

SCOPO DELLO STUDIO

La bassa statura in età pediatrica è uno dei problemi principali per cui viene richiesta una visita specialistica endocrinologica. Per una corretta valutazione di questi bambini è necessario un iter diagnostico che comprenda le altezze correttamente misurate e seriate nel tempo, il calcolo della velocità di crescita, lo studio dell'età ossea e la ricerca di eventuali patologie sottostanti.

Per diagnosticare una deficienza nella produzione di ormone della crescita (GHD), in bambini con storia suggestiva, viene comunemente accettato il “fallimento” di almeno 2 test di provocazione del GH intesi come raggiungimento di picchi massimi sierici $< 10\text{ng/L}$.⁽¹⁾ Ma come dimostrato in letteratura, il solo utilizzo dei test da stimolo è limitante per diversi motivi: 1) gli esami di provocazione non sono fisiologici; 2) non vi è una definizione arbitraria di risposte a test provocativi subnormali; 3) si presuppone che vi siano possibili correlazioni delle risposte in base all'età; 4) vi è una variabilità dei valori di uno stesso campione di GH nei diversi laboratori; 5) c'è una scarsa riproducibilità dei test tra di loro.⁽²⁻¹²⁾

Lo studio tramite risonanza dell'ipofisi permette sia di evidenziare alterazioni grossolane sia di ottenere immagini sottili dalle quali ricavare misure bidimensionali e da queste calcolare volumi. In letteratura vi sono studi che dimostrano correlazioni tra l'altezza ed il volume dell'ipofisi con l'altezza e

l'età del paziente ^(13,14), ma nessuno ha studiato il volume ghiandolare in relazione ai test da stimolo del GH e l'età ossea del bambino.

Tutte queste considerazioni ci hanno spinto a condurre una revisione della casistica di 159 bambini seguiti per bassa statura, presso il dipartimento di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica del Mount Sinai Hospital di New York, in cui sono stati eseguiti i test di provocazione del GH con L-dopa ed Arginina, una risonanza dell'ipofisi, ed una Rx della mano sinistra per età ossea. Il nostro studio retrospettivo si propone i seguenti scopi:

- 1) Calcolare il volume dell'ipofisi tramite una formula comunemente utilizzata in letteratura.
- 2) Cercare una correlazione tra il volume della ghiandola, la risposta ai test provocativi del GH, lo sviluppo puberale e l'età ossea, che meglio rispecchia la vera età del soggetto, ed i diversi parametri auxologici.

Una possibile correlazione tra questi fattori permetterebbe un miglior inquadramento diagnostico di bambini con vera GHD in cui il trattamento con ormone della crescita è strettamente necessario.

LA CRESCITA

1.1 INTRODUZIONE

L'età pediatrica è un periodo di crescita, un processo complesso che interessa l'interazione di multipli e diversi fattori che portano alla moltiplicazione di milioni di repliche cellulari non sincronizzate.⁽¹⁵⁾ La crescita è comune a tutti gli organismi multicellulari ed avviene per replicazione ed ingrandimento insieme ai processi di differenziazione cellulare e degli organi. Lo sviluppo morfologico completo, la frequenza di divisione cellulare nei diversi organi in tempistiche diverse e l'outcome finale sono determinati dalla composizione genetica dell'individuo interagente con fenomeni esterni, inclusi la qualità e quantità di nutrizione, così come fattori psicosociali ed economici.⁽¹⁶⁾

La vera natura della crescita staturale, sia che occorra come processo continuativo o con periodici picchi di crescita ed arresto, è difficile da caratterizzare definitivamente.⁽¹⁷⁾ Durante la monitorizzazione di un anno di crescita in un bambino, ci possono essere marcate variazioni stagionali per la crescita staturale-ponderale.⁽¹⁸⁾ Alcuni bambini normali possono avere crescite diverse ma con tipiche curve di crescita.⁽¹⁹⁾ Tuttavia, nonostante il processo coinvolto sia multifattoriale e complesso, i bambini usualmente crescono in una maniera incredibilmente prevedibile. La deviazione da questo quadro normale di crescita potrebbe essere la prima manifestazione di una varietà di

malattie, sia endocrine che non, che possono interessare qualsiasi organo del nostro corpo. Frequenti ed accurate misurazioni di crescita sono pertanto di primaria importanza nella gestione della salute del bambino.⁽²⁰⁾

1.2 VELOCITA' DI CRESCITA

La crescita avviene a diverse velocità in base al periodo di vita. La crescita media prenatale varia da 1.2-1.5cm per settimana ma oscilla drammaticamente in base al tempo di gestazione. La velocità durante i primi 2 anni di vita ha una media intorno ai 15cm per anno ed in seguito rallenta ad approssimativamente 6cm/anno. La crescita puberale inizia prima nella femmine, ma è circa 3-5cm maggiore in ampiezza nei maschi. La valutazione completa della crescita puberale totale dipende ovviamente dal momento del suo inizio che viene solitamente definito dagli stadi di Tanner.⁽²¹⁾ Bisogna però ricordare che circa il 40% della crescita puberale totale avviene prima dello sviluppo di Tanner 2 per il seno nelle femmine ed il 23% dei maschi prima che il volume testicolare ecceda i 3mL.⁽²²⁾ Il picco di velocità di crescita durante la pubertà è paragonabile a quella che avviene tra il secondo e terzo anno di vita. L'inizio dell'aumento della velocità di crescita puberale varia nei bambini normali, riflettendo così il concetto di "tempo di crescita" enfatizzato da Tanner stesso.⁽²³⁾ La crescita cessa quando le ossa scheletriche raggiungono la completa maturità. Questo avviene quando la proliferazione dei condrociti nei nuclei di accrescimento rallenta fino alla senescenza.⁽²⁴⁾ Alcuni dati

suggeriscono che la cessazione del processo di crescita possa precedere la fusione delle epifisi.⁽²⁵⁾

1.3 POTENZIALE DI CRESCITA

Il potenziale di crescita nelle ossa tubulari può essere evidenziato valutando la progressione di ossificazione delle epifisi. I nuclei di ossificazione dello scheletro appaiono e progrediscono in una sequenza prevedibile nei bambini normali, e la maturazione ossea può essere paragonata a normali standard età correlate. Non sono noti quali fattori causano questo normale quadro maturativo, ma si sa che sono coinvolti fattori genetici e diversi ormoni, come il GH, la tiroxina e steroidi.⁽²⁶⁾ Dopo il primo anno di vita, una radiografia del polso e della mano sinistra è comunemente utilizzato per paragonarlo agli standard pubblicati da Greulich e Pyle.⁽²⁷⁾ La mano sinistra è utilizzata perché radiografie dello scheletro in toto sarebbero costose e comporterebbero un'esposizione a radiazioni eccessive. L'esperienza nella determinazione dell'età ossea è essenziale per minimizzare la variabilità interosservatore, e studi clinici che interessano l'età ossea beneficiano dall'aver una sola persona eseguire tutte le interpretazioni. Gli standard per Greulich e Pyle sono separabili per sesso, ma furono sviluppati in normali bambini americani caucasici tra il 1931 e 1942.⁽²⁸⁾

1.4 TARGET GENETICO

Dato che fattori genetici sono importanti per il potenziale di crescita e l'altezza finale, è utile valutare l'altezza del paziente in relazione a quella dei genitori. L'altezza predittiva adulta di un bambino è anche relazionata al suo target genetico, che abitualmente viene calcolato usando le formule di Tanner per maschi e femmine:

Per maschi = $176.8 + 0.8 (\text{Altezza media dei genitori} + 6.5 - 176.8)$

Per femmine = $163.7 + 0.8 (\text{Altezza media genitori} - 6.5 - 163.7)$

Il range di 2 deviazioni standard per questo target calcolato e' circa ± 10 cm, quindi il target di altezza calcolato, così come la predizione dell'altezza adulta, sono delle approssimazioni. ⁽²⁹⁾

1.5 MISURAZIONI

Una corretta valutazione della crescita necessita di determinazioni accurate e riproducibili. La lunghezza viene misurata per bambini sotto i 2 anni, preferibilmente con 2 osservatori, in una cassa rigida, con un piano rigido dove appoggiare la testa ed un piano mobile per la misurazioni della pianta dei piedi con gambe in completa estensione. Dopo i 2 anni viene misurata l'altezza con uno stadiometro, prendendo la media di 3 misurazioni. Tra i due e tre anni e' importante misurare il bambino sia in altezza che in lunghezza almeno una volta e plottarli sulle rispettive curve. Anche quando tutti gli impegni sono stati

presi per ridurre al minimo gli errori nelle misurazioni, un intervallo minimo di 6 mesi e' necessario per valutare una velocità di crescita significativa.

1.6 CURVE DI CRESCITA

La valutazione dell'altezza di un bambino deve essere eseguita nel contesto di normali standard di riferimento ottenuti con i dati internazionali. Nel 2000 il Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ha pubblicato i grafici di crescita rivisti, che contengono dati provenienti da 5 indagini nazionali condotte tra il 1963-1994. Questi dati sono rappresentativi della popolazione normale degli Stati Uniti. I grafici sono composti da curve percentili che rappresentano la distribuzione dei valori di peso, altezza e Body Mass Index o circonferenza cranica in una data età (Fig.1 e Fig.2).⁽³⁰⁾

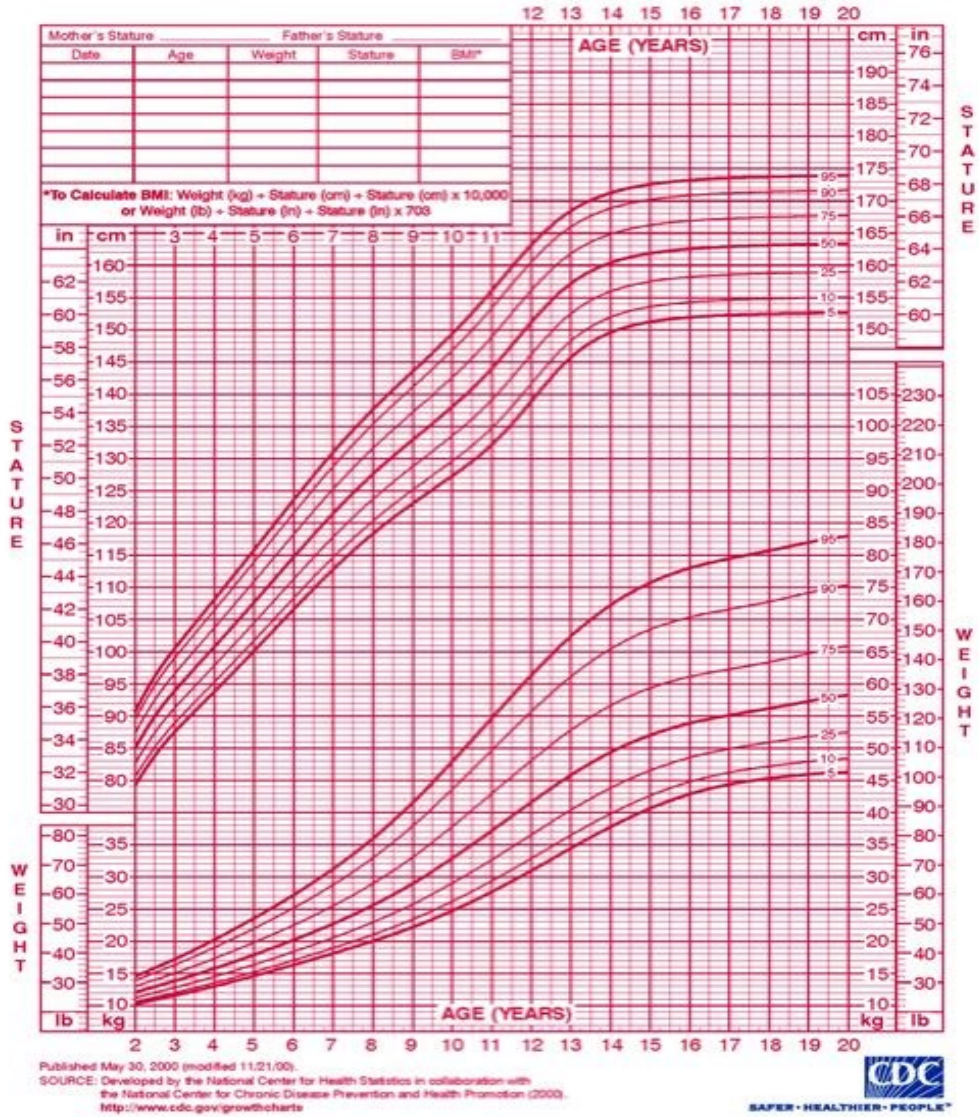
I dati ottenuti dagli studi cross-sezionali e longitudinali ha permesso di sviluppare gli standard per la velocità di crescita (figura 3).⁽³¹⁾

2 to 20 years: Girls

Stature-for-age and Weight-for-age percentiles

NAME _____

RECORD # _____



Figura

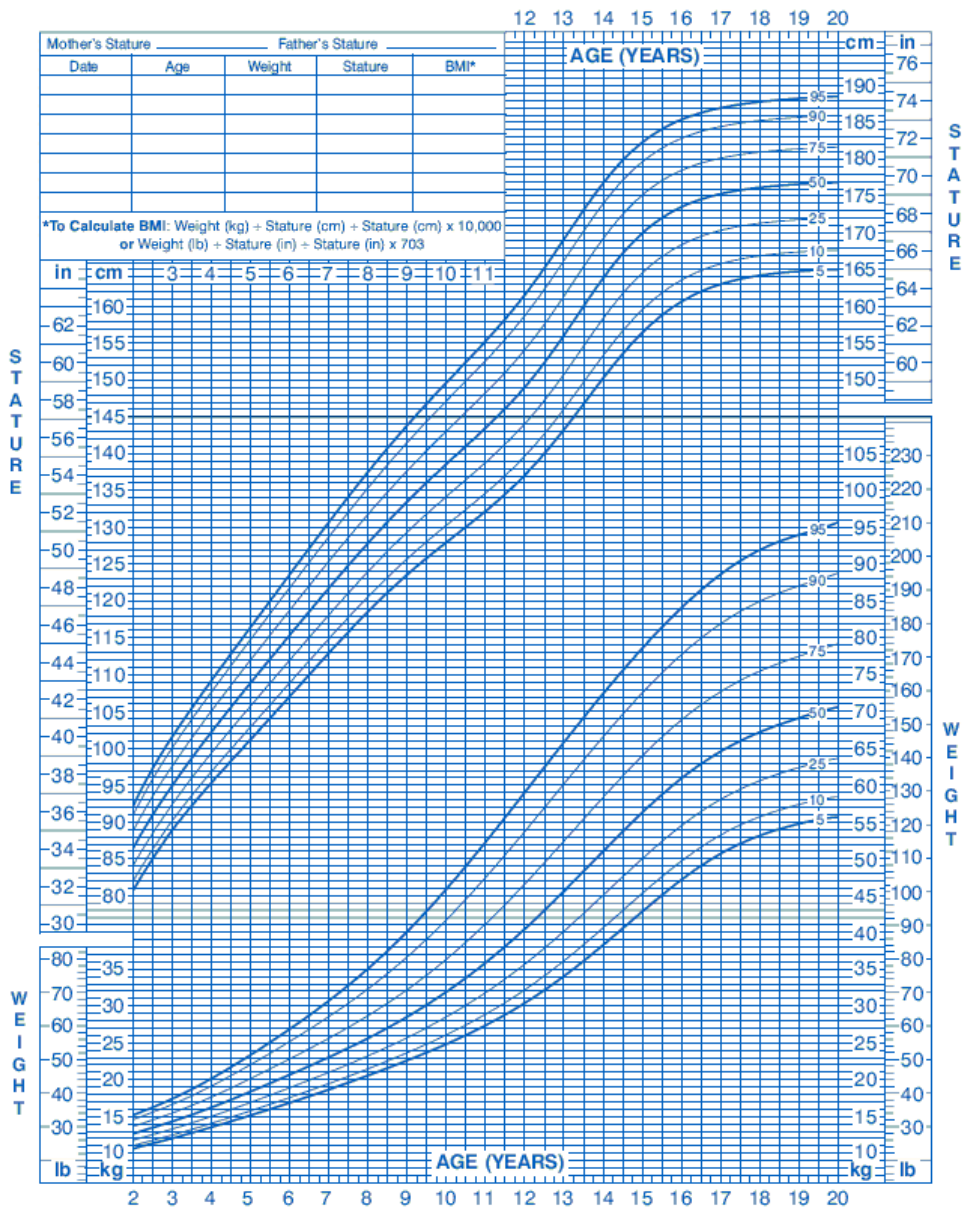
1. Curve di Crescita per peso ed altezza del CDC del 2000 per femmine da 2-20anni

2 to 20 years: Boys

Stature-for-age and Weight-for-age percentiles

NAME _____

RECORD # _____



Published May 30, 2000 (modified 11/21/00).
SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with
the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>



Figura 2. Curve di Crescita per peso ed altezza del CDC del 2000 per maschi da 2-20anni

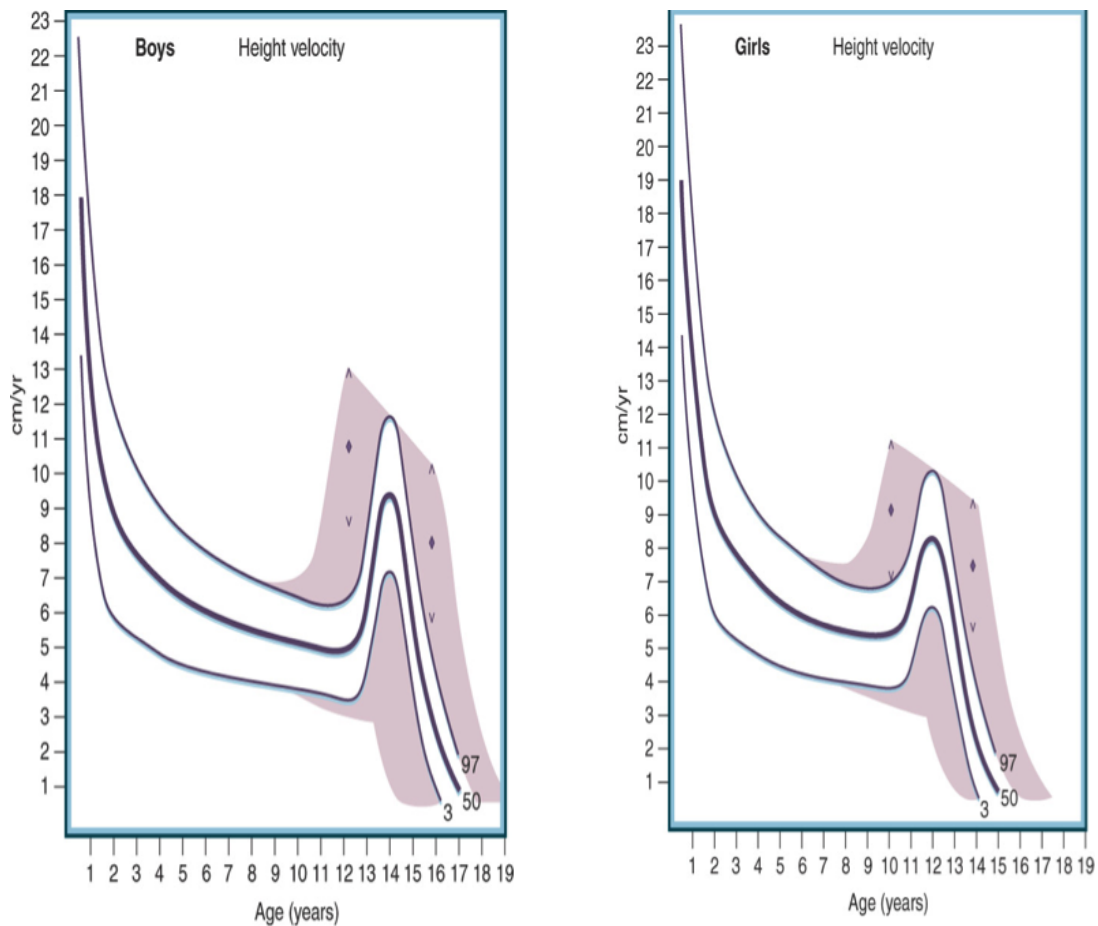


Figura 3. Standard delle velocità di crescita per maschi e femmine.

Le informazioni ottenute monitorando la velocità di crescita sono fondamentali per la valutazione di un bambino con alterazioni della crescita. Nonostante vi sia una considerevole variabilità nella velocità di crescita normale nei bambini, essi tendono comunque a crescere relativamente fedelmente alla propria curva, e qualsiasi “intersezione” di curve durante quest’età dovrebbe sempre essere indagata.

1.7 IL BAMBINO CON BASSA STATURA

Il parametro più importante nella valutazione del bambino con bassa statura è un'attenta valutazione clinica, con accurate misurazioni seriate dell'altezza e velocità di crescita.

Le alterazioni della crescita sono suddivise in 1) alterazioni primarie della crescita, 2) alterazioni secondarie, 3) varianti della norma e 4) bassa statura idiopatica. Nel primo gruppo i difetti sono intrinseci ai nuclei di accrescimento. Sono meglio esemplificate dalle osteocondrodiplosie ma anche da molte alterazioni cromosomiche e sono inclusi anche condizioni di resistenza all'IGF e mutazioni del gene SHOX. Nel secondo gruppo, la scarsa crescita è dovuta a malattie croniche o alterazioni endocrine. Il terzo gruppo comprende le varianti della normale crescita come il ritardo costituzionale di crescita e la bassa statura genetica. Mentre l'ultimo gruppo è composta dalla bassa statura idiopatica, cioè senza causa nota.⁽³²⁾ Una breve classificazione con alcune cause di malattia che interessano la scarsa crescita possono essere evidenziate nella tabella 1.

La possibilità di una disfunzione ipotalamo-ipofisaria, in un quadro di sospetta patologia del Sistema Nervoso Centrale, dovrebbe essere sempre preso in considerazione in bambini con documentata decelerazione della curva di crescita. Allo stesso modo, un neonato con ipoglicemia, ittero prolungato e/o microfallo dovrebbe essere indagato sulla funzionalità ipofisaria.

- I. ALTERAZIONI PRIMARIE DELLA CRESCITA
 - A) Osteocondropatie
 - B) Alterazioni Cromosomiche
 - C) Ritardo di Crescita Intrauterino
 - D) Difetti eterozigotici del recettore del GH

- II. ALTERAZIONI DELLA CRESCITA SECONDARIE
 - A) Malnutrizione
 - B) Malattie Croniche
 - C) Alterazioni Endocrini
 - 1) Ipotiroidismo
 - 2) Sindrome di Cushing
 - 3) Pseudoipoparatiroidismo
 - 4) Rachitismo
 - 5) Deficienza di IGF-1

- III. VARIANTI DELLA NORMA
 - A) Bassa statura genetica
 - B) Ritardo Costituzionale della Crescita

- IV. BASSA STATURA IDIOPATICA

TABELLA 1. Classificazione del ritardo di crescita

2. L'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI

2.1. L'IPOFISI

L'ipofisi è una ghiandola che risiede sotto il cervello in una fossa dell'osso sfenoide, nota come la sella turcica per le somiglianze alle selle dei cavalli turchi. Embriologicamente, anatomicamente e funzionalmente la ghiandola è divisa in due lobi. La parte anteriore, o adenoipofisi, ne costituisce i 2/3 mentre quella posteriore, o neuroipofisi, il terzo rimanente.⁽³³⁾

La neuroipofisi è embriologicamente ed anatomicamente continuo con l'ipotalamo, una area di materia grigia nella parte basale del cervello circondante il terzo ventricolo. I neuroni dell'ipotalamo si proiettano direttamente nella neuroipofisi, per cui essa stessa è formata dagli assoni e terminazioni nervose dei neuroni ipotalamici; gli ormoni conservati in queste terminazioni, la vasopressina e l'ossitocina, sono rilasciate nel torrente circolatorio in risposta a stimoli elettrici. Attorno alle terminazioni nervose vi sono astrociti modificati noti come pituiciti che sembrerebbero avere un ruolo importante nel controllo locale del rilascio degli ormoni.⁽³⁴⁾

L'adenoipofisi, è anatomicamente distinta dall'ipotalamo e consiste in una raccolta di cellule endocrine. Originariamente tre diversi tipi di cellule furono istologicamente identificate in base alla loro abilità di "colorarsi"; vi erano cellule cromofobe, acidofile e basofile. Le nuove tecniche istologiche hanno permesso di classificare le cellule in base ai specifici ormoni prodotti.

Circa il 50% delle cellule secernenti dell'adenoipofisi sono somatotrope, o sintetizzanti GH, 10-25% latotrope, produttrici prolattina, 15-20% corticotrope, produttrici ACTH, 10-15% gonadotrope, produttrici LH ed FSH, e circa il 3-5% tireotrope, produttrici cioè TSH (Tabella 2). Alcune cellule cromofobe non vengono "colorate" con nessuno degli anticorpi diretti contro gli ormoni dell'ipofisi ma il microscopio elettronico ha evidenziato la presenza di granuli secretori in queste cellule.⁽³⁵⁾

COLORAZIONE	CELLULE	ORMONI	% POPOLAZIONE ADENOIPOFISI	ORMONI IPOTALAMICI
Basofile	Tireotrope	TSH	3-5%	TRH (+) Somatostatina (-)
	Corticotrope	ACTH	15-20%	CRH (+)
	Gonadotropine	LH, FSH	10-15%	GnRH (+)
Acidofile	Somatotrope	GH	40-50%	GHRH (+) Somatostatina (-)
	Latotrope	PRL	10-25%	TRH (+) PRF (+) Dopamina (-)
Cromofobe	?	?	5-15%	?

TABELLA 2. Secrezione ormonale dell'adenoipofisi e la loro regolazione

Nonostante l'adenoipofisi non sia anatomicamente connessa con l'ipotalamo, è funzionalmente legata ad essa tramite cellule nervose che secernono neurormoni che, attraverso i vasi portali ipofiseali nell'eminenza mediana, agiscono sulle cellule endocrine del lobo anteriore dell'ipofisi stimolando od inibendo la sintesi o secrezione degli ormoni.⁽³⁶⁾

L'ipofisi mantiene i collegamenti anatomici e funzionali con il cervello ma risiede fuori dalla barriera emato-encefalica. La parte anteriore della sella turca è il tuberculum sellae il quale ha delle proiezioni aliformi ai lati dell'osso sfenoide chiamati processi clinoidi anteriori. La parte posteriore, nota come la dorsum sellae, è fiancheggiato dai processi clinoidi posteriori. Questi processi clinoidi sono i punti di attacco del diaphragma sellae, una parte della dura madre che circonda il cervello. In questo modo l'intera ipofisi è circondata dalla dura in tal modo che la membrana arachnoide, e quindi il liquido cerebrospinale, non possano entrare nella sella turca.⁽³⁷⁾

Nell'adulto, le dimensioni medie dell'ipofisi sono di 13x9x6mm, con un peso medio di 600mg, con un range dai 400-900mg e lievemente più grande nelle donne ed aumenta durante la gravidanza.⁽³⁸⁾ Nel neonato solitamente pesa attorno ai 100mg.

2.2 IPOTALAMO

L'Ipotalamo è costituito da numerose cellule nervose, chiamati nuclei, arrangiati bilateralmente attorno al terzo ventricolo. Quelli legati alla secrezioni di ormoni dell'ipofisi tendono ad essere distribuiti medialmente mentre quelli con funzioni autonome, come la termoregolazione, sazietà e stimolazione simpatica adrenomidollare, sono localizzate lateralmente. Come un insieme, l'ipotalamo è attaccato rostralmente, verso il naso, al chiasma ottico, caudalmente dai corpi mammillari, lateralmente dai tratti ottici e dorso-lateralmente dal talamo. Clinicamente è importante sapere che il chiasma ottico risiede circa 5 mm sopra il diaphragma sellae ed anteriormente al peduncolo ipofisario. Per questo, è chiaro che qualsiasi neofromazione di sufficiente dimensione in quest'aria causerà difetti nel campo visivo.⁽³⁹⁾

2.3 EMBRIOLOGIA

Il lobo anteriore dell'ipofisi si sviluppa da una invaginazione ectodermale di cellule dell'orofaringe nell'intestino primitivo, e il clustering di queste cellule embrionali e' riconoscibile già a 4-5 settimane di gestazione.⁽⁴⁰⁾ L'invaginazione viene chiamata Tasca di Rathke e va eventualmente staccandosi dalla cavità orale e separandosi dall'osso sfenoide del cranio. Il lume di questa tasca è ridotto ad una piccola fessura mentre la porzione superiore circonda il peduncolo ipofisario e forma la pars tuberalis. Questa,

insieme al lobo anteriore, forma l'adenoipofisi. Il lobo posteriore si sviluppa dalle cellule della cresta neurale, da una invaginazione verso il basso del pavimento del terzo ventricolo del cervello. Il lume di questa tasca va chiudendosi quando i suoi lati si fondono a formare il peduncolo, mentre la porzione superiore forma una rientranza nel pavimento del terzo ventricolo noto come eminenza mediana. Il peduncolo insieme all'eminenza mediana formano il peduncolo infundibolare e questo insieme alla pars nervosa vengono chiamati collettivamente neuroipofisi (Figura 4).⁽³³⁾

La morfogenesi e lo sviluppo dei diversi tipi di cellule dell'ipofisi interessa diversi geni cruciali che codificano per fattori di trascrizione tra cui almeno 5 geni homeobox e anche l'azione di diversi segnali induttivi da parte del diencefalo.⁽⁴¹⁾

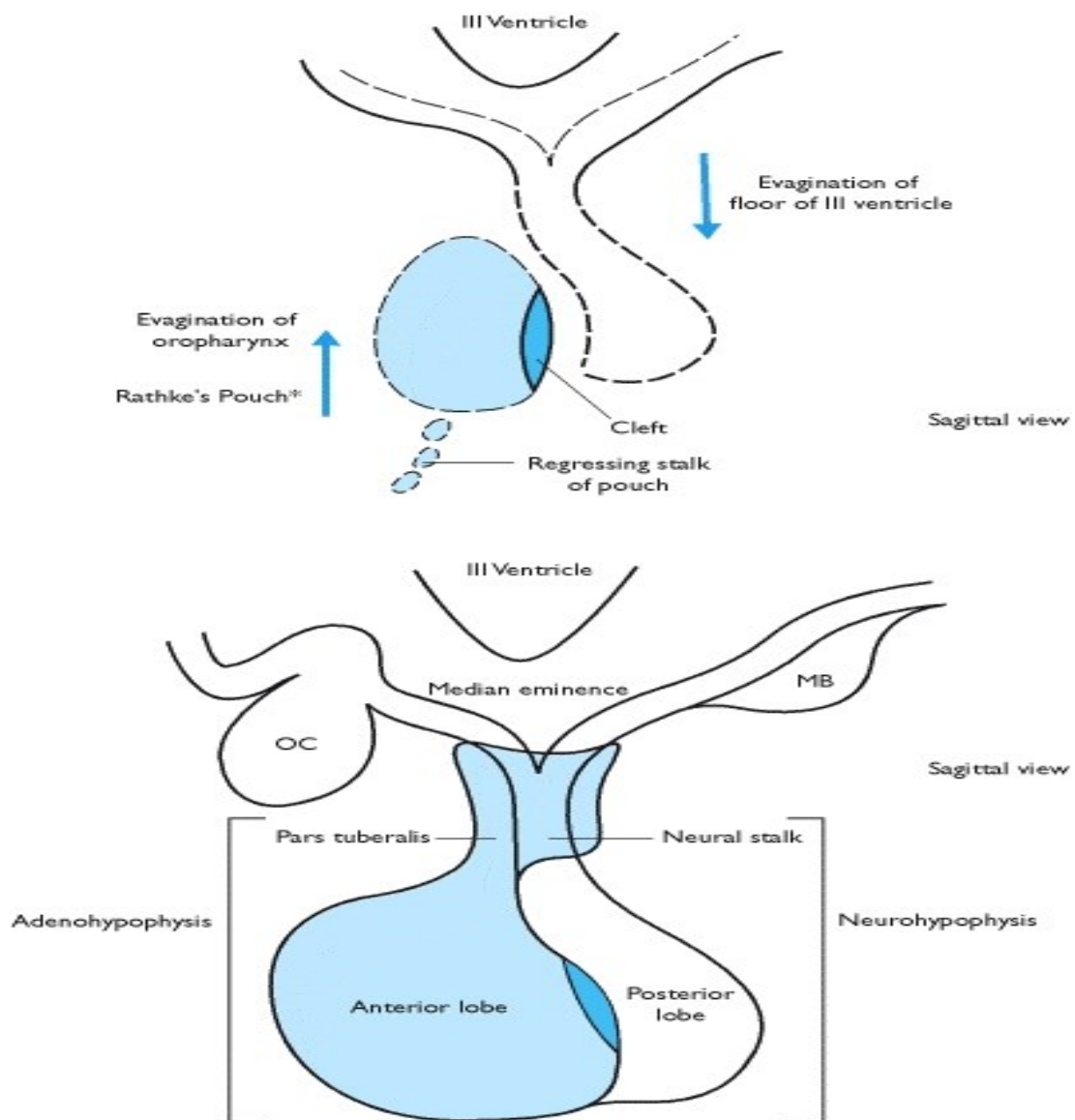


Figura 4. Diagramma dell'embriologia ed anatomia dell'ipofisi

2.4 SISTEMA VASCOLARE

Il torrente ematico dell'asse ipotalamo-ipofisario è complesso ma definisce la relazione funzionale tra l'ipotalamo e l'adenipofisi. Qualsiasi interruzione del flusso sanguigno danneggia il controllo ipotalamico sulla secrezione degli ormoni dell'adenipofisi.⁽⁴²⁾ L'ipotalamo riceve la sua

fornitura di sangue dal circolo di Willis mentre la neuroipofisi e l'adenoipofisi le ricevono rispettivamente dalle arterie ipofisarie inferiori e superiori. Il plesso capillare dell'arteria ipofisea inferiore drena nel seno durale anche se alcuni capillari nel peduncolo neurale formano piccole vene portali che drenano nell'adenoipofisi. Questo costituisce solo una piccola frazione della circolazione del lobo anteriore, che è uno dei tessuti miglior vascolarizzati dei mammiferi. La maggior parte della circolazione nasce dalle vene portali "lunghe". Queste sono formate da una rete di capillari provenienti dall'arterie ipofisee superiori che rivestono le terminazioni nervose delle cellule neurosecretrici nell'eminenza mediana. Pertanto gli ormoni stimolanti ed inibenti dell'ipotalamo sono rilasciati in queste vene portali ipofisarie, attraverso le quali sono trasportate alle cellule endocrine dell'adenoipofisi. Qui, le vene portali formano una seconda rete capillare nella quale vengono secrete gli ormoni dell'adenoipofisi. I capillari del sistema portale ipofiseale sono fenestrati in modo da migliorare il trasporto degli ormoni dalle cellule. I canali venosi dall'adenoipofisi drenano nei seni cavernosi ed in seguito nei seni petrosi superiori ed inferiori e quindi nella vena giugulare (Figura 5).⁽⁴³⁾

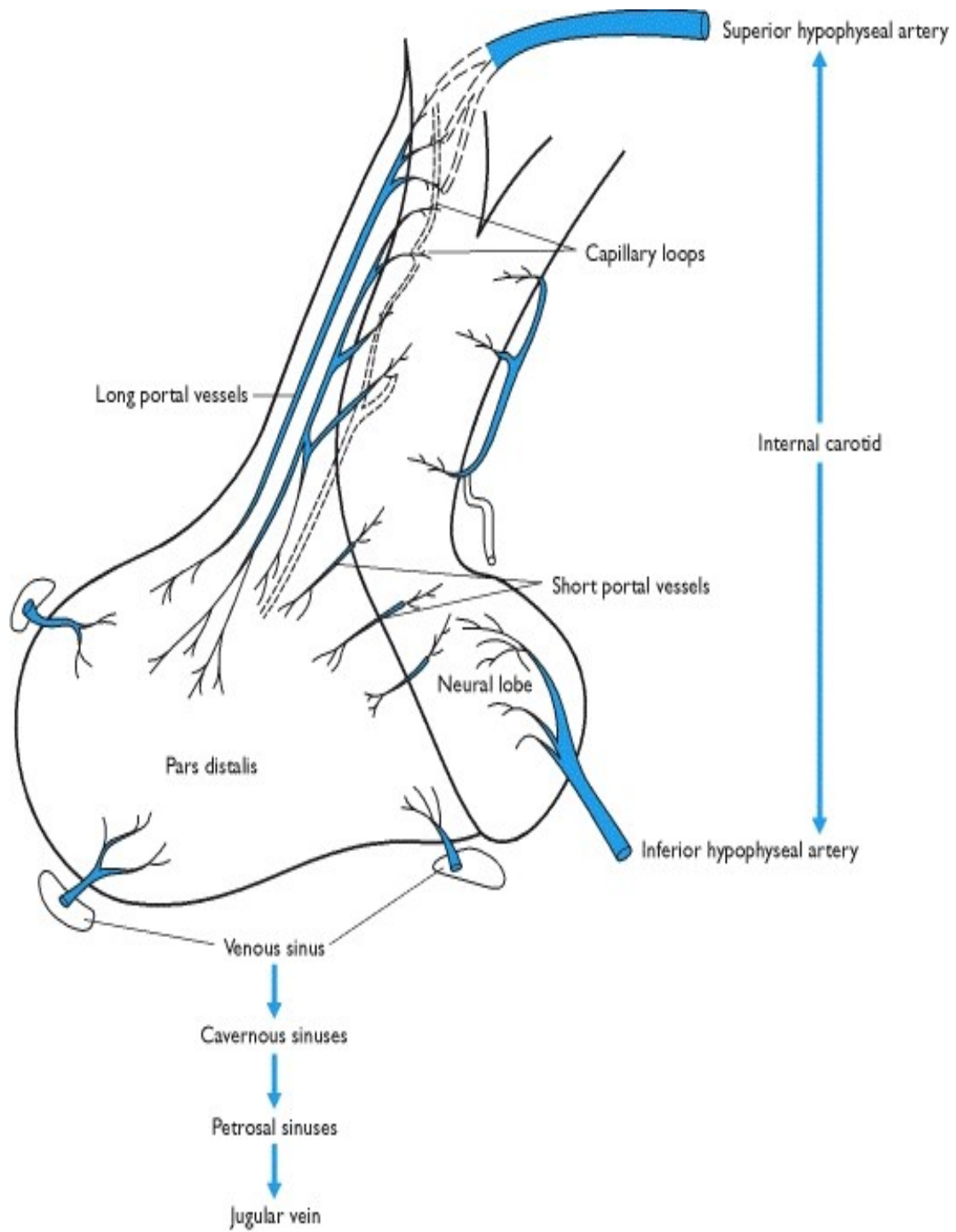


Figura 5. Rappresentazione dell'apporto ematico e drenaggio venoso dell'ipofisi

3. ORMONE DELLA CRESCITA

3.1 CHIMICA

L'ormone della crescita umano (GH) e' prodotto come una proteina a singola catena, di 191 amino acidi, con un peso di 22-kd (figura 6).⁽⁴⁴⁾

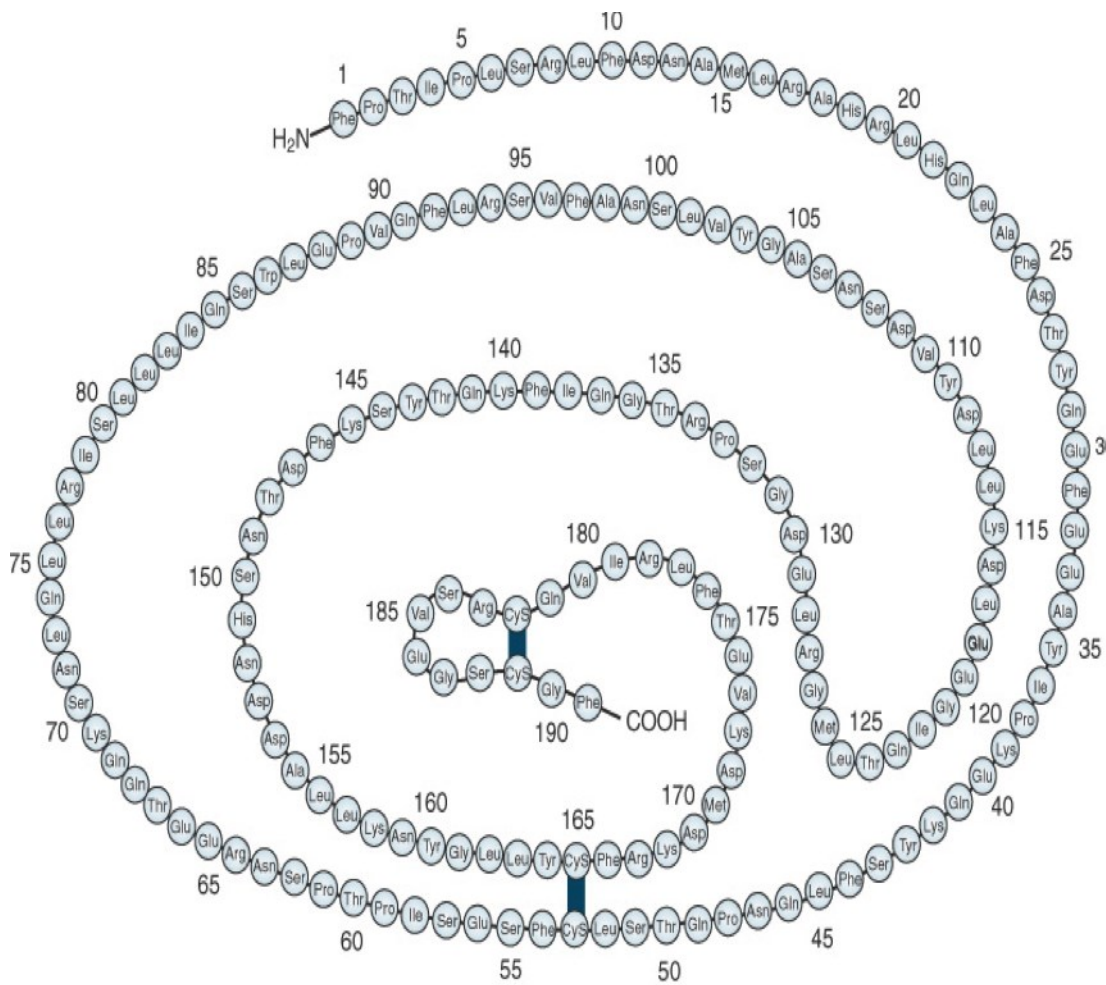


Figura 6. Struttura chimica dell'Ormone della Crescita Umano

La proteina non è glicosilata ma contiene due legami disolfidici intramolecolari. Il GH condivide sequenze omologhe con la prolattina, la somatomammotropina corionica (CS o lattogeno placentare) ed una variante del GH da 22-kd (GH-V) secreto solo dalla placenta e che varia dal GH ipofisario per 13 amino acidi.⁽⁴⁵⁾ I geni per queste proteine sono probabilmente evolute da un comune gene ancestrale anche se sono localizzati in diversi cromosomi (cromosoma 6 per la prolattina, 17 per il GH).⁽⁴⁶⁾ I geni per il GH, la prolattina ed il CS condividono una comune organizzazione strutturale, con quattro introni che separano 5 esoni. Normalmente, circa il 75% del GH prodotto dall'ipofisi è della forma matura di 22-kd. Splicing alternativo porta ad una forma da 20-kd che normalmente costituisce circa il 5-10% dell'ormone.⁽⁴⁷⁾ Le quote rimanenti sono costituite da forme desamidate, N-acetilate ed oligomeri del GH.

3.2 SECREZIONE

Il pattern pulsatile caratteristico della secrezione del GH rispecchia il gioco di due peptidi regolatori ipotalamici: l'ormone rilasciante il GH (GHRH) e la somatostatina (SRIF), con presunta modulazione da altri fattori GH rilascianti.⁽⁴⁸⁾ La regolazione di GH dal GHRH è mediata principalmente al livello di trascrizione ed è accentuato da aumenti di cAMP intracellulare. Mutazioni del gene del GHRH non sono stati riportati, ma alterazioni anatomiche e funzionali della connessione tra l'ipotalamo e l'ipofisi anteriore,

che impediscono l'interazione del GHRH con il suo recettore sulle cellule somatotrope, sono considerate essere tra le più importanti cause di deficit di GH clinico nei bambini.⁽⁴⁹⁾ La somatostatina sembrerebbe influire sulla tempistica ed amplitudine della secrezione pulsatile di GH piuttosto che a regolarne la sintesi. La secrezione pulsatile di GH in vivo sembrerebbe risultare da una simultanea riduzione del rilascio di somatostatina ipotalamica ed un aumento del rilascio di GHRH.⁽⁵⁰⁾

La regolazione, e reciproca secrezione di GHRH e somatostatina, non è perfettamente capito. Multipli neurotrasmettitori e neuropeptidi sono coinvolti nella regolazione e rilascio di questi fattori ipotalamici.⁽⁵¹⁾ Questi fattori influenzano la secrezione di GH con lo stress, il sonno, l'emorragia, il digiuno, l'ipoglicemia e l'esercizio e formano la base per diversi test da stimolo impiegati nella valutazione della secrezione di GH. La secrezione di GH è influenzata anche da diversi ormoni non peptidici, inclusi androgeni⁽⁵²⁾, estrogeni⁽⁵³⁾, tiroxina⁽⁵⁴⁾ e glucocorticoidi⁽⁵⁵⁾ (Figura 7).

La sintesi e secrezione di GH sono anche regolate dal peptide IGF. Recettori specifici per IGF-1 ed IGF-2 sono stati identificati in varie cellule dell'ipofisi.⁽⁵⁶⁾

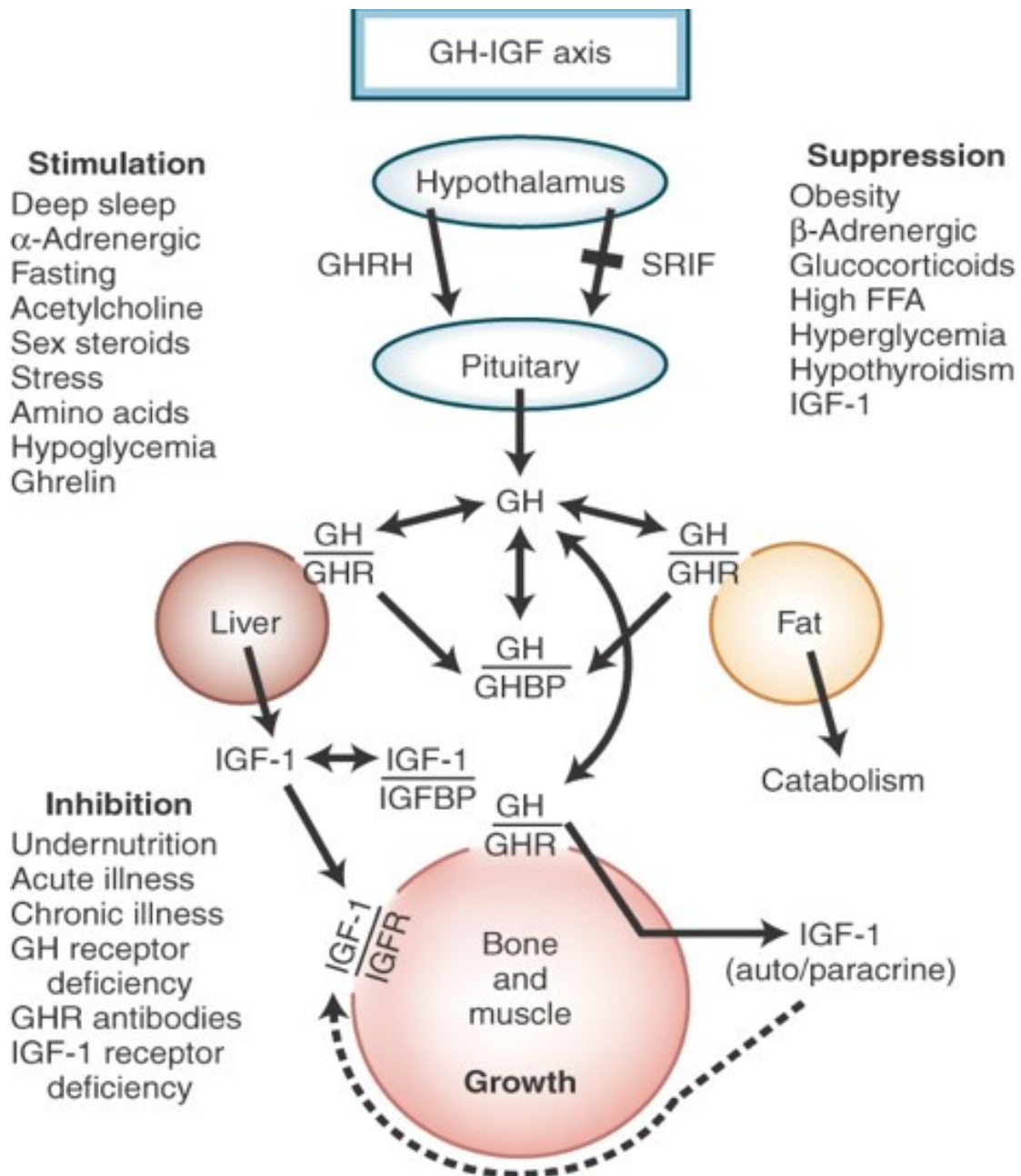


Figura 7. Regolazione e funzionamento dell'asse GH-IGF

3.3 SECREZIONE DI GH NEGLI UMANI

Il rilascio episodico di GH dalle cellule somatotrope dall'ipofisi risulta in intermittenti aumenti dei livelli sierici di GH separati da periodi di livelli

bassi o indeterminabili, durante il quale la secrezione è minima.⁽⁵⁷⁾ La natura pulsatile della secrezione del GH è stata dimostrata tramite frequenti prelievi seriatati nelle 24 ore e test immunofluorometrici o di chemoluminescenza.⁽⁵⁸⁾ Normalmente i livelli sierici nei periodi di bassa secrezione di GH sono meno di 0.04 ug/L. E' pertanto inutile valutare i livelli sierici di GH con campioni random. Molti studi dei livelli di GH in persone normali, a diverse età ed in diverse condizioni hanno definito i picchi, la secrezione basale e la variabilità diurna. Da questi studi inoltre appare che la crescita staturale migliore e' associata a grandi oscillazioni della secrezione di GH, con una magnitudine piuttosto uniforme ma con sequenze irregolari.⁽⁵⁹⁾

Le cellule secernenti GH sono state identificate a partire dalla IX-XII settimana di gestazione e la immunoreattività del GH ipofisario è presente dalla VII-IX settimana di gestazione.⁽⁶⁰⁾ Il GH può essere identificato nel siero fetale dalla fine del primo trimestre con picchi che raggiungono i 150 ug/L a metà gestazione.⁽⁶¹⁾ Nella seconda metà della gestazione i valori vanno lentamente diminuendo e sono minori nei neonati a termine rispetto ai valori dei pretermini, probabilmente riflettendo un feedback negativo dovuto agli alti valori sierici di IGF-1 caratteristici degli ultimi stadi di gestazione.⁽⁶²⁾ Valori medi di GH diminuiscono da circa 25-35 ug/L nel neonato a circa 5-7 ug/L nel bambino prima della comparsa della pubertà.⁽⁶³⁾ L'aumento di produzione del GH durante la pubertà è dovuta sia alla maggior ampiezza dell'impulso, sia alla maggior quantità di GH secreto nei burst secretori, piuttosto che un

cambiamento nella frequenza degli impulsi.⁽⁶⁴⁾ Maggiore è l'irregolarità' nella secrezione di GH, maggiore è la crescita lineare.⁽⁶⁵⁾ In un quadro di livelli stabili della proteina legante l'ormone della crescita (GHBP), gli aumenti puberali della produzione di GH appaiono essere associati a livelli maggiori di GH "libero", potenzialmente facilitando la consegna di IGF-1 al suo tessuto bersaglio.⁽⁶⁶⁾ La spiccata attività dell'asse GH-IGF contribuisce al grado di insulino-resistenza che occorre durante il periodo della pubertà.⁽⁶⁷⁾ In seguito la produzione di GH ed IGF iniziano a diminuire dopo la pubertà e continuano per tutta la vita, dovuto alla diminuita amplitudine dell'impulso.⁽⁶⁸⁾ Infatti nelle 24 ore, nonostante il numero assoluto di picchi pulsatili tenda a rimanere stabile, la produzione totale di GH in un uomo adulto variano dagli 0.25-0.52 mg/m²⁽⁶⁹⁾, pari a circa il 20-30% dei livelli prodotti durante la pubertà. Si potrebbe così considerare la pubertà come un periodo di "acromegalia fisiologica" mentre l'invecchiamento con il suo declino della secrezione di GH, e' stato definito la "somatopausa".⁽⁷⁰⁾

Stadi fisiologici che hanno un impatto sulla secrezione di GH, oltre alla maturazione e l'invecchiamento, sono il sonno⁽⁷¹⁾, lo stato nutrizionale⁽⁷²⁾, il digiuno e lo stress⁽⁷³⁾ e gli steroidi gonadici⁽⁵²⁾. La produzione massima di GH avviene durante la notte, specialmente al sopraggiungere della prima onda lenta del sonno (stadi III e IV), mentre la fase REM è associata a basse secrezioni di GH.⁽⁷⁴⁾

L'obesità è caratterizzata da minor produzione di GH dovuta a meno pulsazioni secretorie ed un tempo di dimezzamento nel siero più corto.⁽⁷²⁾ Nel bambino l'obesità è similmente caratterizzata da diminuita produzione di GH, ma con normali livelli di IGF, aumentati livelli di GHBP e solitamente aumentata crescita lineare.⁽⁷⁵⁾ L'iperinsulinismo associato con l'obesità causa diminuzione di IGFBP-1 e probabilmente aumentati livelli di IGF-1 "libero".⁽⁷⁶⁾ Il digiuno aumenta entrambi il numero e l'ampiezza delle pulsazioni secretorie di GH, presumibilmente riflettendo una diminuita secrezione di somatostatina ed un intensificato rilascio di GHRH.⁽⁷⁷⁾

3.4 RECETTORE DEL GH E GHBP

Il recettore per il GH è composta da 3 domini: uno extracellulare legante l'ormone, uno singolo transmembrana ed uno citoplasmatico. Nell'uomo, la più importante GHBP circolante deriva dal taglio proteolitico del dominio extracellulare del recettore.⁽⁷⁸⁾ La sequenza degli stadi dell'azione del GH è mostrata nella figura 8: a) Innanzitutto si ha il legame del GH con il GH-R; b) in seguito si ha l'interazione tra GH-R e JAK2 con fosforilazione tirosinica del JAK2 stesso e dei residui della porzione intracellulare del GH-R. c) richiamo di STAT5b sui residui fosforilati del GH-R attivato, d) Fosforilazione di STAT5b stessa, e) dissociazione di STAT5b dal GH-R, f) dimerizzazione di STAT5b ed ingresso nel nucleo, g) legame con il DNA ed iniziazione della trascrizione del gene.⁽⁷⁹⁾

Il GHBP maggiore nel siero umano si lega al GH con alta specificità ed affinità ma con bassa capacità. Solo il 45% del GH circolante è legato.⁽⁸⁰⁾ Il GHBP non è altro che il dominio extracellulare del GH-R e promuove l'emivita del GH presumibilmente impedendone la filtrazione glomerulare e modulandone il legame con il GH-R.⁽⁶⁶⁾ I livelli di GHBP sono bassi nell'infanzia, crescono con l'adolescenza fino a raggiungere un plateau durante la pubertà e l'età adulta.⁽⁸¹⁾ Scarsa nutrizione, diabete mellito, ipotiroidismo, malattie croniche del fegato ed altre malattie sono legate a bassi livelli di GHBP, mentre obesità, gravidanza e trattamenti con estrogeno causano alti livelli di GHBP.⁽⁶⁶⁾ Esiste una diretta correlazione tra il BMI ed i livelli di GHBP.⁽⁸²⁾

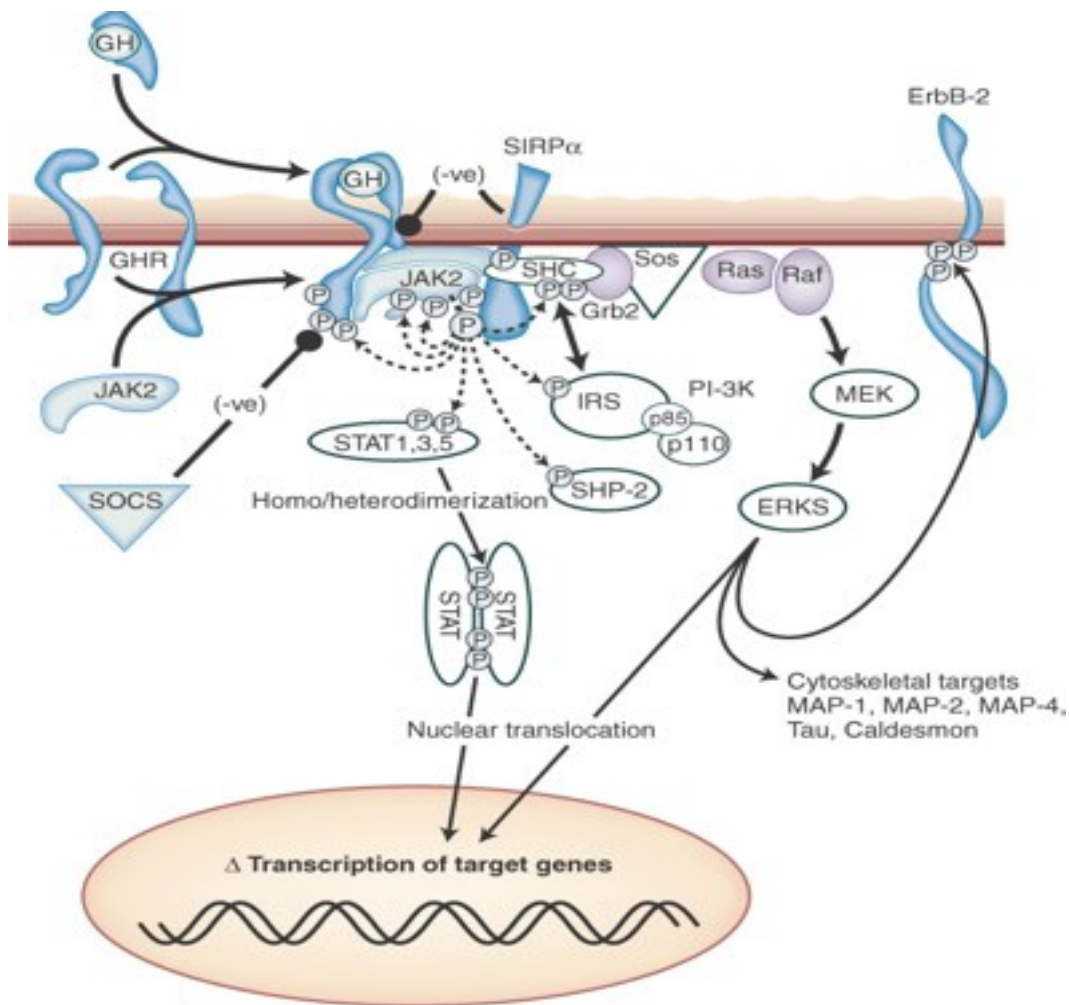


Figura 8. Attivazione e cascata segnaletica del GHBP

3.5 AZIONE DEL GH

L'azione anabolica del GH è principalmente mediata attraverso IGF⁽⁸³⁾, ma il GH è anche capace di generare effetti indipendentemente dall'azione del IGF. Infatti, talvolta le loro azioni sono contraddittorie, com'è evidenziata dall'azione "diabetogena" del GH contro l'attività ipoglicemizzante delle IGF.⁽⁸⁴⁾ Il GH ha azione diretta sulla lipolisi, stimolazione del trasporto degli amino acidi, ed aumento della sintesi proteica epatica.⁽⁸⁵⁾ Altri potenziali siti IGF-indipendenti dell'azione del GH sono: 1) l'epifisi, con stimolazione della

loro crescita, 2) ossa, con stimolazione della differenziazione ed attività degli osteoclasti, stimolazione dell'attività' degli osteoblasti ed aumento della massa ossea tramite formazione ossea endocondrale; 3) tessuto adiposo, con effetti insulin-like seguiti da aumentata lipolisi, inibizione della lipoprotein lipasi, stimolazione delle lipasi ormono-sensibile, diminuito trasporto di glucosio e diminuita lipogenesi; 4) muscolo, con aumentato trasporto di amino acidi, aumentata ritenzione di nitrogeno, aumento massa muscolare ed aumentata spesa energetica (Figura 9).⁽⁸⁶⁾

La domanda se il GH avesse effetti sulla crescita IGF-indipendenti è stata affrontata da studi su topi che coinvolgevano un'interruzione simultanea dei target dei geni per entrambi IGF-1 e GH-R, che hanno dimostrato una maggiore attenuazione della crescita postnatale rispetto ai topi knockout per solo uno dei 2 geni, dimostrando che GH ed IGF-1 promuovono entrambi comuni ed indipendenti funzioni.⁽⁸⁷⁾ Bisogna però indicare che negli umani il contributo di GH indipendente dai suoi effetti con IGF-1 è modesto ed il sistema IGF è visto come il maggiore mediatore della crescita GH-mediata.⁽⁸⁸⁾

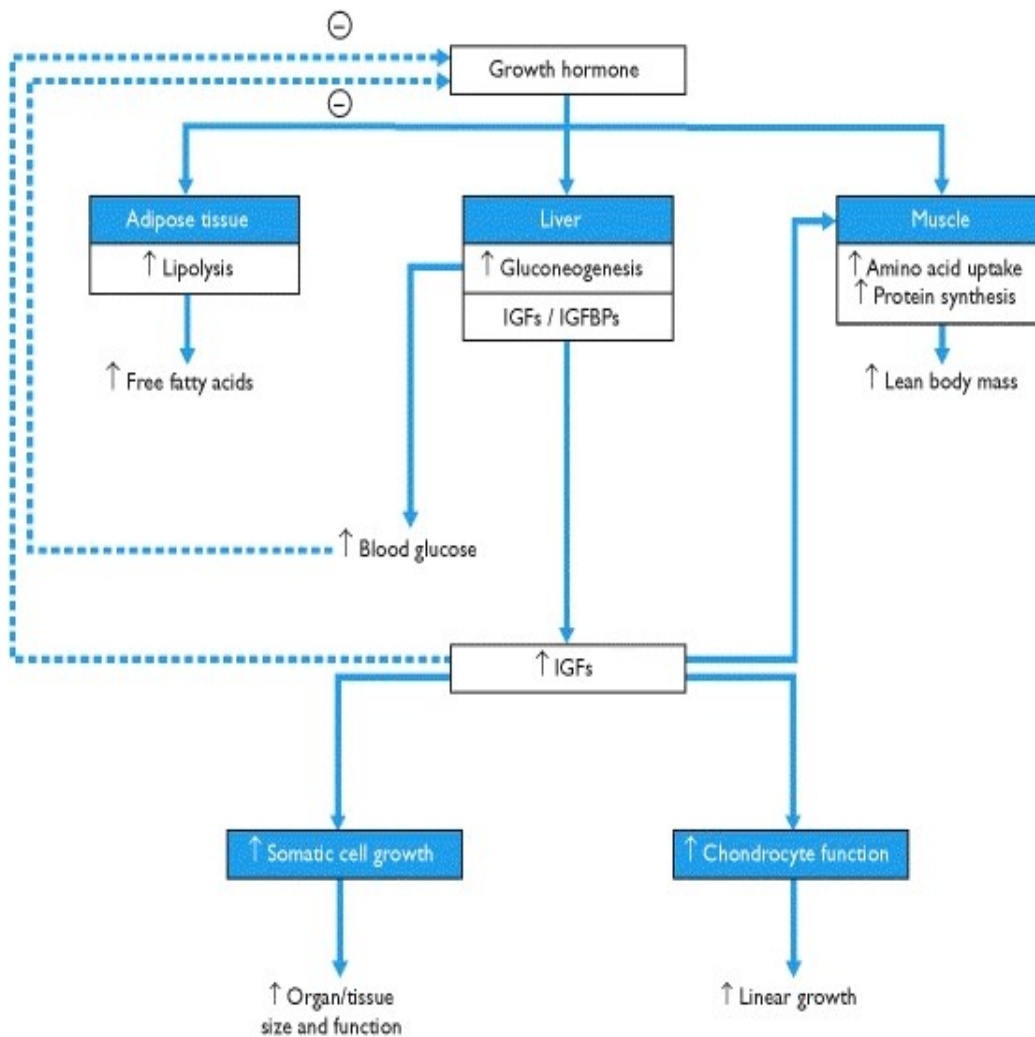


FIGURA 9. Schemattizzazione dell'azione del GH

3.6 IGF

IGF-1, un peptide formato da 70 amino acidi, ed IGF-2, formato da 67 amino acidi, condividono 45 di 73 possibile posizioni degli amino acidi ed hanno un omologia pari a circa il 50% con l'insulina.⁽⁸⁹⁾ La loro somiglianza strutturale spiega la capacità delle IGF di legarsi ai recettori dell'insulina, e di quest'ultima di legarsi ai recettori tipo 1 dell'IGF.⁽⁹⁰⁾ Il GH appare essere il principale regolatore della trascrizione del gene del'IGF-1, che si attiva dopo

solo 30 minuti dall'iniezione intraperitoneale di GH in ratti ipofisectomizzati.⁽⁹¹⁾ L'attivazione trascrizionale da GH agisce su entrambi i promotori di IGF-1, aumentando di circa 20 volte l'mRNA IGF-1. Un altro fattore che influenza l'espressione del gene IGF-1 è l'estrogeno, che aumenta l'espressione di mRNA IGF-1 nell'utero ma ne inibisce la trascrizione di IGF-1 GH mediata nel fegato.

Come descritto precedentemente, STAT5b è il più importante mediatore dell'attivazione GH-mediata della trascrizione del gene per IGF-1.⁽⁹²⁾ I fattori nella regolazione dell'espressione del gene di IGF-2 sono meno chiari.⁽⁹³⁾

3.7 DEFICIT DI GH

I corretti metodi per diagnosticare un deficit di GH (GHD) sono controversi.⁽⁹⁴⁾ Il fondamento per la diagnosi di GHD si ottiene mediante attenta documentazione delle altezze seriate e determinazione della velocità di crescita. Nel caso di assenza di altre evidenze di disfunzione della secrezione ipofisaria di GH, solitamente non è necessario eseguire ulteriori esami. Pertanto anche in bambini con altezza inferiore al quinto percentile in altezza, ma con documentazione di una velocità di crescita normale per diversi anni, rende la diagnosi di GHD improbabile.

La valutazione della produzione di GH è difficile per la sua secrezione pulsatile, con i picchi massimi che avvengono durante la fase 3 e 4 del sonno. Come già accennato precedentemente, la valutazione random sierica di GH è

pressoché inutile nello studio del GHD, pertanto ci si basa sulla risposta a stimoli fisiologici e farmacologici. Questi test di provocazione sono stati alla base della diagnosi di GHD da più di trent'anni.⁽⁹⁵⁾ Gli stimoli fisiologici includono, il sonno, il digiuno e l'esercizio, mentre gli stimoli farmacologici includono la Levodopa, la Clonidina, il Glucagone, il Propanololo, l'Arginina, l'Insulina ed altri.⁽²⁶⁾ E' generalmente accettato che un bambino debba risultare deficiente in un test con almeno due diversi stimoli per essere considerato GHD. Nonostante i test da stimoli siano alla base della diagnosi di GHD, sono criticati per molteplici ragioni:

- 1) *Test da stimolo del GH non fisiologici.* Nessuno dei test da stimolo mimano con soddisfazione il normale pattern di secrezione del GH ipofisario. Anche quando vengono utilizzati peptidi regolatori fisiologici per la stimolazione, la loro via di somministrazione, la loro dose e la loro interazione con altri fattori di regolazione in queste situazioni, è artificiale. Inoltre, visto che la maggior parte dei centri endocrinologici utilizzano diversi test da stimolo, non ci sono metodi validati per confrontare i dati conflittuali di due o più test di provocazione.⁽²⁾ Per enfatizzare questo dato, Guyda ha riportato uno studio che analizzava 6373 test di provocazione su 3233 bambini francesi con bassa statura; 11 diversi test farmacologici, con 62 delle 66 possibili combinazioni, sono stati utilizzati almeno una volta, e la combinazione più usata veniva utilizzata solo nel 12,7% dei pazienti.⁽⁸³⁾

2) *Definizione arbitrarie di risposte a test provocativi “subnormali”.*

Diversi centri variano nelle definizioni di un normale test da stimolo. I primi studi utilizzavano un cutoff di 2.5ug/L, valore che è stato gradualmente aumentato fino a 7ug/L ed in seguito, con la disponibilità di GH ricombinante, a 10ug/L, nonostante non ci siano valori di cutoff arbitrari.⁽⁴⁾ Molti dei nuovi esami misurano meglio l'immunopotenza del GH del 33% al 50% dei vecchi esami utilizzati, ma non vi è stata una valutazione sistematica di un “nuovo normale” valore di cutoff né una valutazione critica di quale esame utilizzare.⁽⁵⁾

3) *Correlazione con l'età ed uso di steroidi gonadici.* Come già accenato, i livelli sierici di GH aumentano durante la pubertà, tipicamente per un aumento dell'ampiezza delle pulsazioni piuttosto che per un aumento della frequenza delle pulsazioni.^(6,3) Prima, e durante le prime fasi della pubertà, la secrezione di GH potrebbe essere così bassa da offuscare la discriminazione tra GHD e ritardo costituzionale di crescita.⁽⁶⁾ Molti bambini che “falliscono” il test da stimolo del GH prima della pubertà, risultano “normali” al test dopo la comparsa della pubertà o dopo la somministrazione di steroidi gonadici.^(7,8) In uno studio condotto su bambini con GHD e bassa statura idiopatica (ISS) l'utilizzo di estrogeni prima di test di provocazione, rispetto a placebo, utilizzando 9ug/L come cutoff, aveva una efficienza diagnostica del 98%. Un altro studio, in bambini con statura normale, ha documentato il problema di tali test e la

necessità di una standardizzazione per la somministrazione di steroidi gonadici durante i test da stimolo nei bambini prepuberi.⁽⁹⁾

4) *La variabilità degli esami del GH ne limitano il potere discriminatorio.*

Molti studi hanno dimostrato una variabilità che aumentava anche di tre volte il valore dello stesso GH sierico in base al laboratorio utilizzato.^(10,11) Questo è spiegato in parte dalla presenza di diverse forme molecolari di GH nel siero e dall'utilizzo di diversi anticorpi monoclonali. Pertanto ne segue che bambini diagnosticati con GHD da un esame, possono risultare normali in un altro.

5) *La spesa, lo sconforto ed i rischi dei test di provocazione.*

I test da stimolo richiedono campioni di sangue a determinati tempi e la somministrazione parenterale di farmaci, il che porta ad un evidente sconforto per il paziente. Inoltre, alcuni test che richiedono la somministrazione di insulina possono causare ipoglicemia e convulsioni e dovrebbero essere utilizzati solo da personale medico. Sono state descritte morti dovute da ipoglicemia, indotte da insulina, o dalla sua eccessiva correzione con glucosio parenterale.⁽¹¹⁾

6) *Scarsa riproducibilità dei test di provocazione.*

La riproducibilità dei test da stimolo non è mai stata adeguatamente documentata, anche quando il campione di GH veniva misurato dallo stesso laboratorio.⁽¹²⁾

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in maniera retrospettiva su 159 bambini, di cui 117 maschi e 42 femmine, con età compresa dai 2.4 ai 16.1 anni, seguiti per bassa statura presso il Dipartimento di Endocrinologia e Diabetologia dell'ospedale Mt Sinai di New York. In questi bambini, peso ed altezza sono stati valutati privi di scarpe, con indosso esclusivamente la biancheria intima. Tutti i parametri, tranne il risultato del test da stimolo e l'età ossea, sono stati raccolti il giorno dell'esecuzione della Risonanza Magnetica.

Per rilevare l'altezza è stato utilizzato lo stadiometro di Holtain e la misura è stata espressa in cm, con uno scarto di 1 mm, mentre per valutare il peso è stata impiegata una bilancia manuale "SECA" e la dimensione è stata espressa in Kg, con uno scarto di 100 g. Le misurazioni sono state effettuate al mattino, previo consenso dei genitori. Per ogni bambino è stato calcolato l'indice di massa corporea (BMI), secondo la formula $\text{peso (Kg)}/\text{altezza}^2 (\text{m}^2)$. Sono poi stati calcolati i Z score (Altezza-SDS, peso-SDS e BMI-SDS) secondo il metodo LMS ed i parametri di riferimento del CDC 2000.⁽⁹⁶⁾

Per ogni bambino è stato valutato ispettivamente e palpatoriamente lo sviluppo puberale secondo gli stadi di Tanner.⁽⁹⁷⁾ L'età ossea è stata calcolata tramite una radiografia del polso e della mano sinistra secondo Greulich-Pyle.⁽²⁷⁾ Nessuna della radiografie della mano è stata eseguita previo od oltre 6 mesi di distanza dall'esecuzione della RMN, il volare definitivo è stato

ottenuto partendo dal presupposto di una crescita ossea lineare regolare del bambino.

Per valutare il picco della secrezione del GH sono stati utilizzati L-Dopa ed Arginina secondo il seguente schema:

a) Digiuno dalla mezzanotte; b) prelievo ematico a tempo 0 di GH, IGF-1 ed IGFBP-3; c) somministrazione orale di L-dopa (125mg per peso < 13.5kg; 250mg per peso dai 13.5kg-31.5kg; 500mg per peso > 31.5kg) e somministrazione intravenosa di Arginina (0.5gr/kg; massimo 40gr) in 30 minuti; d) prelievi ematici a tempo 30', 60', 90' e 120'. I valori sierici di GH sono in seguito stati analizzati tramite radioimmuno-analisi (RIA) con duplici anticorpi presso il laboratorio della Esoterix INC di New York.

La risonanza magnetica per lo studio della sella turcica utilizza immagini planari più sottili rispetto allo studio routinari del cervello. In questo studio sono stati acquisiti i dati utilizzando scanner clinici 1.5T o 3T (Signa LX, Excite or HDx, General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI USA). Le sequenze della sella turcica sono state acquisite con immagini di 3 mm di spessore ad alta risoluzione T1-pesata in entrambi il piano sagittale e coronale, con un gap di 0.3mm tra le immagini. Queste sequenze T1 sono state ripetute dopo somministrazione di Gadolinio intravenoso. Addizionali immagini coronali T2 ad alta risoluzione della sella turcica sono state acquisite ma non

utilizzate per analisi numeriche. Ulteriori indagini sequenziali del cervello, T2 assiale e T1 post-gadolinio, sono state ottenute come da routine per lo studio della sella turcica ma anche queste non sono state utilizzate per analisi.

Tutte le misurazioni sono state ottenute utilizzando il software General Electric Centricity PACS 2.1.2.1 workstation. I diametri o l'area superficiale sono stati misurati dopo ingrandimento delle immagini di 3 volte per ottimizzare la posizione del calibro. Le misurazioni in seguito sono state copiate in un database.

Nelle immagini sagittali l'area superficiale della ghiandola è stata tracciata nel suo totale. Inoltre, dopo aver tracciato una linea tangente tra i margini anteriori e posteriori della ghiandola, è stata tracciata una linea perpendicolare a questa in modo da determinare il grado di deviazione del margine superiore dal piano piatto, per valutare la concavità o convessità della ghiandola. L'altezza maggiore è stata misurata passando attraverso il centro della ghiandola e il diametro anteroposteriore valutato nella sezione più larga. Anche nelle immagini coronali l'area superficiale della ghiandola è stata tracciata nel suo totale. Inoltre l'altezza ed il diametro sono stati misurati come eseguito nelle sezioni sagittali.

Per misurare il volume della ghiandola è stata usata la seguente equazione:

Volume = Volume ellissoidale utilizzando le misure dei diametri = $\frac{4}{3} * \pi * (h/2) * (w/2) * (d/2)$

Tutti i valori sono indicati come medie \pm una deviazione standard. I test statistici utilizzati sono la regressione lineare semplice per le correlazione, il test t di Studented il Chi-Square. La significativita' statistica e' data da una $p < 0.05$.

Dallo studio sono stati esclusi soggetti affetti da cromosomopatie o difetti genetici.

RISULTATI

Lo studio ha coinvolto un totale di 159 bambini, di cui 117 maschi (73%) e 42 femmine (27%). L'età media è di $11,4 \pm 2,4$ anni (con un range tra 2.4 e 16.1 anni). Le caratteristiche auxologiche dei pazienti sono riportate in Tabella 3.

Dal confronto tra i maschi e le femmine non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa per quanto riguarda i valori medi di età cronologica (EC), età ossea (EO, altezza, altezza-SDS, peso, peso-SDS, BMI e BMI-SDS (Tabella 3).

Tabella 3. Caratteristiche generali dei soggetti studiati

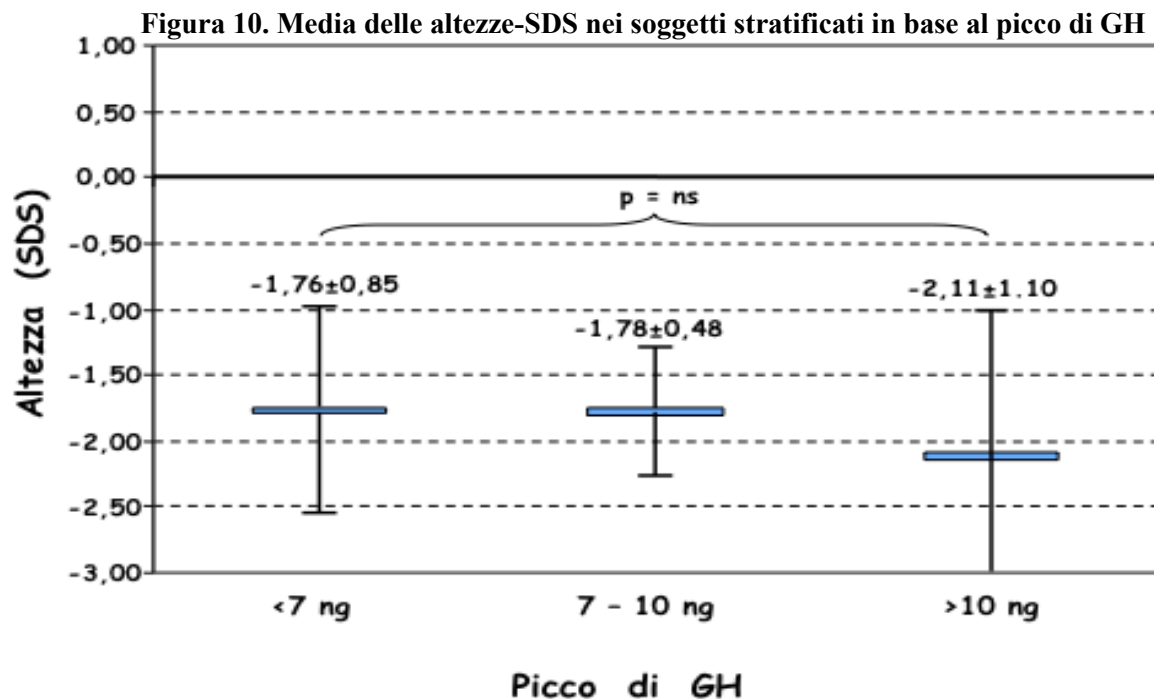
<i>Numero</i>	<i>Totali</i>	<i>Maschi</i>	<i>Femmine</i>	<i>p</i>
<i>EC (anni)</i>	11,4 \pm 2,4	11,7 \pm 2,5	10,7 \pm 2,1	ns
<i>EO (anni)</i>	10,2 \pm 2,7	10,6 \pm 2,8	9,0 \pm 1,9	ns
<i>Altezza-SDS</i>	-1,9 \pm 0,7	-1,8 \pm 0,8	-2,3 \pm 0,7	ns
<i>Peso-SDS</i>	-1,40 \pm 1,24	-1,33 \pm 1,10	-1,64 \pm 1,65	ns
<i>BMI-SDS</i>	-0,3 \pm 1,1	-0,2 \pm 1,1	-0,6 \pm 1,2	ns

I valori di laboratorio e le misurazioni neuroradiologiche sono invece riportati nella tabella 4. Anche qui nel confronto tra maschi e femmine non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa per quanto riguarda i volumi, l'IGF-1, l'IGF1-SDS, l'IGFBP-3, l'IGFB3-SDS e il picco di GH (Tabella 4).

Tabella 4. Valori di laboratorio e misurazioni neuroradiologiche dei soggetti studiati

	<i>Totali</i>	<i>Maschi</i>	<i>Femmine</i>	<i>p</i>
<i>Numero</i>	159	117	42	
<i>Volume (mm3)</i>	264,5 ± 100.6	266.8 ± 93.0	258.3 ± 120.2	ns
<i>IGF-1 (ng/mL)</i>	173.7 ± 96.7	180.6 ± 106.0	154.3 ± 61.1	ns
<i>IGF1-SDS</i>	-1,2 ± 1,3	-1,1 ± 1,4	-1,3 ± 1,2	ns
<i>IGFBP-3 (mg/L)</i>	2,8 ± 0,9	2,8 ± 0,9	3,0 ± 0,7	ns
<i>IGFBP3-SDS</i>	-0,6 ± 1,3	-0,8 ± 1,3	-0,1 ± 1,1	ns
<i>GH PEAK (ng/L)</i>	11,1 ± 8,2	10,2 ± 5,9	13,5 ± 12,3	ns

La figura 9 mette in evidenza, per risposte ai test di stimolo del GH per valori inferiore a 7, tra 7 e 10 e maggiori di 10, che non esiste una correlazione per quanto riguarda l'altezza-SDS. I pazienti che hanno risposto di piu' allo stimolo per il GH sono tendenzialmente piu' bassi rispetto a quelli che hanno risposto di meno. Questo tenderebbe ad indicare che la bassa statura di questi pazienti non e' necessariamente dovuta ad una carenza di GH ma che rappresentano bambini "normali" con bassa statura idiopatica.



In seguito siamo andati a cercare le correlazioni tra il volume ipofisario con le variabili indicate precedentemente e nello stesso modo abbiamo anche cercato una correlazione tra il picco di GH e le variabili (Tabella 5).

Come si rileva dalla tabella 5, si è trovato una correlazione statisticamente significativa tra il Volume e tutte le variabili tranne che con il picco di GH e l'IGFBP3-SDS. Inoltre si è trovato una correlazione inversa statisticamente positiva tra il Picco di GH con il Volume II, l'EC, l'EO, l'altezza, l'altezza-SDS, il peso, il peso-SDS ed il BMI.

Tabella 5. Correlazione tra i volumi misurati ed il picco di GH con le variabili

	Volume	Picco di GH
Volume	r 1.00	r p .2573
Picco GH	r -0.13 p .2573	r 1.00
Eta' Cronologica	r 0.60 p < .0001	r -0.31 p .0166
Eta' Ossea	r 0.66 p < .0001	r -0.28 p .0205
Altezza-SDS	r 0.42 p .0003	r -0.36 p .0023
Peso-SDS	r 0.43 p .0002	r -0.27 p .0217
BMI-SDS	r 0.25 p .0353	r -0.09 p .4952
IGF-1	r 0.55 p < .0001	r -0.16 p .1069
IGF1-SDS	r 0.40 p .0007	r -0.14 p .2065
IGFBP-3	r 0.26 p .0304	r -0.09 p .5026
IGFBP3-SDS	r -0.04 p .6859	r -0.04 p .6782

Figura 11. Correlazioni tra il volume ipofisario con l'età cronologica e l'età ossea (vedere testo per spiegazione)

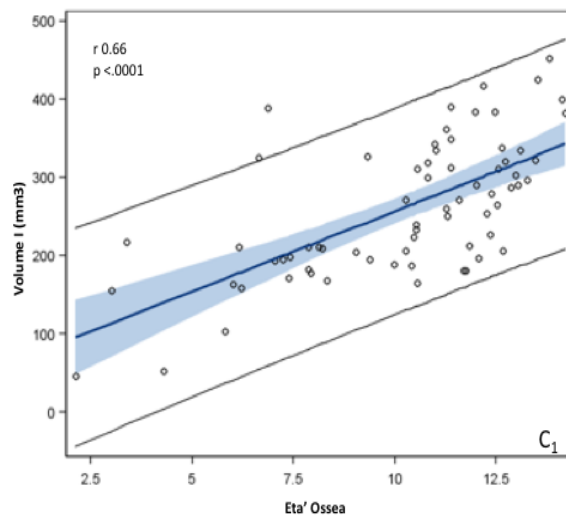
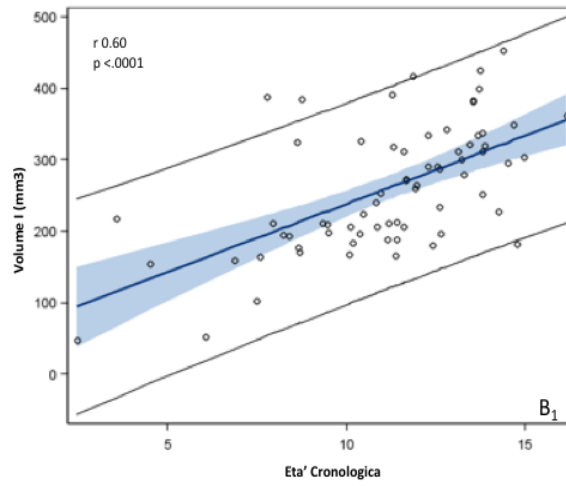
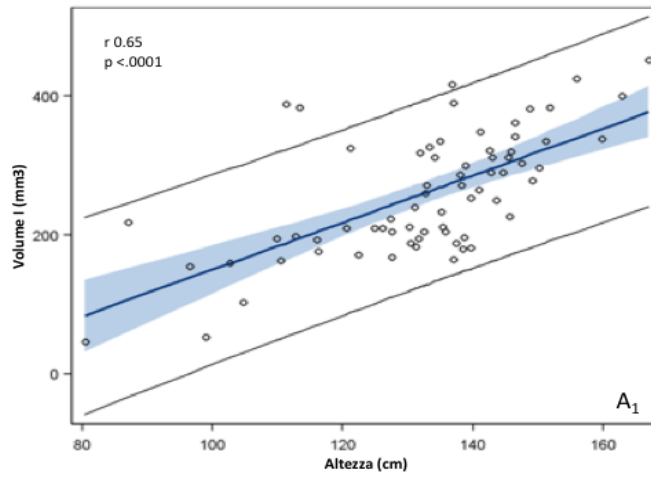


Figura 12. Correlazioni tra il volume ed il picco di GH

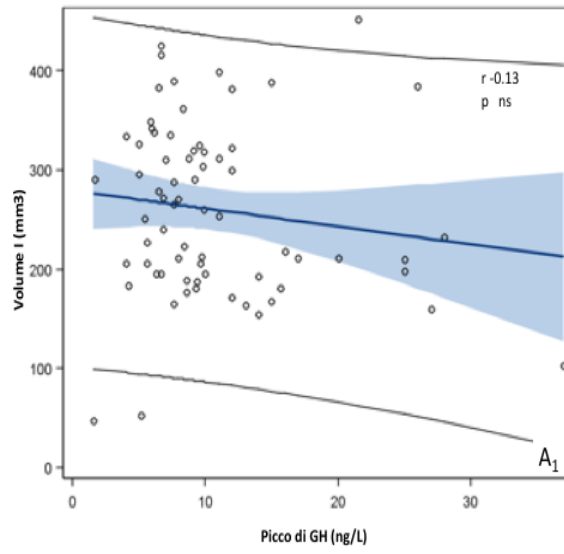


Figura 13. Correlazioni tra il volume ed l'IGF-1

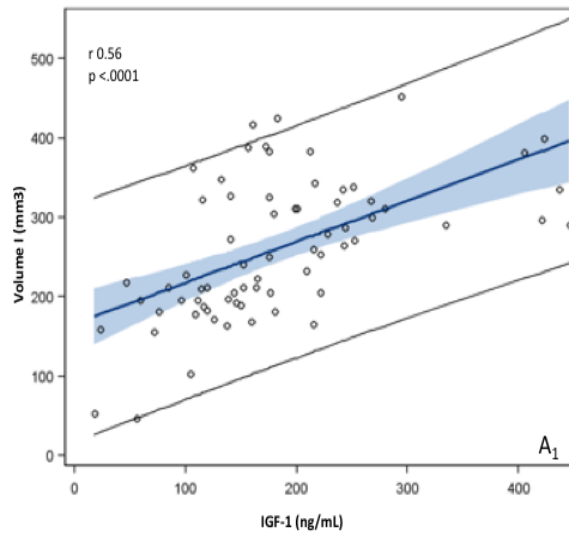


Figura 14. Correlazioni del picco di GH con il peso ed il BMI

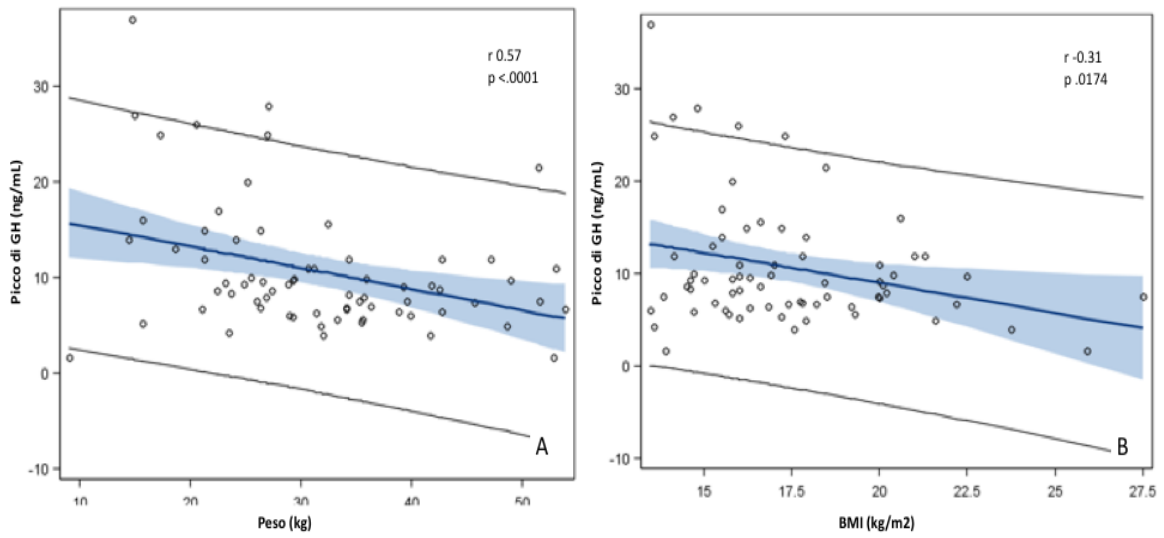
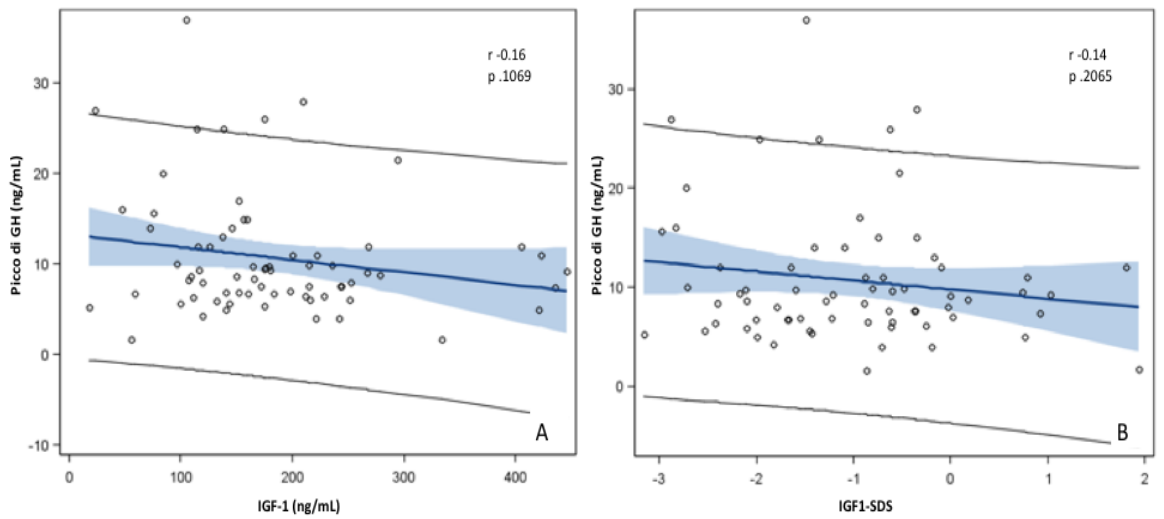


Figura 15. Correlazioni del picco di GH con l'IGF-1 e l'IGF1-SDS



Inseguito abbiamo voluto dividere i soggetti in due gruppi in base allo stadio puberale. In un gruppo sono collocati i bambini ancora in fase prepubere (45%) mentre nel secondo gruppo i bambini che avevano già mostrato segni di sviluppo puberale (55%) (Tabella 6). I parametri come l'età cronologica, l'età ossea, l'altezza, il peso ed il BMI sono stati esclusi in quanto evidentemente significativamente diversi nei due gruppi.

Tabella 6. Differenze nel gruppo Prepubere e Pubere

	<i>Totali</i>	<i>Prepuberi</i>	<i>Puberi</i>	<i>p</i>
<i>Numero</i>	159	80	79	
<i>Volume I</i>	260,0 ± 87,1	215,8 ± 76,0	296,2 ± 79,2	<.0001
<i>Picco GH</i>	11,0 ± 6,8	13,4 ± 7,2	8,5 ± 3,4	.0018
<i>Altezza-SDS</i>	-1,88 ± 0,85	-2,22 ± 0,83	-1,60 ± 0,76	.0021
<i>Peso-SDS</i>	-1,40 ± 1,24	-1,81 ± 1,12	-1,07 ± 1,25	.0124
<i>BMI-SDS</i>	-0,33 ± 1,19	-0,45 ± 1,10	-0,24 ± 1,27	.4617
<i>IGF</i>	182,6 ± 94,4	121,4 ± 45,4	232,5 ± 95,0	<.0001
<i>IGF-SDS</i>	-1,03 ± 1,13	-1,56 ± 0,96	-0,59 ± 1,08	.0002
<i>IGF-BP3</i>	2,7 ± 0,9	2,49 ± 1,07	2,88 ± 0,72	.0792
<i>IGFBP3-SDS</i>	-0,75 ± 1,37	-0,61 ± 1,8	-0,88 ± 0,88	.4288

Dal confronto tra questi due gruppi abbiamo notato una differenza statisticamente positiva tra il volume, il picco di GH, l'altezza-SDS, il peso-SDS, l'IGF-1 e l'IGF1-SDS. E' importante notare che il picco di GH e' significativamente superiore nel gruppo Prepubere (Figura 18) mentre l'IGF-1 (Figura 17B) e' significativamente superiori nel gruppo Pubere.

Figura 16. Differenza del volume ipofisario tra il gruppo prepubere e pubere

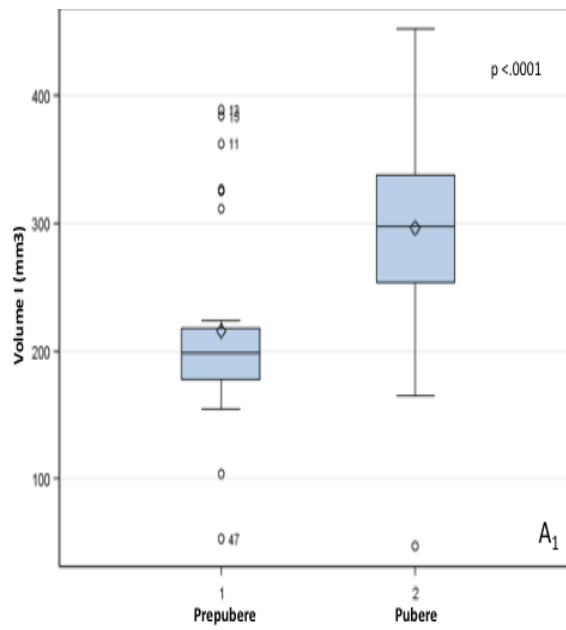


Figura 17. Differenza nei valori dell'Altezza-SDS e dell'IGF1 tra il gruppo prepubere e pubere

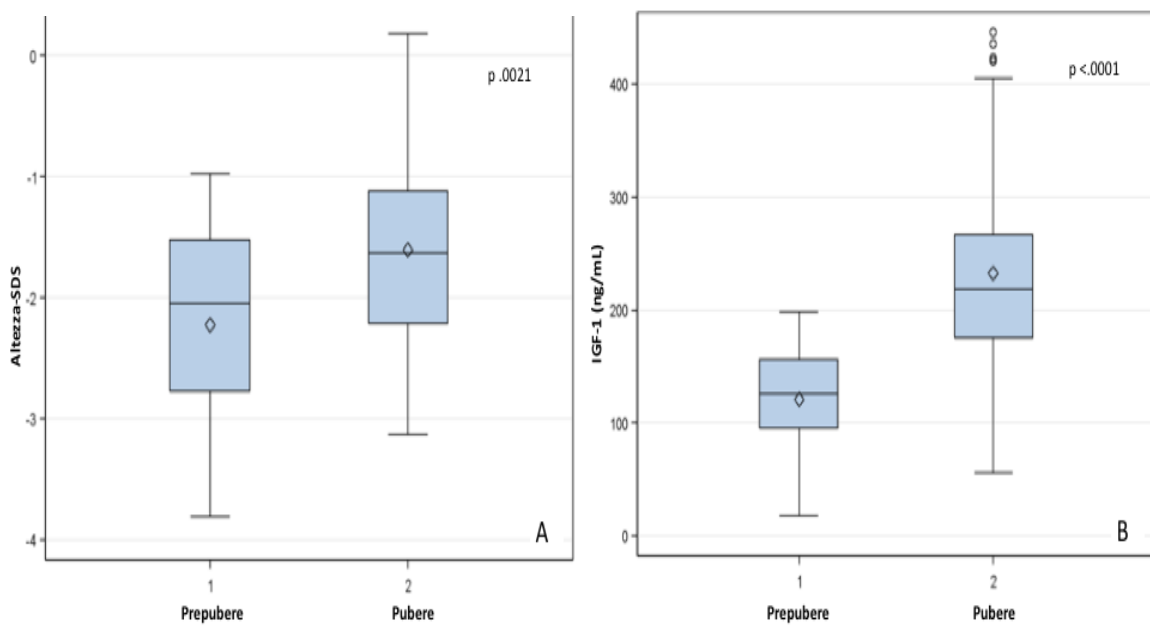
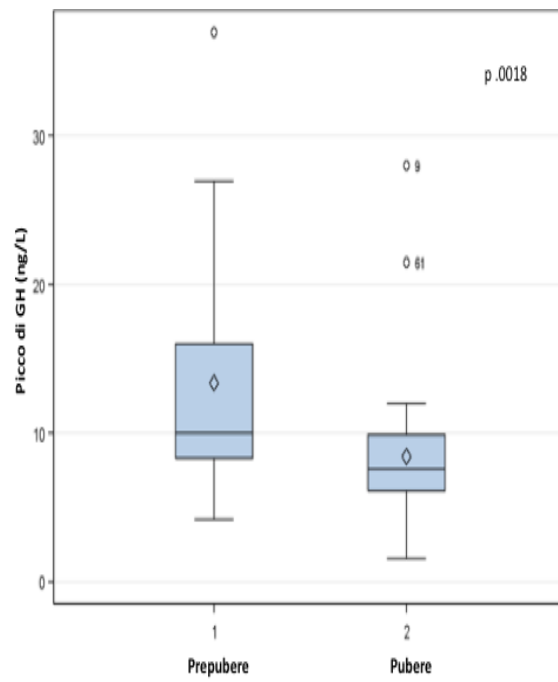


Figura 18. Differenza nei valori del Picco di GH tra il gruppo prepubere e pubere



DISCUSSIONE

Come già accennato, la bassa statura è tra le principali cause di richiesta di visita specialistica Endocrinologica nei paesi sviluppati, portando a visite, test e terapie che spesso risultano non essere necessarie. Con l'avvento della terapia sostitutiva con GH ricombinante umano, sempre più bambini vengono trattati, anche quando non necessario, a causa di un'assenza di un gold standard per la diagnosi di GHD.

Questo studio descrive le caratteristiche cliniche, biochimiche e neuroradiologiche in un gruppo di bambini di bassa statura, con lo scopo di identificare quei parametri che, vista l'assenza di un gold-standard, aiutino nella corretta diagnosi di GHD.

Come riportato nella tabella 3 la nostra casistica presentava un 77% di maschi contro un 23% di femmine e, tra questi due gruppi, non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa per quanto riguarda i parametri analizzati. Questo dato è in accordo con quanto rilevato in letteratura per quanto riguarda la maggior percentuale di maschi valutati per bassa statura⁽⁹⁸⁾, ma è in disaccordo per quanto riguarda l'altezza-SDS che viene riportato inferiore nelle femmine.⁽⁹⁹⁾ Entrambi questi dati possono essere spiegati in quanto probabilmente, dal punto di vista sociale, la bassa statura è un parametro più accettato nel sesso femminile che in quello maschile, per cui le

femmine che vengono indirizzate verso l'endocrinologo per problemi di altezza sono di minor numero e notevolmente piu' basse. Nel nostro studio non abbiamo trovato differenze in termine di altezza ma probabilmente questo e' da attribuire ad uno scarso numero di soggetti totali ed in particolare femminili.

Calcolato il volume ipofisario, come spiegato nella sezione dei Materiali e Metodi, abbiamo visto che in uno studio di Fink et al⁽¹⁰⁰⁾, sono stati paragonati i volumi ipofisari calcolati mediante la formula utilizzata per il nostro Volume e mediante la risonanza magnetica 3D in bambini normali sotto i 10 anni, ed hanno evidenziato che la formula sottostimava il vero volume della ghiandola. Sempre nello stesso studio, avevano trovato una correlazione tra il volume ipofisario misurato in 3D e l'eta' cronologica, l'altezza, l'altezza-SDS, il BMI ed il BMI-SDS.⁽¹⁰⁰⁾ Nel nostro studio abbiamo trovato la medesima correlazione (Figura 11).

In seguito abbiamo correlato i picchi di GH con i volumi ipofisari calcolati. Qui abbiamo trovato che il volume si correlava inversamente al picco di GH anche se non statisticamente significativo. Quindi, nei nostri soggetti, all'aumentare del volume ipofisario diminuiva il picco di GH. Questo dato e' in disaccordo con quanto trovato da Huot et al⁽¹⁰¹⁾ che hanno dimostrato una correlazione significativa tra i valori sierici di GH notturno ed il volume ipofisario. Il nostro dato potrebbe essere spiegato dalla figura 12 che dimostra che all'aumentare del volume ipofisario aumenta in maniera significativa e con

una buona correlazione i valori di IGF-1, questo aumento potrebbe causare un feedback negativo centrale sulla produzione di GH. Infatti nella figura 14 vediamo una correlazione inversa, per quanto non significativa, del picco di GH con i valori di IGF-1 ed IGF1-SDS.

Altre correlazioni inverse significative che abbiamo trovato con il picco di GH riguardano il peso (Figura 14A), il peso SDS ed il BMI (Figura 14B), dati che vengono confermati da diversi studi in letteratura.^(58,63,70,72) Per quanto riguarda la correlazione inversa tra l'età cronologica, l'età ossea, l'altezza e l'altezza SDS, questi dati sono discordanti da quelli trovati da Gandrud LM et al., che hanno dimostrato una correlazione positiva tra questi ed il picco di GH.⁽¹⁰²⁾ Un'ipotesi per spiegare questo andamento nel nostro studio potrebbe essere che essendo stato uno studio retrospettivo, ci siamo affidati all'unico dato del picco di GH, sarebbe stato utile valutare la risposta ad ogni tempo dei test da stimolo per calcolare l'area sotto la curva per avere un'idea della risposta ipofisaria integrata in seguito alla stimolo farmacologico.

Infine andando a studiare come la comparsa della pubertà influenzasse i parametri ricercati, abbiamo trovato che nei soggetti che mostravano segni di pubertà, i valori del Volume ipofisario (Figura 16A), dell'altezza-SDS (Figura 17A), dell'IGF-1 (Figura 17B) del peso-SDS e dell'IGF1-SDS erano statisticamente maggiori rispetto ai soggetti senza segni di pubertà (Tabella 6); mentre è stata trovata una differenza statisticamente significativa, con valori

piu' alti nel gruppo Prepubere, per quanto riguarda il picco di GH (Figura 18). In letteratura troviamo diversi studi che dimostrano l'aumentare della produzione di GH con la comparsa della puberta',^(64,66) pero' questi studi tengono conto della produzione di GH nello stesso soggetto in uno stato prepubere e pubere e sarebbe quindi sbagliato fare un confronto tra soggetti diversi. Inoltre, come gia' notato nella correlazione tra i volumi e l'IGF-1, anche qui troviamo che nei due gruppi i valori di IGF-1 sono significativamente piu' alti nel gruppo Pubere, come si vede dalla Figura 15, e come gia' accenato precedentemente potrebbe aver comportre un feedback negativo sulla produzione di GH.

CONCLUSIONE

L'assenza di un gold standard per la diagnosi di GHD ha comportato un aumento continuo nel trend di pazienti trattati con il GH per bassa statura. Nel 2004 Janssen et al., hanno pubblicato che piu' di centomila persone venivano trattate con GH ricombinante in tutto il mondo.⁽¹⁰³⁾ Solitamente il costo di tale terapia varia da nazione a nazione, aggirandosi pero' intorno ai 10000-30000 dollari/anno.⁽¹⁰⁴⁾ Si puo' pertanto capire l'impatto sulla spesa sanitaria per tale terapia specialmente nei casi in cui non ci sarebbe veramente bisogno.

Come gia' accenato precedentemente l'iter per diagnosticare GHD e' composto da tappe che comprendono diverse misurazioni della crescita staturale ed osservazione della velocita' di crescita in rapporto anche all'eta' ossea e lo stadio puberale. In seguito ad una prima differenziazione tra pazienti che crescono regolarmente e pazienti con diminuita' velocita' di crescita bisogna eseguire ulteriori accertamenti tra cui esami biochimici e quando necessario esami neuroradiologici. Nel nostro studio abbiamo voluto mettere a confronto ed analizzare i parametri clinici, biochimici e radiologici che si accompagnano alla bassa statura e tentare di identificare quali di questi andrebbe meglio indagato visto la scarsa attendibilita' dei test da stimolo del GH da solo. I nostri risultati hanno dimostrato che il volume ipofisario correla bene con l'altezza, l'eta' cronologica e l'eta' ossea, ma non con lo stato

funzionale della secrezione di GH. Questi dati non mettono in evidenza un modo concreto per valutare il deficit di GH, ma confermano la poca attendibilità dell'utilizzo del GHP come solo determinate per la diagnosi di GHD. Inoltre la valutazione tra l'altezza e/o l'età con il volume ipofisario rimane un dato attendibile per sospettare che una bassa statura associata con una piccola sella turcica potrebbe essere il risultato di un deficit di GH.

BIBLIOGRAFIA

1. Fase B, Lippe BM, Kaplan SA. Relative usefulness of three growth hormone stimulation tests. *Am J Dis Child* 1979; 133: 931
2. Tenore A, Tenore A. A pathophysiologic approach to growth problems in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2012; 41: 761-784
3. Guyda HJ. Growth hormone testing and the short child. *Pediatr Res* 2000; 48:579-580.
4. Grumbach MM, Bin-Abbas BS, Kaplan SL. The growth hormone cascade: progress and long-term results of growth hormone treatment in growth hormone deficiency. *Horm Res* 1998; 49(suppl 2):41-57.
5. Guyda HJ. Four decades of growth hormone therapy for short children: what have we achieved?. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4307-4316.
6. Raiti S, Davis WT, Blizzard RM. A comparison of the effects of insulin hypoglycemia and arginine infusion on release of human growth hormone. *Lancet* 1967; 2:1182-1183.
7. Cacciari E, Tassoni P, Parisi G, et al. Pitfalls in diagnosing impaired growth hormone (GH) secretion: retesting after replacement therapy of 63 children defined as GH deficient *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:1284-1289.
8. Lippe B, Wong S-L, Kaplan SA. Simultaneous assessment of growth hormone and ACTH reserve in children pretreated with diethylstilbestrol. *J Clin Endocr* 1971; 33:949-956.
9. Marin G, Domene HM, Barnes KM, et al. The effects of estrogen priming and puberty on the growth hormone response to standardized treadmill

- exercise and arginine-insulin in normal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:537-541.
10. Reiter EO, Morris AH, MacGillivray MH, et al. Variable estimates of serum growth hormone concentrations by difference radioassay systems. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:68-71.
 11. Shah A, Stanhope R, Matthews D. Hazards of pharmacological tests of growth hormone secretion in childhood. *Br Med J* 1992; 304:173-174.
 12. Eddy RL, Gilliland PF, Ibarra Jr JD, et al. Human growth hormone release. Comparison of provocative test procedures. *Am J Med* 1974; 56:179-185.
 13. Argyropokou M, Perignon F, Brunelle F, Brauner R and Rappaport R. Height of normal pituitary gland as function of age evaluated by magnetic resonance imaging in children. *Pediatric Radiology* 1991; 21:247-249
 14. Fink AM, Vidmar S, Kumbala S, Pedreira CC, Kanumakala S, Williams C, Carlin JB, Cameron FJ. Age-related pituitary volumes in prepubertal children with normal endocrine function: volumetric magnetic resonance data. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(6):3274-8
 15. Kaplan SL. Normal and abnormal growth. In: Rudolph AM, ed. *Pediatrics*, New York: Appleton-Century Crofts; 1977.
 16. Heinrichs C, Munson PJ, Counts DR, et al. Patterns of human growth. *Science* 1995; 268:442-444.
 17. Lampl M, Cameron N, Veldhuis JD, et al. Patterns of human growth response. *Science* 1995; 268:445-447.
 18. Tillmann V, Thalange NKS, Foster PJ, et al. The relationship between stature, growth, and short-term changes in height and weight in normal prepubertal children. *Pediatr Res* 1998; 44:882-886.
 19. Hermanussen M, Lange S, Grasedyck L. Growth tracks in early childhood. *Acta Paediatr* 2001; 90:381-386.

20. Reiter EO, Rosenfeld R. Normal and Aberrant Growth. In: Williams Textbook of Endocrinology 11th Edition 2008; 23:849-850
21. Lampl M, Velhuis JD, Johnson ML. Saltation and stasis: a model of human growth. *Science* 1992; 258:801-803.
22. Martin DD, Hauspie RC, Ranke MB. Total pubertal growth and markers of puberty onset in adolescents with GHD: comparison between mathematical growth analysis and pubertal staging methods. *Horm Res* 2005; 63:95-101.
23. Tanner JM. *Auxology*. In: Kappy MS, Blizzard RM, Migeon CJ, ed. *The Diagnosis and Treatment of Endocrine Disorders*, Springfield, IL: Charles C. Thomas; 1994:137-192.
24. Nilsson O, Baron J. Fundamental limits on longitudinal bone growth: growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:370-374.
25. Parfitt AM. Misconceptions: epiphyseal fusion causes cessation of growth. *Bone* 2002; 30:337-339.
26. Reiter EO, Rosenfeld RG. *Normal and aberrant growth*. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, et al ed. *Williams Textbook of Endocrinology*, Philadelphia: Saunders; 2002:1003-1114.
27. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist. Stanford, CA, Stanford University Press, 1959.
28. Roche AF, Davila GH, Eyman SL. A comparison between Greulich-Pyle and Tanner-Whitehouse assessments of skeletal maturity. *Radiology* 1971; 98:273-280.
29. Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N, et al. Assessment of Skeletal Maturity and Prediction of Adult Height. New York: Academic Press, 1983
30. Ogden CL, Kuczmarski RJ, Flegal KM, et al. Centers for Disease Control and Prevention 2000 growth charts for the United States: improvements to the 1977 National Center for Health Statistics version. *Pediatrics* 2002; 109:45-60.

31. Tanner JM, Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity and the stages of puberty. *Arch Dis Child* 1976; 51:170-179.
32. Rosenfeld RG. The molecular basis of idiopathic short stature. *Growth Horm IGF Res* 2005; 15(Suppl A):3-5.
33. Ikeda H, Suzuki J, Sasano N, et al. The development and morphogenesis of the human pituitary gland. *Anat Embryol (Berl)* 1988; 178:327-336.
34. Goodyer CG. *Ontogeny of pituitary hormone secretion*. In: Collu R, Ducharme JR, Guyda HJ, ed. *Pediatric Endocrinology*, New York: Raven; 1989:125-169.
35. Zhu X, Lin CR, Prefontaine GG, et al. Genetic control of pituitary development and hypopituitarism. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15:332-340.
36. Knigge KM, Scott DE. Structure and function of the median eminence. *Am J Anat* 1970; 129:223-243.
37. Thorner MO, Vance ML, Horvath E, et al. *The anterior pituitary*. In: Wilson JD, Foster DW, ed. *Williams Textbook of Endocrinology*, Philadelphia: WB Saunders; 1991:210-221.
38. Scheithauer BW, Sano T, Kovacs K, et al. The pituitary gland in pregnancy: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases. *Mayo Clin Proc* 1990; 65:461-474.
39. Braak H, Braak E. Anatomy of the human hypothalamus (chiasmatic and tuberal region). *Prog Brain Res* 1992; 93:3-14.
40. Trandafir T, Dionisie C, Repciuc E. The development of the hypothalamo-hypophysial portal system in human fetus. *Endocrinologie* 1982; 20:127-134.
41. Mullis PE. Genetic control of growth. *Eur J Endocrinol* 2005; 152:11-31.
42. Page RB. Pituitary blood flow. *Am J Physiol* 1982; 243:E427-E442.

43. Stanfield JP. The blood supply of the human pituitary gland. *J Anat* 1960; 94:257-273.
44. Baumann G. Heterogeneity of growth hormone. In: Bercu B, ed. *Basic and Clinical Aspects of Growth Hormone*, New York: Plenum; 1988:13-31.
45. Frankenne F, Closset J, Gomez F, et al. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:1171-1180.
46. Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evaluation of the growth hormone gene family. *Annu Rev Med* 1983; 34:519.
47. Cooke NE, Ray J, Watson MA, et al. Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J Clin Invest* 1988; 82:270-275.
48. Frohman LA, Kineman RD, Kamegi J, et al. Secretagogues and the somatotrope: signaling and proliferation. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55:269-290.
49. Kineman RD, Aleppo G, Frohman LA. The tyrosine hydroxylase-human growth hormone (GH) transgenic mouse as a model of hypothalamic GH deficiency: growth retardation is the result of a selective reduction in somatotrope numbers despite normal somatotrope function. *Endocrinology* 1996; 137:4630-4636.
50. Hartman ML, Faria AC, Vance ML, et al. Temporal sequence of in vivo growth hormone secretory events in man. *Am J Physiol* 1991; 260:E101-E110.
51. Frohman LA. Neurotransmitters as regulators of endocrine function. In: Krieger DT, Hughes JC, ed. *Neuroendocrinology*, Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1980.
52. Deller JJ, Plunket DC, Forsham PH. Growth hormone studies in growth retardation: therapeutic response to administration of androgen. *Calif Med* 1996; 104:359.

53. Ho KY, Evans WS, Bilzard RM, et al. Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:51-58.
54. Katz HP, Youlton R, Kaplan SL, et al. Growth and growth hormone. III. Growth hormone release in children with primary hypothyroidism and thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1969; 29:346.
55. Frantz AG, Rabkin MT. Human growth hormone. Clinical measurement, response to hypoglycemia and suppression by corticosteroids. *N Engl J Med* 1964; 271:1375-1381.
56. Rosenfeld RG, Ceda G, Wilson DM, et al. Characterization of high-affinity receptors for insulin-like growth factors-I and -II on rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1984; 114:1571-1575.
57. Hartman ML, Veldhuis JD, Thorner MO. Normal control of growth hormone secretion. *Horm Res* 1993; 40:37-47.
58. Veldhuis JD, Liem AY, South S, et al. Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3209-3222.
59. Gill MS, Thalange NK, Foster PJ, et al. Regular fluctuations in growth hormone (GH) release determine normal human growth. *Growth Horm IGF Res* 1999; 9:114-122.
60. Grumbach MM, Gluckman PD. The human fetal hypothalamic and pituitary gland: the maturation of neuroendocrine mechanisms controlling secretion of fetal pituitary growth hormone, prolactin, gonadotropin, adrenocorticotropin-related peptides and thyrotropin. In: Tulchinsky D, Little AB, ed. *Maternal and Fetal Endocrinology*, Philadelphia: WB Saunders; 1994:193-261.

61. Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML. The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. *Recent Prog Horm Res* 1976; 32:161-243.
62. Arosio M, Cortelazzi D, Persani L, et al. Circulating levels of growth hormone, insulin-like growth factor-I and prolactin in normal, growth-retarded and anencephalic human fetuses. *J Endocrinol Invest* 1995; 18:346-353.
63. Martha Jr PM, Gorman KM, Blizzard RM, et al. Endogenous growth hormone secretion and clearance rates in normal boys, as determined by deconvolution analysis: relationship to age, pubertal status and body mass. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:336-344.
64. Martha PM, Rogol AD, Veldhuis JD, et al. Alterations in the pulsatile properties of circulating growth hormone concentrations during puberty in boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:563-570.
65. Pincus SM, Veldhuis JD, Rogol AD. Longitudinal changes in growth hormone secretory process irregularity assessed transpubertally in healthy boys. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E417-E424.
66. Baumann G, Shaw MA, Amburn K. Circulating growth hormone binding proteins. *J Endocrinol Invest* 1994; 17:67-81.
67. Moran A, Jacobs Jr DR, Steinberger J, et al. Association between the insulin resistance of puberty and the insulin-like growth factor-I/growth hormone axis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4817-4820.
68. Martha Jr PM, Reiter EO. Pubertal growth and growth hormone secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20:165-182.
69. MacGillivray MH, Frohman LA, Doe J. Metabolic clearance and production rates of human growth hormone in subjects with normal and abnormal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1970; 30:632-638.

70. Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, et al. Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *J Clin Invest* 1981; 67:1361-1369.
71. Van Cauter E, Caufriez A, Kerkhofs M, et al. Sleep, awakenings, and insulin-like growth factor-I modulate the growth hormone (GH) secretory response to GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:1451-1459.
72. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Ho KK, et al. Dual defects in pulsatile growth hormone secretion and clearance subserve the hyposomatotropism of obesity in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:51-59.
73. Schalch DS. The influence of physical stress and exercise on growth hormone and insulin secretion in man. *J Lab Clin Med* 1967; 69:256.
74. Holl RW, Hartman ML, Veldhuis JD, et al. Thirty second sampling of plasma growth hormone in man: correlation with sleep stages. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:854-861.
75. Argente J, Caballo N, Barrios V, et al. Multiple endocrine abnormalities of the growth hormone and insulin-like growth factor axis in prepubertal children with exogenous obesity: effect of short- and long-term weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2076-2083.
76. Attia N, Tamborlane WV, Heptulla R, et al. The metabolic syndrome and insulin-like growth factor I regulation in adolescent obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1467-1471.
77. Martin-Hernandez T, Diaz-Galvez M, Torres-Cuadro A, et al. Growth hormone secretion in normal prepubertal children: importance of relations between endogenous secretion, pulsatility and body mass. *Clin Endocrinol* 1996; 44:327-334.
78. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 1987; 330:537-543.

79. Schindler C, Darnell Jr JE. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Ann Rev Biochem* 1995; 64:621-651.
80. Baumann G, Stolar MW, Amburn K, et al. A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:134-141.
81. Holl RW, Snehotta R, Siegler B, et al. Binding protein for human growth hormone: effects of weight and age. *Horm Res* 1991; 35:190-197.
82. Martha PM, Reiter EO, Davila N, et al. The role of body mass in the response to growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1470-1473.
83. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; 10:68-91.
84. Rosenfeld RG, Wilson DM, Dollar LA, et al. Both human pituitary growth hormone and recombinant DNA-derived human growth hormone cause insulin resistance at a postreceptor level. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54:1033-1038.
85. Gerich JE, Lorenzi M, Bier DM, et al. Effects of physiologic levels of glucagon and growth hormone on human carbohydrate and lipid metabolism. Studies involving administration of exogenous hormone during suppression of endogenous hormone secretion with somatostatin. *J Clin Invest* 1976; 57:875-884.
86. Carrel AL, Allen DB. Effects of growth hormone on body composition and bone metabolism. *Endocrine* 2000; 12:163-172.
87. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, et al. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor I in mouse postnatal growth. *Dev Biol* 2001; 229:141-162.

88. Hwa V, Little B, Adiyaman P, et al. Severe growth hormone insensitivity resulting from total absence of signal transducer and activator of transcription 5b. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4260-4266.
89. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978; 253:2769-2776.
90. Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 1978; 89:283-286.
91. Yoon JB, Berry SA, Seelig S, et al. An inducible nuclear factor binds to a growth hormone-regulated gene. *J Biol Chem* 1990; 265:19947-19954.
92. Udy GB, Towers RP, Snell RG, et al. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:7239-7244.
93. Holthuizen PE, Rodenburg RJT, Scheper W, et al. Regulation of IGF-II gene expression and posttranscriptional processing of IGF-II mRNAs. In: Baxter RC, Gluckman PD, Rosenfeld RG, ed. *The Insulin-Like Growth Factors and Their Regulatory Proteins*, Amsterdam: Elsevier Science; 1994:43-53.
94. Rosenfeld RG, Albertsson-Wikland K, Cassorla F, et al. The diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1532-1540.
95. Frasier SD. A review of growth hormone stimulation tests in children. *Pediatrics* 1974; 53:929-937.
96. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, Mei Z, Curtin LR, Roche AF, Johnson CL. CDC Growth charts: United States. *Adv Data* 2000; 314: 1-27
97. J. M. Tanner. *Growth of Adolescents*. Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1962

98. Leschek EW, Rose SR, Yanovski JA, et al. Effect of growth hormone treatment on adult height in peripubertal children with idiopathic short stature: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* Jul 2004;89(7):3140-8
99. Hughes IP, Choong CS, Cotterill A, Harris M, Davies PS. Gender bias in children receiving growth hormone treatment. *J Clin Endocrinology Metab* 2010; 95(3):1191-8.
100. Fink AM, Vidmar S, Kumbla S, Pedreira CC, Kanumakala S, Williams C, Carlin JB, Cameron FJ. Age-related pituitary volumes in prepubertal children with normal endocrine function: volumetric magnetic resonance data. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(6):3274-8.
101. Huot C, Dube J, Ducharme JR, Collu R. Reduced pituitary volume in children with short stature: clinical and radiological correlates. *Horm Res.* 1998; 32:113-8
102. Gandrud LM, Wilson DM. Is growth hormone stimulation testing in children still appropriate? *Growth Horm IGF Res.* 2004 Jun; 14(3): 185-94
103. Janssen JA, Visser WE, Van der Lely AJ. Still no indications that the treatment of growth hormone deficient adults with growth hormones is unsafe. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2004; 148(30):1486-9
104. http://en.wikipedia.org/wiki/Growth_hormone_treatment