GH on insulin action (33). Although we did not directly evaluate insulin sensitivity by clamp method, it is conceivable that a mild reduction in GH secretion in the WT/MT group could cause an increase in insulin sensitivity despite any difference in serum IGF-I. As increased insulin sensitivity has been associated with longevity (34), future studies will concentrate on determining the life span of the WT/MT subjects.

Taken together, these data suggest that individual effects of GH may have different thresholds. It is conceivable that mild degree of reduction in GH secretion (as one may hypothesize occurs in WT/MT) may cause changes in insulin sensitivity and FFM, while reduction in somatic growth and liver IGF-I secretion, increase in FM, and changes in lipid metabolism may need more marked GH deficit. To test the hypothesis of reduced GH secretion, we are planning future studies to compare 24 h GH secretion profile of WT/MT and WT/WT subjects

It is important to point out that the homogeneity of the study subjects makes it possible that the changes in body composition we observed are not due to the presence of the *GHRHR* mutation, but of some other genetic trait that may be associated with this mutation in the Itabaianinha cohort. Studies on other large kindreds with different *GHRHR* mutations, such as the Pakistani one (12), may help to resolve this question. In addition, first degree relatives of GHD subjects were significantly over represented in the WT/MT group, adding a degree of genetic variability between the two groups. We do not believe this alters our results, as all the subjects belong to the same population. In addition, they all live in the same community, with similar environmental exposures.

In conclusion, our data show that heterozygosity for the IVS1 + 1G→A *GHRHR* mutation does not reduce adult height but causes changes body composition, and indirect evidence of increased insulin sensitivity. Future studies will aim to determine if the WT/MT status is associated with detectable reduction of GH secretion.

Acknowledgements

Supported by grant NIH 1 R01 DK065718, and by a grant from the Genenetech Center for Clinical Research in Endocrinology (both to R.S.). We are grateful to Mrs. Ivanilde Santana de Sousa for her secretarial assistance.

References

1. **Mullis PE** 2005 Genetic control of growth. *Eur J Endocrinol* 152: 11-31
2. **Salvatori R, Fan X, Phillips III JA, Espigares-Martin R, Martin de Lara I, Freeman KL, Plotnick L, Ashwal A, Levine MA** 2001 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* 86: 273-279.
3. **Salvatori R, Aguiar-Oliveira MH, Monte LBV, Hedges L, Santos NL, Pereira RMC, Phillips III JA** 2002 Detection of a recurring mutation in the human growth hormone releasing hormone receptor gene. *Clin Endocrinol* 57: 77-80.
4. **Jansen AC, van Wissen S, Defesche JC, Kastelein JJ** 2002 Phenotypic variability in familial hypercholesterolaemia: an update. *Curr Opin Lipidol* 13: 165-171.
5. **Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DE** 2000 Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 16: 281-296.
6. **Olney RC, Bükülmez H, Bartels CF, Prickett TCR, Espiner EA, Potter LR, and Warman ML** 2006 Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (*NPR2*) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1229-1232.
7. **Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GSH, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S** 2003 Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene *N Engl J Med* 348:1085-1095

8. **Salvatori R, Fan X, Phillips III JA, Prince M, Levine MA** 2001 Isolated growth hormone deficiency due to compound heterozygosity for 2 new mutations in the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Clin Endocrinol* 54: 681-687.
9. **Salvatori R, Fan X, Mullis PE, Haile A, Levine MA.** 2002 Decreased expression of the growth hormone-releasing hormone receptor gene due to a mutation in a Pit-1 binding site. *Mol Endocrinol* 16: 450-458.
10. **Salvatori R, Fan X, Veldhuis J, Couch R** 2002 Serum GH response to pharmacological stimuli and physical exercise in two siblings with two new inactivating mutations in the GH-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 147: 591-596.
11. **Baumann G, Maheshwari HG** 1997 The dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *Acta Paediatrica Supplement* 423: 33–38.
12. **Maheshwari HG, Silverman BL, Dupuis JE, Baumann G** 1998 Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: dwarfism of Sindh. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4065-4074.
13. **Salvatori R, Hayashida CH, Aguiar-Oliveira MH, Phillips III JA, Souza AHO, Gondo RG, Toledo SPA, Conceição MM, Prince M, Maheshwari HG, Baumann G, Levine MA** 1999 Familial dwarfism due to a novel mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 917-923.
14. **Barretto ESA, Gill MS, Freitas MES, Magalhães MMG, Souza AHO, Aguiar-Oliveira MH, Clayton PE** 1999 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* 51: 559-564.

15. **Gleeson HK, Souza AHO, Gill MS, Wieringa GE, Barretto ESA, Barretto-Filho JAS, Shalet SM, Aguiar-Oliveira MH, Clayton PE** 2002 Lipid profiles in untreated severe congenital isolated growth hormone deficiency through the lifespan. *Clin Endocrinol* 57: 89-95.
16. **Barreto-Filho JA, Alcantara MR, Salvatori R, Barreto MA, Sousa ACS, Bastos V, Souza AHO, Pereira RMC, Clayton PE, Gill MS, Aguiar-Oliveira MH** 2002 Familial isolated growth hormone deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2018-2023.
17. **Oliveira JLM, Marques-Santos C, Barreto-Filho JA, Filho RX, Britto AVO, Souza AHO, Prado CM, Oliveira CRP, Pereira RMC, Vicente TAR, Farias CT, Aguiar-Oliveira MH, Salvatori R.** 2006 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.
18. **Hayashida CY, Gondo RG, Ferrari C, Toledo SPA, Salvatori R, Levine MA, Ezabella MCL, Abelin N, Gianella Neto D, Wajchenberg BL** 2000 Familial growth hormone deficiency with mutated GHRH receptor gene: clinical and hormonal findings in homozygous and heterozygous individuals from Itabaianinha. *Eur J Endocrinol* 142: 557-563.
19. **Hamill PV, Drizd TA, Johnson CL, Reed RB, Roche AF, Moore WM** 1979 Physical growth: national center for health statistics percentiles. *Am J Clin Nutr* 32: 607-629.
20. **Du Bois D, Du Bois EF** 1989 Clinical calorimetry X. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Intern Med* 17: 863–871.

21. **WHO 1988 Measuring obesity**– classification, and description of anthropometric data. Copenhagen: WHO.
22. **Brodie DA, Eston RG** 1992 Body Fat Estimations by Electrical Impedance and Infra-Red Interactance. *Int J Sports Med*, 13: 5319-325.
23. **Trinder P** 1969 Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Path* 22: 158-161.
24. **Lansang MC, Williams GH, Carroll JS** 2001 Correlation between the glucose clamp technique and the homeostasis model assessment in hypertension. *Am J Hypertens* 14: 51–53.
25. **Gaylinn BD** 2002 Growth hormone releasing hormone receptor. *Receptors Channels*. 8: 155-162.
26. **Alba M, Salvatori R.** 2005 Naturally-occurring missense mutations in the human growth hormone-releasing hormone receptor alter ligand binding. *J Endocrinol* 186: 515-521.
27. **Goddard AD, Dowd P, Chernaused S, Geffner M, Gertner J, Hinz R, Hopwood N, Kaplan N, Plotnick L, Rogol A, Rosenfeld R, Saenger P, Mauras N, Hershkopf R, Angulo M. Attie K.** 1997 Partial growth-hormone insensitivity: the role of growth-hormone receptor mutations in idiopathic short stature. *J Pediatr* 131: S51-55.
28. **Salerno M, Balestrieri B, Matrecano E, Officioso A, Rosenfeld RG, Di Maio S, Fimiani G, Ursini MV, Pignata C** 2001 Abnormal GH receptor signaling in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3882-3888.
29. **Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J, Berg MA, Francke U** 1998 Stature in Ecuadorians heterozygous for growth hormone receptor gene E180 splice mutation does not differ from that of homozygous normal relatives. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2373-2375.

30. **Molitch ME, Clemmons DR, Malozowski S, Merriam GR, Shalet SM, Vance ML for The Endocrine Society's Clinical Guidelines Subcommittee.** 2006 Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1621-1634.
31. **Snel YEM, Doerga ME, Brummer R-JM, Zelissen PMJ, Koppeschaar HPF** 1995 Magnetic resonance imaging-assessed adipose tissue and serum lipid and insulin concentrations in growth hormone-deficient adults. Effect of growth hormone replacement. *Arterioscler Thrombs Vasc Biol* 15: 1543-1548.
32. **Murray RD, Adams JE, Shalet SM** 2004 Adults with partial growth hormone deficiency have an adverse body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1586-1591.
33. **Yakar S, Setter J, Zhao H, Standard B, Haluzik M, Glatt V, Buxsein ML, Kopchick JJ, LeRoith D** 2004 Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-I deficient mice. *J Clin Invest* 113: 96-105.
34. **Paolisso G, Gambardella A, Ammendola S, D'Amore A, Balbi V, Varricchio M, D'Onofrio F** 1996 Glucose tolerance and insulin action in healthy centenarians. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270: E 890-894.

Table 1: Stratification of the subjects heterozygous for the *GHRHR* mutation (WT/MT) and of the homozygous normal (WT/WT) by age and sex. p refers the probability of sex difference in each age group. NF= not feasible.

	(WT / MT) (n= 76)		(WT / WT) (n= 77)		
Age	Male	Female	Male	Female	P
25 – 30 YR	10	9	7	4	0.223
31 – 40 yr	4	11	3	12	0.402
41 – 50 yr	3	13	7	18	0.176
51 – 60 yr	5	12	6	13	0.531
61 – 70 yr	3	4	1	4	0.290
71 – 75 yr	0	2	1	1	NF
TOTAL	27	49	25	52	0.497

Table 2: Anthropometric data and standard deviation score of serum IGF-I levels (SDS IGF-I) (mean $\pm$ SD) in subjects heterozygous for the *GHRHR* mutation (WT/ MT), and in homozygous normal (WT/WT) individuals. n indicates the number of individuals for each variable.

	WT/MT	WT/WT	<i>p</i>
Age (yr)	43.76 $\pm$ 13.70 (n=76)	45.03 $\pm$ 11.89 (n=77)	0.539
Height (m)	1.57 $\pm$ 0,098 (n=76)	1.57 $\pm$ 0.977 (n=77)	0.915
SDS (height)	-1.64 $\pm$ 1.27 (n=76)	-1.66 $\pm$ 1.23 (n=77)	0.922
Weight (kg)	59.56 $\pm$ 11.18 (n=73)	65.85 $\pm$ 14.07 (n=77)	0.003
BMI (kg/m ²)	23.91 $\pm$ 4.34 (n=73)	26.35 $\pm$ 4.87 (n=77)	0.001
Body surface	1.59 $\pm$ 0.17 (n=73)	1.66 $\pm$ 0.20 (n=77)	0.030
SDS IGF-I	-0.63 $\pm$ 1.29 (n=72)	-0.93 $\pm$ 1.05 (n=77)	0.119

Table 3: Body composition data (mean $\pm$ SD) in subjects heterozygous for the *GHRHR* mutation (WT/MT), and in homozygous normal (WT/WT) individuals. n indicates the number of individuals for each variable.

	WT/MT	WT/WT	p
Fat mass %	20.53 $\pm$ 8.58 (n=67)	21.95 $\pm$ 9.02 (n=76)	0.336
Fat mass Kg	12.40 $\pm$ 6.32 (n=72)	14.53 $\pm$ 7.23 (n=76)	0.059
Fat free mass (Kg)	47.59 $\pm$ 10.03 (n=72)	51.41 $\pm$ 12.16 (n=76)	0.038
Triceps fold (mm)	16.70 $\pm$ 7.25 (n=67)	19.83 $\pm$ 8.40 (n=77)	0.019
Bicep fold (mm)	11.15 $\pm$ 6.49 (n=67)	14.66 $\pm$ 7.74 (n=77)	0.004
Subscapular fold (mm)	18.78 $\pm$ 7.44 (n=67)	22.80 $\pm$ 9.31 (n=77)	0.005
Suprailiac fold (mm)	17.52 $\pm$ 8.97 (n=67)	22.20 $\pm$ 9.50 (n=77)	0.003
Waist (cm)	83.14 $\pm$ 11.45 (n=72)	87.83 $\pm$ 12.17 (n=77)	0.017
Hip (cm)	94.81 $\pm$ 9.92 (n=72)	98.48 $\pm$ 9.05 (n=76)	0.020
Waist/Hip ratio	0.88 $\pm$ 0.078 (n=72)	0.88 $\pm$ 0.069 (n=76)	0.446

Table 4: Biochemical data (mean $\pm$ SD) in subjects heterozygous for the *GHRHR* mutation (WT/MT), and in homozygous normal (WT/WT) individuals. n indicates the number of individuals for each variable. HOMA_{IR} = Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance. Lp(a)= lipoprotein (a). CRP= C-Reactive Protein.

	WT/MT	WT/WT	p
Total cholesterol (mg/dl)	184.79 $\pm$ 41.17 (n=72)	179.77 $\pm$ 28.52 (n=77)	0.392
LDL cholesterol (mg/dl)	111.56 $\pm$ 30.79 (n=71)	109.06 $\pm$ 22.81 (n=77)	0.578
HDL cholesterol (mg/dl)	45.41 $\pm$ 11.40 (n=72)	47.16 $\pm$ 7.05 (n=77)	0.258
Triglycerides (mg/dl)	131.81 $\pm$ 107.11 (n=72)	119.35 $\pm$ 46.88 (n=77)	0.354
Fasting glucose (mg/dl)	92.84 $\pm$ 11.67 (n=72)	93.69 $\pm$ 9.78 (n=76)	0.631
Fasting insulin (μ U/ml)	3.06 $\pm$ 2.45 (n=69)	4.09 $\pm$ 2.73 (n=75)	0.004
HOMA _{IR}	0.71 $\pm$ 0.59 (n=69)	0.98 $\pm$ 0.67 (n=75)	0.014
Lp(a) (mg/dl)	30.78 $\pm$ 47.03 (n=65)	21.03 $\pm$ 29.86 (n=75)	0.750
CRP (mg/L)	3.32 $\pm$ 7.41 (n=65)	2.30 $\pm$ 2.34 (n=75)	0.974

APÊNDICE 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LOCAIS DE PESQUISA:

Universidade federal de Sergipe,
Aracaju, Brasil,

Identificação do Paciente

Título de projeto: **Conseqüências de deficiência isolada e vitalícia de hormônio de crescimento**

Número de Aplicação: 03-07-18-15

Patrocinador: **Institutos nacionais de Saúde dos Estados Unidos de América**

Investigador principal: **Roberto Salvatori, MD**

Data: **05 de julho de 2006**

1) O que você deve saber sobre o projeto de pesquisa:

- Estão lhe pedindo que participe de em um projeto de pesquisa.
- Este termo de consentimento explica o projeto de pesquisa.
- Por favor, leia cuidadosamente e faça perguntas sobre qualquer coisa que você não entenda.
- Se você não tiver perguntas agora, você pode perguntar depois.
- Se este projeto relaciona-se a um problema de saúde que você tem, nós explicaremos quais outros tratamentos podem ser dados fora desta pesquisa. Você devera entender essas opções antes de você assinar este termo.

2) Por que esta pesquisa está sendo feita?

Esta pesquisa está sendo feita para determinar as conseqüências que a falta do hormônio de crescimento por muitos anos provoca nas funções de corpo além de causar baixa estatura. Particularmente, nós desejamos estudar o efeito de falta de hormônio de crescimento na força e resistência dos músculos e ossos, no acúmulo de gordura, na função de coração e dos vasos sanguíneos.

Pessoas com baixa estatura devido à deficiência de hormônio de crescimento, **seus parentes de estatura normal e as pessoas normais que residem em Itabaianinha** e municípios vizinhos podem participar deste estudo. Um total de cerca de 400 serão testadas para ver se qualificam para o projeto, e aproximadamente 240 entrarão no mesmo.

3) O que acontecerá se você participar do projeto?

Se você concordar em participar deste projeto, nós lhe pediremos que faça o seguinte: Primeiro, nós colheremos algumas células dentro de sua boca esfregando um cotonete de algodão suavemente na sua bochecha durante aproximadamente 30 segundos. Isto nos permitirá obter seu DNA (material genético) a fim de determinar se você é afetado, ou porventura pode vir a transmitir à sua descendência, a troca genética que causa a baixa estatura nos anões de Itabaianinha.

Após a conclusão do teste genético, diremos o resultado a você, caso queira. Com base nos seus resultados, decidiremos em que parte do estudo você será incluído. Então nós lhe pediremos que seja examinado (em Itabaianinha ou na Universidade Federal de Sergipe em Aracaju). Para os exames em Aracaju, nós providenciaremos transporte de carro na noite anterior à prova e de retorno após o término do teste. Você passará a noite sem nenhum custo no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. Nós iremos:

- Medir sua pressão sanguínea, estatura e dobras de pele;
- Medir a força de seu músculo;
- Pedir que preenchesse (ou que responda caso não leia ou escreva) a um questionário sobre sua saúde, problemas médicos e hábitos de alimentação;
- Colher 6 colheres de chá de sangue;
- Obter uma amostra de sua urina;
- Realizar uma gravação da atividade elétrica (eletrocardiograma) além do ultra-som de seu coração e dos vasos sanguíneos de seu pescoço (uma técnica que usa ondas sonoras e os ecos delas, para criar um quadro das estruturas internas) antes e depois de exercício físico em uma esteira móvel. Nós também o colocaremos em uma mesa que será elevada e sua pressão sanguínea será medida antes e depois de elevar a mesa. Além disso, será pedido a alguns dos voluntários que façam um exame para medir a quantidade de hormônio de crescimento que eles produzem. Uma agulha é colocada no antebraço, colhe-se sangue e duas substâncias (Arginina e GHRH) são injetadas na veia na mesma agulha. Então, meia colher de chá de sangue será tirada novamente da agulha 30, 60, 90 e 120 minutos depois das injeções. O único efeito negativo que estas substâncias podem causar inclui uma rápida vermelhidão na face (que dura apenas poucos segundos).

Estes estudos só se aplicam a participantes estudados em Aracaju.

- Medir a força de seus músculos;
- Medir a força de osso através do ultra-som de seu calcanhar;
- Parte de seu sangue será armazenada para possível repetição de exames;
- Alguns dos voluntários (20 anões) serão convidados a serem tratados com hormônio do crescimento, recebendo uma injeção a cada 15 dias durante 6 meses. Um enfermeiro treinado irá até sua casa administrar a injeção e colher sangue periodicamente. Nós não esperamos que qualquer aumento em sua estatura aconteça. Já sabemos que tratamento com hormônio do crescimento causa crescimento apenas em crianças. Como não há nenhuma prova de que tratamento da deficiência de hormônio de crescimento em adultos seja benéfico, este tratamento será completamente experimental. Uma colher de chá de sangue será colhida todos os meses para ajustar a dose de hormônio de crescimento;

- Ao término de 6 meses de tratamento, será solicitado aos 20 participantes do estudo tratados com hormônio de crescimento que voltem a Aracaju e repitam os exames descritos acima, para que se determine se o hormônio de crescimento causou qualquer mudança nos achados que estamos estudando;
- 6 meses e meio após completar o tratamento com hormônio de crescimento, será pedido novamente a estes 20 participantes que retornem à Aracaju e completem o protocolo durante uma terceira visita ao mesmo hospital, com o objetivo de se determinar se as mudanças observadas depois de 6 meses de tratamento com hormônio de crescimento são passageiras ou permanentes.

Você receberá os resultados do estudo apenas se descobirmos qualquer problema médico que possa precisar de tratamento.

4) Quais são os riscos do estudo?

- Coleta de material do dentro da boca, consulta médica, medida das dobras de pele da pressão sanguínea, eletrocardiograma, ultra-som do coração, dos vasos sanguíneos e osso não trazem nenhum risco.
- Exercício físico na esteira pode ter um risco pequeno de revelar algum problema de coração, já preexistente como nas artérias do coração, por exemplo.
- Coleta de sangue pode ter um risco pequeno de sangramento, inchaço ou infecção. Pessoal treinado coletará o sangue com material estéril, reduzindo estes riscos
- Hormônio do crescimento pode causar um pouco de dor e inchaço no local de injeção que pode durar alguns dias. Além disso, hormônio de crescimento pode causar inchaço em seus pés e mãos, além de dor nas juntas, mãos e pés; se você tiver diabetes moderada, pode haver piorar do controle da mesma.
- Pode haver efeitos colaterais e desconfortos que ainda não são conhecidos. Durante este estudo, você será informado sobre qualquer fato novo que possa modificar sua opinião quanto a permanecer neste estudo.

5) O que acontecerá se você engravidar?

No primeiro dia do estudo, nós lhe perguntaremos se existe a possibilidade de você estar grávida. Se você responder sim, nós faremos um teste de gravidez em sua urina. Se você estiver grávida, nós não a incluiremos no estudo, porque gravidez pode naturalmente alterar muitos parâmetros que nós estamos estudando. Se você acha que pode ter ficado grávida enquanto utilizando o hormônio do crescimento, você deverá comunicar isto a nós imediatamente. Nós faremos um teste de gravidez em sua urina antes da próxima dose do hormônio de crescimento, e se você estiver grávida, o tratamento será interrompido. Nós ainda não conhecemos qualquer efeito negativo que o tratamento com hormônio do crescimento pode causar à saúde do seu bebê.

6) Há benefícios de estar no estudo?

Não há nenhum benefício direto a você de estar neste estudo. Sua participação neste estudo pode ajudar outros no futuro.

7) Quais as opções se você não quiser entrar no estudo?

O estudo é feito para a finalidade de pesquisa. Você não tem que participar do estudo. Se você não participar seu atendimento na Johns Hopkins ou na Universidade Federal de Sergipe não será afetado.

8) Você teria alguma despesa para estar neste estudo?

Os procedimentos do estudo serão providos sem nenhum custo a você.

9) Você será pago se participar deste estudo?

Você não será pago para participar deste estudo. Se lhe pedirem que vá para Aracaju, será provido gratuitamente transporte de carro e refeições.

10) Você pode deixar o estudo cedo?

- Se você desejar parar, por favor, nos fale imediatamente.
- Você deixando o estudo mais cedo não terá seu tratamento regular interrompido.
- Se você deixar o estudo cedo, o Johns Hopkins e a Universidade Federal de Sergipe podem usar ou distribuir sua informação de saúde que já tem se a informação for útil para este estudo ou qualquer atividade de seguimento.

11) O que nos levaria a retirá-lo mais cedo do estudo?

- Ficar no estudo ser prejudicial para sua saúde.
- Você precisar de tratamento não permitido neste estudo.
- Você não seguir as instruções.
- Você ficar grávida.
- O estudo ser cancelado.
- Pode haver outras razões que nós não sabemos neste momento para retirá-lo do estudo.

12) Que garantias serão usadas para proteger sua privacidade?

A Universidade Johns Hopkins tem uma política para proteger a informação de saúde que pode identificar você. Leis federais e estaduais também protegem sua privacidade. Qualquer pessoa que venha a ter informações sobre você deverá mantê-las confidencialmente. Essa parte do termo de consentimento diz quais informações a seu respeito poderão ser coletadas nesse estudo e quem poderá vê-las ou usá-las.

As únicas pessoas que irão saber que você está no estudo e que verão as informações sobre você são membros do grupo da pesquisa. Existem algumas exceções limitadas que são discutidas mais tarde nessa seção do termo de consentimento. Por outro lado, não será permitido que ninguém mais veja ou use as informações sobre você, ou fornecidas por

você durante o estudo, a não ser que você dê permissão por escrito. Quando o estudo terminar e os resultados forem publicados nenhuma informação vinculada a você será incluída a não ser que você dê permissão por escrito.

a. Que informações sobre você serão coletadas nesse estudo?

O grupo da pesquisa poderá coletar informações relacionadas à sua saúde ou condição médica.

Essas informações poderão incluir dados aprendidos das atividades e processos descritos nesse termo de consentimento.

Outras informações sobre vocês que o grupo de estudo poderá coletar incluem:

- seu nome
- seu endereço
- seu telefone
- sua data de nascimento
- sua Carteira de Identidade
- outros detalhes sobre você.

b. Quem na Universidade Johns Hopkins ou na Universidade Federal de Sergipe poderá ver ou divulgar informações sobre você, e por quê?

Na maioria dos casos, apenas informações que não podem identificar você serão usadas e divulgadas nesse estudo. Entretanto, em situações limitadas, o grupo da pesquisa poderá ter que partilhar suas informações devido a requerimento do governo ou de um juiz. Se isso acontecer, as pessoas da Universidade Johns Hopkins ou Universidade Federal de Sergipe que poderão ver ou divulgar informações sobre você incluem:

- membros dos comitês que revisam estudos de pesquisa
- sua equipe
- conselho legal
- e possivelmente outros funcionários da Universidade Johns Hopkins ou Universidade Federal de Sergipe.

c. Quem além da Universidade Johns Hopkins e Universidade Federal de Sergipe poderá ver informações sobre você?

Em situações limitadas, alguns grupos de governo fora da Universidade Johns Hopkins e Universidade Federal de Sergipe podem precisar ver sua informação de saúde. Mesmo assim, esses grupos geralmente não solicitam informações de uma forma que poderia identificá-lo. Esses grupos incluem setores do governo federal que têm dever legal de proteger participantes de pesquisas, como:

- o Departamento de Proteções de Pesquisas Humanas
- a Administração de Alimentos e Drogas

Outras pessoas e organizações envolvidas com esse estudo poderão ver sua informação de saúde. Essas incluem:

- o patrocinador desse estudo e as pessoas contratadas pelo patrocinador. O patrocinador é o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos.
- o Conselho de Monitorização de Informações de Segurança.
- pessoas que podem promover atividades de suporte administrativo ou similar para o grupo da pesquisa (cópia, entrada de dados, etc).

d. Por que esses dados serão usados e divulgados?

Seus dados serão usados e divulgados como descrito na parte do termo de consentimento para completar esse estudo e analisar os resultados.

e. O que acontecerá se você decidir não dar sua permissão para esse uso de sua informação de saúde?

Nós não podemos realizar esse estudo sem sua permissão para usar e divulgar sua informação pessoal de saúde para o propósito desse estudo. Você não é obrigado a nos dar permissão, mas se não der você não poderá participar desse estudo.

f. Quanto tempo dura essa autorização de privacidade?

Essa autorização para usar e divulgar informação de saúde não termina a não ser que você a cancele. Você poderá cancelá-la enviando uma notificação escrita para:

Johns Hopkins Institutional Review Board Office

1620 McElderry Street

Reed Hall, Suíte B130

Baltimore, MD 21205-1911 USA

Ou

Universidade Federal de Sergipe Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S/N, Bairro Sanatório, CEP: 49060-100, Aracaju-SE

Informações sobre você coletadas antes do cancelamento podem ser usadas e divulgadas se for necessário para o estudo e em qualquer seguimento necessário.

g. Sua informação de saúde está protegida após ser cedida a outros?

Johns Hopkins tem acordos com organizações para proteger o uso de informação de saúde. Contudo, se sua informação de saúde for dada a alguém não autorizada por essas políticas e leis existe uma chance remota que essa informação não permaneça protegida.

13) Quais outras coisas você deveria saber sobre esse estudo?

a. O que é o Comitê de Ética em Pesquisa(CEP) e de que forma ele protege você?

O CEP é composto por médicos, enfermeiros, éticos, não-cientistas e pessoas da comunidade local. O propósito do CEP é revisar as pesquisas humanas e proteger os direitos e bem-estar dos participantes desses estudos. Você pode contactar o CEP da Universidade Johns Hopkins ou, preferivelmente, da Universidade Federal de Sergipe caso tenha dúvidas sobre seus direitos como participante ou se achar que não está sendo devidamente tratado. O telefone da secretaria do CEP da Universidade Federal de Sergipe é (079) 2105-1805.

b. O que fazer se tiver dúvidas sobre o estudo?

Ligue para o co-orientador, Dr. Manuel H. Aguiar-Oliveira, pelo telefone (079) 3227-3026.

c. O que você deverá fazer ao se sentir prejudicado ou doente como resultado de participar do estudo?

Se você tiver um problema médico urgente relacionado com a sua participação no estudo, ligue para o co-orientador, **Dr. Manuel H. Aguiar-Oliveira**, pelo telefone (079) 3227-3026.

Se você se sentir prejudicado ou doente como resultado de participar do estudo, ligue para o co-orientador, **Dr. Manuel H. Aguiar-Oliveira**, pelo telefone (079) 3227-3026.

Os serviços médicos da Universidade Johns Hopkins e da Universidade Federal de Sergipe estarão disponíveis para você assim como eles estão para todos os indivíduos doentes ou lesados. A Universidade Johns Hopkins e a Universidade Federal de Sergipe não têm um programa para ressarcir-lo caso seja lesado ou apresente resultados ruins por estar no estudo. Você será financeiramente responsável pelo pagamento de qualquer tratamento ou hospitalização. A sua solicitação, sua companhia de seguro será responsável pelo pagamento de qualquer tratamento ou hospitalização.

d. O que acontece com as informações, os tecidos, sangue e amostras coletadas no estudo?

A Universidade Johns Hopkins é dedicada à descoberta das causas e curas de doenças. As informações, os tecidos, sangue e amostras de seu corpo coletadas durante esse estudo são importantes para o mesmo e para pesquisa futura. Se você participar desse estudo a Universidade Johns Hopkins ou seus parceiros externos nessa pesquisa possuirão as informações, tecidos e amostras de sangue coletados. Esse material será estudado, testado e usado por cientistas médicos. Se esse material ajudar a conduzir a criação de um produto ou idéia, quem criar este produto ou idéia será o proprietário do mesmo. Você não receberá qualquer benefício financeiro a partir da criação, desenvolvimento, uso ou venda do produto ou idéia.

e. Quais as Organizações que são parte da Johns Hopkins ?

Johns Hopkins é um grupo de organizações que inclui: a Universidade Johns Hopkins, o Hospital Johns Hopkins, o Centro Médico Johns Hopkins Bayview, o Hospital Geral do Condado de Howard e a Comunidade Médica Johns Hopkins.

O Instituto Kennedy Krieger é uma entidade legal separada que não é possuída ou controlada pela Johns Hopkins University ou qualquer outra organização do Johns Hopkins. Contudo, para estudos onde um protocolo do Instituto Kennedy Krieger seja revisado pelo CEP da Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins, a Johns Hopkins também inclui o Instituto Kennedy Krieger.

14) O que significa sua assinatura?

Assinando este termo de consentimento você não está desistindo de nenhum direito legal. Sua assinatura abaixo significa que você entende a informação contida neste termo de consentimento, você aceita as condições do termo e você concorda em participar do estudo.

NÓS LHE DAREMOS UMA CÓPIA DESTE TERMO DE CONSENTIMENTO.

NÃO É VÁLIDO SEM O
CARIMBO DE
CERTIFICAÇÃO DO CEP

Carimbo

PARA OS ADULTOS CAPAZES DE DAR CONSENTIMENTO:

Assinatura do participante

Data

PARA ADULTOS NÃO CAPAZES DE DAR CONSENTIMENTO:

Assinatura do responsável

Data

Relação do Responsável com o participante:

ASSINATURA(S):

Assinatura de Pessoa que Obtém Consentimento
(Investigador ou pessoa designada pelo CEP)

Data

Testemunha (Opcional a menos que o CEP ou Patrocinador solicite)

Data

NOTA: UMA CÓPIA DO TERMO DE CONSENTIMENTO ASSINADA DEVE SER MANTIDA PELO INVESTIGADOR PRINCIPAL E UMA CÓPIA DO TERMO DE CONSENTIMENTO DEVE SER COLOCADA EM O REGISTRO DO PACIENTE

PARA USO DE ESCRITÓRIO SÓ: ESTUDO APROVADO PARA MATRÍCULA DE: Só Adultos

APÊNDICE 2. Medidas Antropométricas

Grupo 1: Heterozigoto (WT/MT)

grupo	sexo	idade	peso	Altura	EDPai	IMC	SC
1	1	54	36,9	1,37	-4,45	19,57	1,18
1	1	26	46,7	1,58	-1,11	18,78	1,44
1	1	67	59,7	1,51	-2,11	26,04	1,55
1	1	25	49,9	1,60	-0,78	19,61	1,54
1	1	60	60,1	1,56	-1,45	24,85	1,59
1	1	55	51,3	1,57	-1,11	20,76	1,49
1	1	65	88,6	1,42	-3,62	43,94	1,76
1	1	59	87,9	1,59	-0,78	34,64	1,90
1	1	55	70,6	1,56	1,28	29,01	1,71
1	1	38	61,5	1,59	-0,78	24,33	1,63
1	1	35	54,9	1,50	-2,28	24,30	1,49
1	1	45	51,6	1,54	-1,61	21,76	1,48
1	1	31	54,6	1,65	0,06	20,18	1,59
1	1	48	54	1,46	-3,12	25,47	1,45
1	1	26	59,5	1,66	0,22	21,72	1,65
1	1	43	55,7	1,44	-3,45	27,05	1,45
1	1	58	59,9	1,52	-2,11	26,06	1,55
1	1	57	53,3	1,46	-2,95	24,94	1,44
1	1	51	71,1	1,57	-1,11	28,84	1,72
1	1	31	62,7	1,59	-0,78	24,74	1,64
1	1	39	69,9	1,56	-1,28	28,45	1,69
1	1	62	51,30	1,56	-1,28	21,08	1,49
1	1	56	59,4	1,48	-2,61	27,01	1,53
1	1	49	48,8	1,41	-3,95	24,62	1,35
1	1	45	48,3	1,53	-1,95	20,71	1,46
1	1	49	59,2	1,55	-1,45	24,64	1,58
1	1	39	64,9	1,61	-0,44	25,04	1,68
1	1	43	65,6	1,53	-1,78	28,02	1,63
1	1	57	55,8	1,50	-2,45	24,90	1,49
1	1	38	50,8	1,58	-0,94	20,35	1,50
1	1	68	53,5	1,47	-2,78	24,76	1,45
1	1	49	58,9	1,48	-2,78	27,07	1,53
1	1	45	61,8	1,54	-1,61	26,02	1,60
1	1	29	41,9	1,58	-1,11	16,89	1,37
1	1	38	47,6	1,50	-2,28	21,10	1,41
1	1	46	38,1	1,44	-3,28	18,37	1,24
1	1	38	54,2	1,52	-1,95	23,34	1,49
1	2	54	56,6	1,62	-2,41	21,67	1,61
1	2	27	75,9	1,65	-1,80	27,88	1,83
1	2	62	60	1,58	-2,86	24,03	1,61
1	2	52	77,7	1,80	0,48	23,98	1,97

1	2	53	57,8	1,60	-2,54	22,47	1,59
1	2	28	63,5	1,74	-0,43	20,93	1,76
1	2	59	52,3	1,58	-3,02	21,08	1,51
1	2	48	72,8	1,65	-1,80	26,74	1,80
1	2	29	57,6	1,67	-1,65	20,78	1,60
1	2	63	56,1	1,56	-3,17	23,05	1,54
1	2	27	79,3	1,76	-1,3	25,60	1,95
1	2	29	34,8	1,36	-6,21	18,81	1,19
1	2	52	68,6	1,60	-2,56	26,80	1,72
1	2	31	59,3	1,70	-1,19	20,54	1,68
1	2	35	72,3	1,80	0,33	22,44	1,91
1	2	26	75	1,80	0,48	23,15	1,94
1	1	29	66,7	1,64	0,06	24,86	1,72
1	1	56	60	1,56	-1,28	24,65	1,59
1	1	36	64,2	1,70	1,06	22,21	1,75
1	1	44	51,6	1,58	-0,94	20,67	1,50
1	2	42	61	1,71	-0,89	20,86	1,71
1	2	30	53,1	1,68	-1,34	18,81	1,59
1	1	75	49	1,59	-0,78	19,38	1,48
1	1	75	85,8	1,49	-2,28	38,91	1,79
1	1	45	60,1	1,59	-0,94	23,92	1,61
1	2	25	53,9	1,57	-1,10	21,95	1,52
1	2	47	56,6	1,59	-0,78	22,39	1,57
1	2	61	50,9	1,50	-2,28	22,56	1,44
1	1	40	53	1,65	-1,80	19,47	1,57
1	1	26	60	1,54	-1,61	25,30	1,56
1	1	25	69,1	1,59	-0,78	27,33	1,72
1	1	25	46,1	1,50	-2,28	20,49	1,38
1	2	26	84,3	1,84	0,50	24,90	2,08
1	2	25	66,9	1,76	0,18	21,60	1,81
1	2	32	70,5	1,62	-2,25	26,86	1,75
1	2	39	49	1,58	-2,86	19,63	1,47
1	1	49	58	1,55	-1,45	24,14	1,56
1	1	25	58	1,61	-0,44	22,38	1,60
1	1	55	61	1,44	-3,28	29,42	1,51

Grupo 2: Homozigotos Normais (WT/WT)

grupo	sexo	idade	peso	Altura	EDPai	IMC	SC
2	1	39	58,8	1,59	-0,78	23,2	1,80
2	1	58	70,1	1,48	-2,10	32,0	1,63
2	1	53	55,8	1,49	-2,61	25,3	1,47
2	1	36	52,4	1,59	-0,78	20,65	1,49
2	1	31	51,8	1,61	-0,44	19,91	1,52
2	1	33	49,7	1,54	-1,61	20,87	1,45
2	1	49	51,3	1,50	-2,28	22,74	1,44
2	1	35	54,6	1,54	-1,61	22,93	1,51
2	1	47	70,9	1,63	-0,28	26,82	1,75
2	1	63	54,6	1,52	-2,11	23,79	1,49
2	1	48	64,4	1,43	-3,62	31,71	1,53
2	1	25	60,1	1,54	-1,78	25,74	1,57
2	1	66	61,2	1,54	-1,78	25,76	1,58
2	1	56	59,4	1,57	-1,11	24,10	1,59
2	1	37	55,5	1,57	-1,28	22,68	1,54
2	1	49	61,5	1,47	-2,78	28,46	1,54
2	1	39	73,9	1,47	-2,95	34,25	1,66
2	1	56	54,6	1,41	-3,78	27,31	1,42
2	1	46	58	1,62	-0,28	22,10	1,61
2	1	42	67,6	1,50	-2,46	30,21	1,62
2	1	53	75,5	1,51	-2,11	33,11	1,71
2	1	49	68,4	1,50	-2,28	30,32	1,63
2	1	55,0	64,2	1,69	0,72	22,61	1,73
2	1	47	109,7	1,60	-0,61	42,85	2,10
2	1	43	69,9	1,55	-1,61	29,28	1,68
2	1	31	68,8	1,62	-0,28	26,22	1,73
2	1	74	62,5	1,45	-3,28	29,93	1,53
2	1	52	86	1,51	-2,21	37,57	1,81
2	1	49	49,8	1,47	-2,95	23,17	1,40
2	1	50	59,5	1,45	-3,12	28,30	1,50
2	1	53	86,1	1,54	-1,78	36,54	1,83
2	1	49	59,3	1,45	-3,12	28,05	1,50
2	1	65	59,9	1,48	-2,78	27,46	1,53
2	1	57	36,8	1,41	-3,78	18,43	1,18
2	1	46	44,5	1,48	-2,78	20,45	1,34
2	1	48	84,4	1,64	0,06	31,30	1,90
2	1	42	62,1	1,56	-1,45	25,68	1,61
2	1	42	68,6	1,68	0,72	24,31	1,77
2	1	45	40,7	1,41	-3,95	20,50	1,25
2	1	53	62,8	1,55	-1,45	26,04	1,61
2	1	37	52,7	1,53	-1,78	22,51	1,48
2	1	63	77,5	1,54	-1,61	32,68	1,76
2	1	55	88,5	1,61	-0,44	34,14	1,92
2	1	47	72,5	1,59	-0,78	28,68	1,75
2	1	26	84,1	1,68	0,72	29,8	1,94

2	1	34	68,1	1,54	-1,61	28,64	1,66
2	1	54	65,6	1,53	-1,78	28,02	1,63
2	1	25	44	1,51	-2,11	19,30	1,37
2	1	34	61,5	1,64	-0,11	23,01	1,66
2	1	29	37,2	1,35	-4,79	20,41	1,15
2	1	54	66,70	1,65	-0,06	24,65	1,72
2	1	37	62,9	1,62	-0,28	23,97	1,66
2	2	43	119,2	1,73	-0,58	39,64	2,30
2	2	28	70	1,71	-0,89	23,88	1,82
2	2	50	49	1,47	-4,69	22,83	1,40
2	2	53	62,7	1,62	-2,41	24,04	1,66
2	2	61	68,9	1,56	-3,17	28,20	1,70
2	2	25	89,1	1,79	0,18	27,96	2,08
2	2	46	72,4	1,63	-2,28	27,42	1,77
2	2	41	71,9	1,65	-1,95	26,57	1,78
2	2	59	79,2	1,67	-1,49	28,4	1,88
2	2	32	63,5	1,79	0,18	19,93	1,80
2	2	45	58,7	1,70	-1,19	20,41	1,67
2	2	31	54	1,61	-2,41	20,83	1,56
2	2	27	77,9	1,71	-0,89	26,64	1,90
2	2	55	80,4	1,61	-2,41	30,9	1,85
2	2	24	62,3	1,66	-1,65	22,55	1,69
2	2	72	72,8	1,65	-1,80	26,74	1,80
2	2	41	70,2	1,82	0,48	21,29	1,90
2	2	47	67,5	1,63	-2,10	25,41	1,73
2	2	53	72,1	1,60	-2,56	28,16	1,75
2	2	51	57,7	1,69	-1,19	20,2	1,65
2	2	29	80,1	1,67	-1,49	28,72	1,89
2	2	56	71,2	1,64	-1,95	26,34	1,77
2	2	25	81,2	1,73	-0,73	27,29	1,94
2	2	39	68,9	1,66	-1,65	24,94	1,77
2	2	29	62,9	1,71	-0,89	21,51	1,73

APÊNDICE 3. Exames Laboratoriais

Grupo 1: Heterozigoto (WT/MT)

grupo	IGF-I	EDPI GF-I	Glice	CT	TG	HDLc	LDLc	Insuli	HOMA ir	LPa	CPRus
1	77,57	-1,544	88	188	108	44	123	1,10	0,24	5,40	0,70
1	117,32	2,2,361	87	143	82	43	84	8,10	1,75	30,20	0,20
1	126,6	-0,549	96	220	230	43	131	12,60	3,01	87,90	2,0
1	248,43	-1,126	99	117	90	44	55	8,60	2,12	2,50	0,30
1	138,70	-0,304	100	199	131	39	134	4,30	1,07	65,90	1,20
1	163,96	0,208	110	176	110	47	107	0,90	0,25	2,0	0,60
1	16,15	-2,790	93	214	165	50	131	3,40	0,79	5,60	4,80
1	30,61	-2,496	85	204	76	51	138	2,60	0,55	2,0	1,30
1	160,0	0,127	94	183	291	37	98	5,60	1,31	5,30	4,0
1											
1	158,86	-0,772	87	144	54	46	88	1,20	0,08	8,20	0,40
1	178,72	-0,034	89	211	139	43	141	2,70	0,60	95,10	0,90
1	270	0,686	82	161	114	54	85	0,10	0,02	6,70	0,70
1	148,15	-0,667	80	176	117	47	106	1,50	0,30	3,20	1,90
1	262,95	-0,989	100	171	76	50	106	7,60	1,89	86,0	57,10
1	116,73	-1,318	88	159	97	36	104	4,40	0,96	2,0	6,10
1	93,85	-1,213	97	198	94	67	113	3,0	0,72	36,70	3,0
1	37,27	-2,361	108	152	94	53	81	3,20	0,86	2,60	2,60
1	36,33	-2,380	90	151	80	46	89	0,10	0,02	2,0	1,60
1	240,0	0,292	84	145	97	36	90	0,40	0,08	9,80	0,30
1	117,62	-1,313									
1	78,96	-1,516	83	189	163	41	116	4,30	0,89	2,0	6,30
1	104,40	-1,000									
1	265,02	1,751	93	214	161	54	128	2,0	0,46	2,0	0,20
1	83,72	-2,001	87	160	88	49	94	1,30	0,28	2,0	0,30
1	91,26	-1,845	88	197	106	48	128	3,10	0,68	3,90	9,90
1	191,38	-0,345	87	214	82	48	150	1,30	0,28	165,0	1,10
1	195,30	0,308	91	212	321	48	100	5,20	1,18	2,0	0,80
1	82,66	-1,440	100	221	114	43	146	3,0	0,75	3,30	5,90
1	113,23	-1,370	85	170	68	46	111	2,20	0,47	2,0	1,0
1	104,40	-1,000	92	209	131	43	140	3,40	0,78	2,0	3,90
1	162,93	-0,361	160	213	208	56	116	4,30	1,71	4,40	2,60
1	152,15	0,584	95	220	90	55	147	3,0	0,71	100,0	2,0
1	260,90	0,069	90	186	84	53	117	1,30	0,29	74,10	18,60
1	136,43	-0,878	82	198	79	47	136	1,30	0,13	84,20	0,20
1	27,37	-3,168	76	176	85	52	107	0,70	0,13	8,30	1,90
1	296,34	1,032	86	142	60	44	86	5,50	1,18	22,20	0,60
1	112,94	-0,826	103	207	126	49	133	1,20	0,31	2,0	2,30
1	156,05	0,993	89	168	159	45	92	3,40	0,75	2,90	2,80
1	92,43	-1,242	87	195	132	39	130	0,10	0,02	6,30	0,20
1	210,0	1,140	97	180	130	38	116	5,20	1,26	2,70	0,90

1	98,0	-1,129	101	366	866	20		2,40	0,60	7,80	4,50
1	292,31	-1,114	93	137	73	36	87	2,50	0,58	216,0	0,50
1	48,95	-2,124	84	171	65	57	101	0,10	0,02	78,50	4,70
1	220,0	0,819	109	181	229	34	102	3,70	1,0	2,0	1,80
1	209,13	-0,338	90	133	63	43	78	0,10	0,02	3,0	5,30
1	132,68	-0,426	100	192	92	54	120	2,90	0,72	188,0	0,80
1	131,17	-1,299	83	200	241	43	109	4,70	0,97	2,0	1,40
1	159,86	-0,946	84	130	112	36	72	2,30	0,48	2,0	2,50
1	110,39	0,878	94	157	128	35	97	1,60	0,37	2,0	0,40
1	163,96	-0,467	97	159	125	47	87	1,90	0,46	5,50	0,20
1	249,89	0,370	108	248	121	63	161	0,70	0,19	64,6	0,70
1	159,45	0,951	98	203	169	54	116	2,0	0,49	2,0	0,50
1	370,0	0,738	112	175	50	36	129	6,50	1,81	89,50	1,10
1	50,0	-2,103	94	301	119	30	212	0,10	0,02	25,30	7,30
1	400	2,392	96	260	61	52	196	5,10	1,22	103,0	0,50
1	180	-0,008									
1	280,0	2,062	101	134	66	33	88	1,30	0,33	22,90	0,60
1	220	-0,314	99	134	66	33	88	0,10	0,02	37,60	4,70
1	78,0	-1,535	96	155	265	35	47	1,90	0,45	6,90	4,20
1	25,0	-2,610	109	214	217	40	131	5,10	1,36	7,40	6,70
1	230,0	1,026	88	209	118	62	124	3,30	0,72	6,40	0,80
1	89,0	-2,886	91	145	59	43	91	0,10	0,02	69,60	1,0
1	120,0	-1,250	93	204	125	39	140	0,50	0,12	7,50	1,20
1	37,0	-2,367	92	229	163	41	156	1,70	0,39	38,0	0,30
1	220,0	0,819	93	188	101	105	63	4,80	1,11	12,60	0,90
1	310,0	0,530	84	182	79	72	95	2,90	0,61	16,20	5,30
1	500,0	1,145	93	146	64	35	99	7,20	1,67	32,0	6,60
1	330,0	0,374	82	135	182	44	55	5,20	1,06	2,0	0,30
1	350,0	-0,611	96	153	135	42	84				
1	380,0	-0,527	101	164	100	48	96				
1	170,0	-0,408	81	219	136	45	147	6,23	1,26		
1	69,0	-1,394	80	114	73	33	67	1,30	0,26		
1	72,0	-2,244	85	221	91	32	171				
1	350,0	0,806	75	143	85	35	91	3,52	0,66		
1	28,0	-2,549	75	210	120	39	124	6,59	1,23		

Grupo 2: Homozigotos Normais (WT/WT)

grupo	IGF-I	EDPI GF-I	Glice	CT	TG	HDLc	LDLc	Insuli	HOMA ir	LPa	CPRus
2	152,31	-0,845	90	122	106	48	53	1,80	0,40		9,80
2	76,98	-1,556	97	231	248	42	140	6,30	1,52	10,30	3,60
2	90,34	-1,285	94	232	98	50	163	2,60	0,61	10,90	0,60
2	188,01	-0,389	91	185	161	45	108	1,70	0,39	16,0	2,20
2	193,33	-0,319	97	191	130	40	125	4,20	1,01	2,0	1,80
2	207,02	-0,137	93	183	80	57	110	2,40	0,56	71,10	2,20
2	36,02	-2,989	89	117	41	46	63	1,70	0,38	2,0	0,90
2	310,01	1,211	88	154	88	45	92	2,30	0,50	4,80	3,20
2	109,84	-1,460	101	177	118	43	111	6,50	1,63	5,90	0,40
2	170,75	0,345	99	199	98	46	134	13,20	3,25	4,70	2,20
2	299,85	2,473	85	203	177	52	116	6,20	1,31	3,20	4,60
2	78,16	-2,730	85	157	83	43	98	3,40	0,72	4,0	0,30
2	50,64	-2,090	100	153	162	55	66	6,40	1,59	3,80	0,80
2	27,13	-2,567	104	186	103	46	120	2,90	0,75	18,90	0,70
2	165,63	-0,683	90	157	62	46	99	0,30	0,07	2,0	2,50
2	159,62	-0,430	104	174	191	40	96	6,40	1,66	14,20	3,10
2	108,45	-1,430	102	217	100	54	143				
2	138,70	-0,304	96	218	108	61	136				
2	94,32	-1,782	85	176	66	56	104	2,20	0,47	44,20	0,50
2	166,26	-0,292	79	240	153	54	156	3,50	0,69	45,60	6,0
2	58,49	-1,931	109	170	83	42	112	5,20	1,41	2,0	11,80
2	165	-0,318	87	183	104	60	103	2,90	0,63	9,20	2,90
2	230	1,1574	107	173	144	41	104	4,50	1,20	3,90	3,80
2	120,95	-1,230	91	196	105	53	122	6,30	1,43	24,50	3,70
2	70,25	-2,280	92	186	95	51	116	2,60	0,60	4,80	5,60
2	263,73	0,604	85	184	81	57	111	4,0	0,85	47,10	1,0
2	10,61	-2,902	108	231	173	53	144	3,80	1,02	18,30	5,40
2	163,57	0,200	84	212	120	46	142	12,0	2,51	12,70	0,50
2	114,97	-1,354	81	224	280	41	127	2,50	0,50	2,0	0,20
2	102,3	-1,042	89	232	177	52	145	5,60	1,24	2,0	0,80
2	102,82	-1,032	109	157	47	48	100	7,60	2,06	5,70	4,0
2	164,38	-0,331	94	229	134	51	152	2,60	0,61	7,80	0,70
2	151,96	-0,035	100	189	138	49	113	3,60	0,90	2,0	0,40
2	60,92	-1,880	75	187	145	60	98	1,10	0,21	16,0	1,60
2	220,0	0,819	87	144	102	47	77	1,30	0,28	47,4	0,20
2	122,49	-1,198	95	146	141	46	72	7,70	1,82	2,0	3,10
2	119,43	-1,262	91	175	154	49	96	0,70	0,16	43,20	0,30
2	52,39	-2,650	96	192	102	45	127	3,30	0,79	5,30	5,60
2	78,56	-2,108	90	197	146	47	121	0,70	0,16	5,90	4,10
2	137,47	-0,329	107	190	74	55	121	8,70	2,32	24,50	0,20
2	189,45	-0,370	83	152	73	51	87	1,10	0,23	28,70	1,10
2	182,84	0,591	94	200	143	43	129	4,60	1,08	160,0	1,30
2	34,51	-2,417	95	176	156	47	98	4,50	1,06	67,60	1,40
2	90,11	-1,869	114	224	195	58	127	6,60	1,87	4,0	1,70

2	186,35	-0,933	79	167	113	35	110	6,20	1,22	23,80	2,50
2	143,71	-0,970	88	222	180	43	143	9,30	2,04	72,20	0,70
2	22,22	-2,666	80	199	160	52	115	3,30	0,66	19,20	4,80
2	266,06	-1,525	85	158	35	53	98	2,80	0,59	2,0	1,20
2	124,06	-1,228	99	126	94	36	72	4,30	1,06	95,9	1,20
2	163,75	-0,841		147	79	45	87	0,90		52,40	5,20
2	96,0	-1,170	95	186	152	44	112	2,90	0,69	31,20	2,60
2	163,96	-0,705	83	149	114	34	93	6,70	1,38	2,0	3,30
2	126,28	-1,120	109	156	136	46	83	9,50	2,58	17,50	3,80
2	171,62	-0,801	84	143	57	48	84	0,10	0,02	13,70	1,30
2	109,0	-0,906	85	169	81	50	103	3,70	0,78	2,0	1,70
2	166,47	0,259	102	163	71	40	109	3,30	0,84	78,30	0,90
2	83,08	-1,432	96	196	210	37	117	5,80	1,39	4,0	2,70
2	268,68	-0,518	95	166	70	53	99	1,60	0,38	7,0	0,40
2	138,35	-0,870	105	171	104	39	112	4,40	1,15	4,60	9,50
2	222,17	0,864	102	182	133	49	107	8,50	2,16	22,20	0,90
2	51,51	-2,072	121	166	168	41	92	2,80	0,84	5,30	1,50
2	142,44	-0,677	92	168	95	54	95	1,10	0,25	3,40	0,20
2	140,29	-0,830	87	175	66	53	109	1,30	0,28	27,60	0,70
2	172,93	-0,380	77	185	107	66	98	4,0	0,77	57,10	2,70
2	208,33	-0,349	78	120	87	42	61	3,10	0,60	5,10	1,80
2	35,71	-2,393	91	184	169	46	105	6,20	1,40	2,0	1,80
2	222,60	-0,922	83	157	106	36	100	1,90	0,39	2,0	0,40
2	73,54	-1,625	86	127	90	39	70	3,20	0,68	4,40	1,60
2	126,60	-0,549	107	158	87	51	90	1,30	0,35	8,60	0,50
2	70,97	-2,265	94	201	164	44	125	5,0	1,17	35,40	0,40
2	153,31	-0,007	95	201	212	30	129	6,40	1,51	2,0	0,20
2	130,18	-0,477	91	177	111	37	118	2,50	0,57	2,0	0,60
2	114,97	-1,499	94	188	82	40	132	3,90	0,91	2,0	0,80
2	136,26	-0,353	82	204	95	57	128	1,20	0,24	2,0	1,0
2	184,47	-1,281	104	177	86	43	117	9,0	2,33	10,20	7,10
2	170,32	-0,221	112	188	106	50	117	1,20	0,33	2,0	1,0
2	257,85	-1,414	108	146	85	38	91	2,30	0,62	127,0	0,90

APÊNDICE 4. Medidas e Pregas Cutâneas

Grupo 1: Heterozigoto (WT/MT)

grupo	% Gord	Gord KG	MSSA Magr	Bícep	Trícep	Sub Escap	Supra Pub	Cint	Quad	Relaç C/Q
1	19,40	7,20	29,7	8	15	14	9	70	80,5	0,87
1	22,20	10,40	36,3	6	11	14	9	69	84,5	0,82
1	25,50	15,30	44,4	15	15	15	26	96,5	92,5	1,04
1	6,60	3,30	46,7	5	9	10	5	63	82,5	0,76
1	23,70	14,20	45,9	7	25	22	24	91	100	0,91
1	21,10	10,80	40,2	5	13	13	13	74	91,5	0,81
1	34,70	30,70	57,9	29	30	37	48	124	145	0,86
1	24,30	21,40	66,5	27	27	28	34	105	114	0,92
1	33,90	23,90	46,7	11	25	18	24	111	113	0,98
1	22,30	13,70	47,8	13	17	25	22	87	95	0,92
1	25,10	13,80	41,2	15	25	16	20	83	93,5	0,89
1	22,10	11,50	40,5	7	19	23	15	81	90,5	0,90
1	13,60	7,40	47,2	5	12	8	9	72,5	93	0,78
1	25,30	13,70	40,3	15	19	26	18	76	93	0,82
1	15,30	9,20	50,8	10	19	16	15	76,5	98,5	0,78
1	31,10	17,30	38,4	18	24	24	25	87,5	95	0,92
1	25,0	15,0	44,9	13	22	21	18	89	97,5	0,91
1	31,70	16,80	36,2	20	25	29	26	85	94,5	0,90
1	30,10	21,40	66,5	22	21	23	29	99	100	0,99
1	26,90	16,90	45,8	7	19	17	12	84	100	0,84
1	26,0	17,90	51,1	25	32	21	30	90,5	102,5	0,88
1	22,20	11,30	39,7	9	21	13	19	79,5	92	0,86
1	28,60	17,0	42,4	15	20	21	25	90	98	0,92
1	29,90	14,60	34,2	9	15	18	18	78,5	88,5	0,89
1	18,50	8,90	39,4	9	15	9	14	75	83,5	0,90
1	29,70	17,60	41,6	16	23	23	26	90	96,5	0,93
1	26,60	17,30	47,6	11	15	28	22	89	97,5	0,91
1	25,0	16,40	49,2	25	26	28	26	88	101	0,87
1	26,10	14,60	41,2	18	29	35	34	94	95	0,99
1	18,60	9,40	41,4	10	16	17	14	74	93,5	0,79
1	27,30	14,60	38,9	18	28	21	25	82	96,5	0,85
1	28,40	16,70	42,2	16	20	27	24	80	94,5	0,85
1	27,30	16,90	44,9	12	20	22	23	82,5	97,5	0,85
1				6	11	12	7	64,5	86,5	0,75
1	25,90	12,30	35,3	11	14	21	15	72	86	0,84
1	26,30	10,0	28,1	8	13	9	12	68	82	0,83
1	26,50	14,40	39,8	13	16	23	22	75,5	92	0,82
1	15,10	8,50	48,1	4	10	11	13	82	89,5	0,92
1	23,90	18,10	57,8	16	21	23	26	90	104	0,87
1	21,0	12,60	47,4	4	10	11	12	87	91,5	0,95
1	10,0	7,80	69,9	10	12	24	11	96	98	0,98

1	16,0	9,20	48,6	11	13	13	9	85	90	0,94
1	0,40	0,30	63,7	3	6	8	4	76,5	95	0,81
1	7,70	4,0	48,3	3	5	7	4	77	87	0,89
1	18,0	13,10	59,7	7	16	18	28	90	99,5	0,90
1	6,30	3,70	54,3	3	7	16	9	77,5	91	0,85
1	19,20	10,80	45,3	8	12	16	21	86,5	90	0,96
1	16,70	13,20	66,1	11	8	17	12	94	97,5	0,96
1	13,20	4,60	30,2	4	6	7	5	63	75	0,84
1	8,80	6,0	62,5	7	8	21	21	96	98,5	0,97
1	4,40	2,60	56,7	6	8	14	10	75,5	88	0,86
1	10,10	7,30	65	15	13	16	16	82	95,5	0,86
1	14,0	10,50	64,5	10	13	16	11	86	100,5	0,86
1	24,0	16,20	50,9	20	25	22	23	87	105	0,83
1	18,40	10,0	44,6							
1	17,60	11,30	52,9	15	28	26	27	73,5	103	0,71
1	20,50	10,60	41	12	19	15	11	72	89,5	0,80
1	10,10	6,20	54,8	4	15	17	8	88	93	0,95
1	6,90	3,70	49,4	5	6	11	5	67	87,5	0,77
1	26,80	13,10	35,9	11	18	20	20	99,5	84	1,18
1	41,10	35,30	50,5	27	36	40	35	113	120	0,94
1	27,30	16,50	43,8	12	20	20	16	79	96,5	0,82
1	12,30	6,60	47,3	9	11	7	4	72	80	0,90
1	11,80	6,70	49,9	4	8	11	6	82	87	0,94
1	14,40	7,30	43,6	3	5	10	6	79	87	0,91
1	19,10	10,10	42,9	6	12	22	17	73	90	0,81
1	30,70	18,40	41,5	22	33	24	26	77	102	0,75
1	31,20	21,60	47,5	17	19	34	25	88	104	0,85
1	25,90	11,90	34,2	14	14	20	18	76	89,5	0,85
1	10,70	9,0	75,3	4	15	19	17	82	107	0,77
1	4,20	2,80	64,1	3	12	12	7	73	94	0,78
1		15,60	54,9					94	98	0,96
1		2,0	47					72	82,5	0,87
1		14,90	43,7					81	95	0,85
1		11,0	47					77	98	0,79
1		21,80	39,2					93	97	0,96

Grupo 2: Homozigoto Normal (WT/WT)

grupo	% Gord	Gord KG	MSSA Magr	Bícep	Trícep	Sub Escap	Supra Pub	Cint	Quad	Relaç C/Q
2	25,30	13,80	45	16	24	23	17	80	94	0,85
2	30,90	21,70	48,4	27	35	40	35	95	112,5	0,84
2				24	22	24	27	92	100,5	0,92
2	11,80	6,20	46,2	19	19	22	17	75	92,5	0,81
2	18,40	9,50	42,3	15	27	17	21	75	95,5	0,79
2	24,50	12,20	37,5	14	19	24	21	74	86	0,86
2	26,50	13,10	38,2	12	19	22	19	72	89,5	0,80
2	26,30	14,40	40,2	15	17	14	25	84	89,5	0,94
2	23,0	16,30	54,6	21	20	19	25	95,5	104,5	0,91
2	25,20	13,80	40,8	12	18	22	23	84	91	0,92
2	30,20	19,4	45	19	19	27	30	93	99,5	0,93
2	27,30	16,40	43,7	12	22	20	28	87	98,5	0,88
2	24,20	14,80	46,4	11	21	22	20	94	101,5	0,93
2	20,70	12,20	46,8	18	17	23	21	90	99,5	0,90
2	24,20	13,30	41,7	10	25	20	20	73,5	93,5	0,79
2	30,60	18,70	42,3	11	18	15	24	87	98,5	0,88
2	28,50	21,10	52,9	22	30	32	32	106	108	0,98
2	31,40	17,30	37,7	19	24	25	30	90,5	99,5	0,91
2	22,40	13,0	45	16	23	23	20	78	97	0,80
2	34,0	23,0	44,6	16	26	23	22	87,5	104	0,84
2	30,20	22,80	52,7	26	32	44	31	101	111	0,91
2	32,40	22,20	46,2	15	25	19	24	95,5	107,5	0,89
2	19,70	12,60	51,6	21	26	32	27	90	96,5	0,93
2	34,60	38,0	71,7	28	28	43	39	121		
2	27,10	18,90	51	20	34	26	26	90	101,5	0,89
2	26,90	18,50	50,3	12	19	30	27	92	108	0,85
2	35,30	22,10	40,4	9	16	19	26	102	109,5	0,93
2	33,10	28,50	57,5	32	32	42	40	102	118	0,86
2	24,0	12,30	37,5	9	11	14	16	87,5	89	0,98
2	32,80	19,50	40	16	24	20	19	86	102	0,84
2	30,90	26,60	59,5	27	29	26	39	98	120,5	0,81
2	30,70	18,20	41,1	19	24	32	35	90	98	0,92
2	33,70	20,20	39,7	22	26	22	26	91,5	98,5	0,93
2	19,80	7,30	29,5	4	5	10	9	67,5	77	0,88
2	27,30	12,30	32,2	9	17	16	14	71,5	85,5	0,84
2	29,70	25,10	59,3	20	35	42	38	107,5	110	0,98
2	31,50	19,60	42,5	20	27	22	24	86,5	94	0,92
2	24,20	16,60	52	25	28	28	27	89	98	0,91
2	27,20	11,10	29,6	9	11	25	12	70	88	0,80
2	22,90	12,10	40,8	21	27	32	20	90	94	0,96
2	22,60	11,90	40,8	21	24	14	18	73	93,5	0,78
2	28,80	22,30	55,2	32	30	42	39	101	110	0,92
2	28,90	25,60	62,9	17	35	41	32	108	120	0,90
2	25,40	18,40	54,1	23	24	25	27	97	104	0,93

2	27,60	23,20	60,9	30	29	35	40	91	109	0,83
2	30,90	21,0	47,1	33	37	30	35	88	104	0,85
2	30,40	19,90	45,7	14	30	32	36	91,5	106,5	0,86
2	14,40	6,30	37,7	10	13	6	7	67	86,5	0,77
2	19,70	12,20	49,8	12	29	25	23	86,5	100,5	0,86
2	29,70	11,0	26	5	15	11	8	67,5	84	0,80
2	17,80	11,90	55,1	7	17	19	24	84	103	0,82
2	24,90	15,70	47,3	11	18	13	17	89	100,5	0,89
2	24,90	29,70	89,5	25	20	31	26	127	123	1,03
2	6,40	4,50	65,5	4	8	11	5	79	95	0,83
2	11,10	5,40	43,6	2	5	13	12	71	85,5	0,83
2	11,70	7,30	55,4	4	9	16	12	83	94	0,88
2	18,30	12,60	56,3	11	13	20	16	100	94	1,06
2	9,60	8,60	80,5	10	18	25	19	94,5	106,5	0,89
2	23,10	16,60	55,4	15	16	22	24	99,5	98	1,02
2	17,30	12,50	59,5	11	20	22	25	92,5	99	0,93
2	15,50	12,30	66,9	12	8	26	18	99	100	0,99
2	8,50	5,40	58,1	8	11	10	9	72	87,5	0,82
2	2,70	1,60	57,1	7	8	10	8	75	91	0,82
2	24,10	13,0	41	11	16	20	21	74,5	94	0,79
2	4,0	3,10	74,8	5	7	11	7	79,5	94	0,85
2	20,80	16,70	63,7	13	12	33	29	101	100,5	1,0
2	4,90	3,10	59,2	5	4	10	6	73	79	0,92
2	5,80	4,20	68,6	3	5	6	5	83	87,5	0,95
2	4,70	3,70	74	8	12	11	8	82,5	96,5	0,85
2	20,80	14,0	53,5	12	25	35	38	91	97	0,94
2	15,20	11,0	61,1	4	12	22	22	96,5	98	0,98
2	1,20	0,70	57	6	6	10	7	81,5	91,5	0,89
2	14,70	11,80	68,3	15	18	20	20	96,5	102	0,95
2	15,70	11,20	60	6	11	21	31	93	96	0,97
2	18,40	14,90	66,3	16	21	30	20	96	102	0,94
2	7,70	5,30	63,6	5	8	16	12	67	97	0,69
2	2,10	1,30	61,7	3	12	11	8	71	92,5	0,77

ANEXO 1. Parecer do CEP e CONEP**PARECER CONSUBSTANCIADO - CEP**

043/2004

Título: Consequências da deficiência isolada e vitalícia do hormônio o crescimento.

Finalidade: Projeto em parceria UFS-Jonh Hopkins.

Pesquisadores responsáveis: Prof Dr Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira (graduado em Medicina, Mestre e Doutor em Clínica Médica/Endocrinologia) e Prof Dr Roberto Salvatori, (graduado em Medicina, especialista em Medicina Interna e Endocrinologia, Diabete e Metabolismo, pós-graduado pela Cornell University Medical College e pela Jonh Hopkins University, na qual é Professor Assistente).

Data de entrada no CEP: 29/04/04.

Data de análise: 07/05/04.

- 1) Folha de Rosto: adequadamente preenchida.
- 2) Projeto: o Projeto de Pesquisa apresentado apresenta-se adequado nos seus tópicos: Introdução, Objetivos, Revisão Bibliográfica, Metodologia e Referências Bibliográficas.
- 3) Consta do projeto a Previsão Orçamentaria, bem como o patrocinador (Jonh Hopkins University).
- 4) Consta Cronograma de Execução, segundo o qual a coleta de dados deve ter início no segundo semestre/2004.
- 5) Consta detalhado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a Resolução CNS 196/96, bem como a aprovação pelo CEP da instituição parceira.
- 6) Todos os documentos originariamente em inglês foram traduzidos para a Língua Portuguesa.

Conclusão: consideramos que o projeto acima deva ser aprovado por este CEP.

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N° 1361/2004

Registro CONEP : 10212 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 043/2004

Processo nº 25000.064789/2004-90

Projeto de Pesquisa: "*Consequências da deficiência isolada e vitalícia do hormônio do crescimento*".

Pesquisador Responsável: Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira.

Instituição: Universidade Federal de Sergipe/SE

Área Temática Especial: Genética humana c/c cooperação estrangeira.

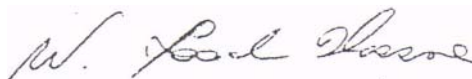
Ao se proceder à análise das respostas ao Parecer CONEP nº 1112/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a- Foram atendidas as solicitações do referido parecer.
- b- O projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 156/96 e 292/99, sobre Diretrizes. e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos:
- c- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 15 de julho de 2004.



WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO 2. Valores de Referência - LABORATÓRIO

IGF-I (IRMA, dupla extração HCL-etanol) com sensibilidade de 0,8 ng/ml

Normal:

Homem (M) – 18-20 anos = $489,0 \pm 206,7$ ng/ml

20-23 anos = $420,1 \pm 114,7$ ng/ml

23-25 anos = $320,7 \pm 106,3$ ng/ml

25-30 anos = $236,7 \pm 81,2$ ng/ml

30-40 anos = $211,9 \pm 102,5$ ng/ml

Mulher (F) – 18-20 anos = $367,9 \pm 106,1$ ng/ml

20-23 anos = $288,9 \pm 109,8$ ng/ml

23-25 anos = $274,9 \pm 93,1$ ng/ml

25-30 anos = $253,5 \pm 106,6$ ng/ml

30-40 anos = $217,7 \pm 76,2$ ng/ml

M + F 40-50 anos = $180,4 \pm 48,3$ ng/ml

50-70 anos = $153,7 \pm 49,3$ ng/ml

Colesterol Total (Huang Modificado) – Normal: <200 mg/dl

HDL-Colesterol (Huang modificado) – Normal: M >55 mg/dl F >65 mg/dl

LDL-Colesterol (Fórmula de Friedwald) – Normal: <150 mg/dl

Triglicérides (Soloni Modificado) – Normal: <150 mg/dl

Glicemia (Polpa digital)

Normal: 70-110 mg/dl

Homeostase alterada: ≥ 110 mg/dl e < 126 mg

Diabetes: ≥ 126 mg/dl

Insulina (Quimioluminescência) – Normal: <29,1 microU/ml

HOMA_{IR} (Resistência à Insulina - modelo homeostático):

Normal: 0,97 - 1,00

Insulina (microU/mL) x Glicemia (mMol/L) / 22,5

Conversão da Glicemia: mMol/L = $0,05551 \times$ mg/dl

Lipoproteína (a) (Nefelometria) – Normal: > 30,0 mg/dl

PCR Ultra-sensível (Nefelometria) - para Risco Cardiovascular:

Risco Baixo: menor que 1,0 mg/l

Risco Médio: 1,0 mg/l a $\leq 3,0$ mg/l

Risco Alto: maior que 3,0 mg/l