

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Luciana Nunes Mosca Fiorelli

**O impacto do excesso de gordura corporal sobre a
remodelação óssea de adolescentes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientadora: Profa. Adjunta Tamara Beres Lederer Goldberg

**Botucatu
2016**

Luciana Nunes Mosca Fiorelli

O impacto do excesso de gordura corporal sobre a
remodelação óssea de adolescentes

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientadora Profa. Adjunta Tamara Beres Lederer Goldberg

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mosca, Luciana Nunes.

O impacto do excesso de gordura corporal sobre a remodelação óssea de adolescentes / Luciana Nunes Mosca. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Tamara Beres Lederer Goldberg
Capes: 40103005

1. Adolescentes. 2. Obesidade na adolescência.
3. Remodelação óssea. 4. Densidade óssea. 5. Reabsorção óssea. 6. Osteoporose. 7. Osteocalcina. 8. Índice de massa corporal.

Palavras-chave: Adolescentes; Conteúdo mineral ósseo; Densidade mineral óssea; Obesidade; Osteoporose; Osteocalcina; Remodelação óssea.

Sumário

1 Introdução	15
2 Objetivos	22
3 Casuística e Métodos	23
3.1 Sujeitos	23
3.2 Critérios de inclusão	24
3.3 Critérios de não inclusão	25
3.4 Critérios de exclusão	26
3.5 Avaliação antropométrica	26
3.6 Radiografia de mão e punho	27
3.7 Avaliação do Conteúdo Mineral Ósseo e Densidade Mineral Óssea	27
3.8 Marcadores Bioquímicos de Remodelação Óssea	28
3.9 Análise Estatística	30
5 Artigo Científico – versão português	32
6 Artigo Científico encaminhado para publicação	67
7 Referências Consultadas	95
8 Anexos	106
Anexo 1 - 8.1 Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP)	106
Anexo 2 - 8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	108
Anexo 3 - 8.3 Curvas para Classificação do Estado Nutricional – IMC/Idade	111
Anexo 4 - 8.4 Comprovante de envio para publicação	113
Anexo 5 - 8.5 Artigo Científico (publicação do mestrado)	115

Lista de Abreviaturas

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
CTx	Telopeptídeo Carboxiterminal do Colágeno Tipo I
DMO	Densidade Mineral Óssea
DXA	Densitometria Óssea por Atenuação de Raio X de Dupla-energia
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
g	Gramas
GC	Gordura Corporal
GH	Hormônio de Crescimento
IC	Idade Cronológica
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1
IMC	Índice de Massa Corporal
IO	Idade Óssea
Kg	Quilogramas
MSCs	Células Estaminais Mesenquimais
MetS	Síndrome Metabólica
MG	Massa de Gordura
mg	Miligramas
MM	Massa Magra
OC	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
P1NP	Propeptídeo Amino Terminal do Procolágeno tipo 1
PBMCV	Pico de Velocidade de Incremento de Conteúdo Mineral Ósseo
PHV	Pico de Velocidade Máxima de Crescimento Estatural
PTH	Paratormônio
S-CTx	Telopeptídeo Carboxiterminal Avaliado em Dosagem Sanguínea
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Lista de Tabelas

Tabela 1. Idade Cronológica e Óssea dos adolescentes de ambos os sexos avaliados segundo classificação nutricional (IMC).

Tabela 2. Caracterização das adolescentes do sexo feminino e masculino segundo o estado nutricional (médias e desvio padrão), idade cronológica (IC) e idade óssea (IO).

Tabela 3. Biomarcadores ósseos (FAO, OC, S-CTx) de adolescentes de ambos os sexos com excesso de peso (n=233) segundo a IO.

Tabela 4. Média, desvio padrão e mediana dos biomarcadores ósseos (FAO, OC, S-CTx) de adolescentes do sexo feminino e masculino com excesso de peso segundo avaliação nutricional (IMC) e faixas etárias.

Tabela 5. Biomarcadores ósseos (FAO, OC e S-CTx) dos adolescentes do sexo feminino e masculino eutróficos e com excesso de peso segundo faixas etárias.

Tabela 6. Correlação de Pearson entre os Biomarcadores ósseos (FAO, OC e S-CTx) e IMC, MM, MG, % GC, CMO e DMO nos quatro sítios avaliados para a amostra final de adolescentes com excesso de peso de ambos os sexos.

Dedicatória

Dedico esta tese as pessoas mais importantes da minha vida:

- Ao meu marido **Sérgio Fiorelli**, meu companheiro e ponto de equilíbrio, pela ajuda, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões e mesmo diante dos momentos de ansiedade, estresse e cansaço, soube ter paciência, amor e carinho.

- Aos meus pais, **Márcia e José Carlos**, por me mostrarem o caminho dos estudos, por acreditarem no meu potencial e me apoiarem incondicionalmente, assim como pela compreensão nos momentos de ausência, desde que ingressei na vida acadêmica. Essa vitória é nossa!

- À minha querida e amada irmã **Juliana Nunes Mosca**, por ser minha melhor amiga e vibrar comigo a cada conquista, pelo apoio e incentivo de sempre. Obrigada pela presença em todos os momentos de minha vida.

- À minha avó **Aurélia Piveta Nunes**, minha segunda mãe, por rezar pela minha proteção, pelo amor e carinho demonstrado durante toda minha trajetória pessoal e profissional.

Agradecimentos

A **Deus**, pela minha vida e pela paz nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir.

Ao meu grande exemplo e inspiração como pessoa e profissional, a **Profª Dra. Tamara Beres Lederer Goldberg** por ter acreditado em mim. Foi uma imensa honra e orgulho tê-la como orientadora por mais de sete anos (desde o mestrado). Poucos são tão privilegiados como eu, por ter tido a oportunidade de aprender e conviver com uma pessoa tão generosa, correta, eficiente e dedicada. Nunca esquecerei seus eternos ensinamentos, seus preciosos conselhos, seu jeito materno e acolhedor, de sua paciência, compreensão e por toda contribuição significativa para minha carreira profissional e pessoal. Muito obrigada de coração! Não serei mais sua orientada, mas nossa amizade será para sempre!

Às minhas amigas **Valéria e Anapaula**, que me ajudaram muito com a coleta de dados, publicação de artigos e pelo nosso trabalho em equipe, agradeço imensamente pela atenção e disponibilidade durante todos esses anos. Obrigada por tudo e pela amizade. São pessoas muito especiais e serão lembradas para sempre.

A **todos os adolescentes** que concordaram em participar deste estudo. Meu sincero respeito e gratidão.

Às minhas amigas, **Ana Carolina Demarchi e Amanda Petek**, que gentilmente me receberam e me apoiaram nos momentos em que mais precisei.

A **Carla Cristiane da Silva** que contribuiu com sugestões valiosas para este trabalho.

Às pesquisadoras e colaboradoras do Laboratório de Pediatria Experimental **Cilmery, Cristina e Regina**, pela ajuda durante a coleta e análise de dados, sugestões e disponibilidade.

Ao **Profº José Eduardo**, do Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP). Obrigada pelo pronto atendimento em nos receber, pela paciência, atenção e ensinamentos. Sem sua valiosa ajuda nosso trabalho não seria possível.

Aos **funcionários do Raio x**, especialmente aqueles que nos ajudaram na realização dos exames de densitometria óssea, agradecemos pela eficiência e atenção.

Ao **Profº Altamir**, por nos auxiliar na realização dos exames de idade óssea, obrigada pela parceria, dedicação e competência.

À minha tutora **Milena Costa Menezes Cornacini**, pela oportunidade, incentivo e apoio de sempre, pela compreensão e paciência. Obrigada por me mostrar esse caminho e por acreditar no meu trabalho. Minha eterna gratidão.

As minhas amigas e colegas de trabalho, **Joselaine, Keny, Ana Cláudia e Gabriela**, pela ajuda, compreensão, companheirismo e apoio nas horas difíceis.

A **todos os meus alunos** que foram compreensivos durante todo esse período, pelo respeito, apoio e confiança.

Aos **Funcionários do Departamento de Pediatria, Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia e da Seção de Pós-Graduação**, pela gentileza, eficiência e dedicação com que me ajudaram.

As professoras **Eliana Petri Nahás, Cilmery Kurokawa, Miriam Hashimoto e Carla Cristiane da Silva** por aceitarem o convite para fazer parte banca de qualificação e pela contribuição com importantes e enriquecedoras sugestões.

À **Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP**, que tornou possível a realização deste trabalho, muito obrigada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- **FAPESP** (Processo 2011/05991-0) pelo auxílio pesquisa concedido.

Resumo

O excesso de peso e a osteoporose são grandes problemas de saúde pública, resultando em agravos à saúde da população. **Objetivo:** Investigar o impacto do excesso de gordura corporal sobre a remodelação óssea de adolescentes sobrepesos, obesos e superobesos, através da realização de densitometria óssea e dosagem de biomarcadores de formação e reabsorção óssea. **Casuística e Métodos:** Obteve-se peso, estatura e determinou-se o Índice de Massa Corpórea (IMC) de 391 adolescentes de 10 a 20 anos. Foram classificados em: eutróficos, sobrepesos, obesos e superobesos. Obtida a idade óssea, avaliação do conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) através do DXA em coluna lombar, fêmur proximal e corpo total e subtotal, além da coleta de sangue para avaliação dos biomarcadores ósseos: osteocalcina (OC), fosfatase alcalina óssea (FAO) e telopeptídeo carboxiterminal (S-CTx). Realizou-se Análise de Variância, seguida do Teste de *Tukey* para comparação entre grupos. Utilizou-se modelo linear generalizado com distribuição gama para comparação entre grupos estratificados por sexo e, Correlação de Pearson para verificar as associações entre os três biomarcadores ósseos e massa magra (MM), massa de gordura (MG) e percentual de gordura corporal (% GC), IMC, CMO e DMO, com $p < 0,05$. **Resultados:** No sexo feminino com excesso de peso os biomarcadores apresentaram maiores concentrações na faixa etária de 10 a 13 anos, e não houve diferenças estatísticas entre os grupos segundo estado nutricional. Nos meninos com excesso de peso, as médias dos marcadores apresentaram-se mais elevadas entre 13 a 15 anos. Segundo o estado nutricional, houve diferenças significativas apenas entre as médias do S-CTx nas faixas etárias entre 10-12 e 13- 15 anos, sendo mais elevadas nos adolescentes sobrepesos e obesos no grupo de 10- 12 anos e entre obesos e superobesos, no grupo de 13-15 anos. Evidenciou-se no sexo feminino correlações significativas e negativas entre MM, MG e % GC frente a cada um dos três marcadores ósseos avaliados. No sexo masculino não foram observadas correlações entre a MM e MG e os três biomarcadores, à exceção do %GC que apresentou correlação significativa com a OC. **Conclusão:** Quanto maior o percentual e a massa de gordura, no sexo feminino, menores foram os valores dos biomarcadores de remodelação óssea, o que indica que o excesso de gordura

corporal provoca um efeito negativo em relação ao comportamento desses marcadores durante a adolescência.

Palavras-chave: Adolescentes; Conteúdo Mineral Ósseo; Densidade Mineral óssea; Obesidade; Remodelação óssea; Osteoporose; Osteocalcina.

Abstract

Excess weight and osteoporosis are serious public health problems. **Objective:** To investigate the impact of excess body fat on bone remodeling in overweight, obese and extremely obese adolescents by bone densitometry and by measuring biomarkers of bone formation and resorption. **Materials and Methods:** Body weight, height and body mass index (BMI) were determined in 391 adolescents aged 10 to 20 years. The participants were classified as eutrophic, overweight, obese, and extremely obese. Bone age was obtained and bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) by DXA were evaluated in the lumbar spine, proximal femur, and total and subtotal body. Blood samples were collected for evaluation of the following bone biomarkers: osteocalcin, bone alkaline phosphatase (BAP), and serum carboxy-terminal telopeptide (S-CTx). Analysis of variance followed by the Tukey test was used for comparison between groups. A generalized linear model with gamma distribution was applied to compare the groups stratified by sex and Pearson's correlation test to evaluate associations between the three bone biomarkers and lean mass (LM), fat mass (FM), body fat percentage (BF%), BMI, BMC and BMD ($p < 0.05$). **Results:** In girls with excess weight, the concentrations of the biomarkers were higher in the 10 to 13-year age group and no significant differences were observed between groups according to nutritional status. In boys with excess weight, the mean levels of the markers were higher in those aged 13 to 15 years. According to nutritional status, significant differences were only observed in mean S-CTx for the age groups between 10-12 and 13-15 years, with higher levels in overweight and obese adolescents aged 10-12 years and between obese and extremely obese adolescents aged 13-15 years. In girls, significant negative

correlations were observed between LM, FM and BF% and each of the three bone markers studied. There was no correlation between LM or FM and the three biomarkers in boys, except for BF%, which was significantly correlated with osteocalcin. **Conclusion:** The higher the fat percentage and FM in girls, the lower the levels of the biomarkers of bone remodeling, indicating that excess body fat has a negative effect on the evolution of these markers during adolescence.

Keywords: Adolescents; Bone Mineral Content; Bone Mineral Density; Obesity; Bone Remodeling; Osteocalcin.

1 Introdução

Sabe-se que a osteoporose e a obesidade são patologias frequentes e constituem-se em problemas de saúde pública devido ao seu impacto negativo sobre a saúde, desta forma, tornaram-se temas relevantes e de grande interesse para os pesquisadores. Nesse contexto, as duas primeiras décadas de vida têm sido apontadas como períodos críticos para o aparecimento, no futuro, de osteoporose, pois a infância e o período da puberdade são fases de desenvolvimento durante as quais a massa óssea é exponencialmente incrementada. Assim, resta elucidar o impacto do excesso de gordura corporal, já presente nesses anos frente à aquisição da massa óssea (Zhao *et al.*, 2007; National Osteoporosis Foundation, 2013).

A adolescência é uma fase mediada por intensas transformações físicas, psíquicas, comportamentais e sociais. Esse momento merece destaque, principalmente no que diz respeito à aquisição do conteúdo mineral ósseo, quando a massa óssea adquirida no período entre 10 a 20 anos de idade é considerada um dos fatores mais importantes na prevenção da osteopenia/osteoporose e fraturas por fragilidade, que ocorrem durante a fase adultícia e a senilidade (Goldberg, 2006; Silva *et al.*, 2011; Moretto *et al.*, 2011; Goldberg *et al.*, 2012).

É durante esse período de intensas mudanças físicas, que englobam o estirão de crescimento, que ocorre um incremento de aproximadamente 8,5% de massa óssea ao ano entre adolescentes. Para que isso se evidencie, inicia-se na infância e continua durante a adolescência, uma sequência de eventos que caracterizam a formação e reabsorção óssea, duas fases importantes e acopladas que dependem da ação coordenada de três tipos de células, os osteoblastos, derivados de células mesenquimais, responsáveis pela formação de um novo osso sobre superfícies reabsorvidas; os osteoclastos com capacidade de solubilizar a matriz de colágeno,

liberando cálcio e fosfato do osso, elementos resultantes da solubilização, que serão utilizados ao montante no processo de formação óssea e os osteócitos, com função de sustentação da matriz óssea mineralizada (Saraiva, Lazaretti-Castro, 2002; Seibel, 2007; Giacaglia, Martin, Silva, 2011).

O osso é um tecido altamente complexo e ativo, apresenta funções orgânicas importantes como: proporciona suporte rígido às extremidades corporais; serve como protetor de órgãos vitais; propicia a locomoção por servir de base de inserção de diversos grupos musculares e representa um grande reservatório de elementos minerais, contendo 99% das reservas corporais de cálcio, 85% do fósforo e 66% do magnésio. Além disso, mais recentemente o tecido ósseo também tem sido reconhecido como um órgão endócrino e possui uma ligação complexa com o tecido adiposo. Essa relação é colocada em destaque, pois os adipócitos e os osteoblastos se originam a partir da mesma linhagem de células: as *células estaminais mesenquimais* (MSCs). Em certa medida, reduzir o número de adipócitos poderia aumentar o de osteoblastos devido à relação competitiva destas duas células durante o processo de diferenciação celular (Giacaglia, Martin, Silva, 2011; Liu *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que o tecido adiposo desempenha um impacto importante sobre o metabolismo ósseo, não só pelo efeito de sustentação quando atua em conjunto com a massa magra, mais precisamente com o tecido muscular, mas também pela presença das chamadas adipocinas (Liu *et al.*, 2013). Estas por sua vez, têm sido alvo de interesse dos pesquisadores, que relatam que algumas adipocinas (adiponectina, leptina) possuem um efeito positivo em relação à formação óssea por promoverem a maturação dos osteoblastos, além de consideradas preditoras de fraturas ortopédicas (Hyun *et al.*, 2009; Huang *et al.*,

2010; Luo *et al.*, 2012), enquanto outras podem também inibir ou estimular a ativação dos osteoblastos e osteoclastos (resistina, visfatina) através de diversos mecanismos (Zhang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Rhie *et al.*, 2010; Iida *et al.*, 2011; Mosca *et al.*, 2013).

Do ponto de vista morfológico, são identificados dois tipos principais de tecido ósseo, o cortical, composto de lâminas de colágeno mineralizadas e densamente compactas, que conferem grande solidez e sustentação ao esqueleto e o trabecular, com aspecto esponjoso, que lhe confere maior elasticidade e é metabolicamente mais ativo (Giacaglia, Martin, Silva, 2011).

Durante o processo de formação óssea, são liberadas no soro substâncias reconhecidas como marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, que resultam da ação fisiologicamente acoplada dos osteoclastos e osteoblastos. Esses biomarcadores são divididos em três categorias: enzimas, secretadas por células envolvidas na remodelação óssea; produtos da quebra do colágeno, e produtos advindos da síntese de um osso novo. Em situações fisiológicas normais, a reabsorção e a formação são fenômenos dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea (Seibel, 2007).

Entre os marcadores de formação óssea, dependentes da ação dos osteoblastos, destacam-se a enzima fosfatase alcalina óssea (FAO) e produtos derivados da síntese da matriz óssea como: osteocalcina (OC), fragmentos amino e carboxi-terminais do pró-colágeno. Em contrapartida, os marcadores de reabsorção óssea, resultantes da ação dos osteoclastos são: cálcio urinário, hidroxiprolina urinária, fosfatase ácida tartarato-resistente e moléculas interligadoras do colágeno tipo I, como o telopeptídeo carboxiterminal (S-CTX) (Endres, Rude, 2001; Seibel, 2007).

Para tanto, uma vez que a duração do processo de reabsorção é mais curto que o de formação, os marcadores de reabsorção algumas vezes respondem mais rapidamente a determinadas mudanças como, por exemplo, àquelas decorrentes da idade, ou seja, quando o esqueleto está em seu pico de desenvolvimento, e acontece primariamente o crescimento longitudinal, a modelação e a remodelação óssea, processos simultâneos pelos quais o osso atinge sua forma e seu tamanho, os marcadores de formação e reabsorção encontram-se em níveis elevados por acompanharem esse período (Prentice *et al.*, 2006). No entanto, apesar do processo de remodelação óssea continuar por toda a vida adulta, onde em geral os indivíduos se apresentam estáveis do ponto de vista da mineralização óssea, os valores dos marcadores ósseos, sejam de formação e reabsorção, em ambos os sexos reduzem ao final da adolescência a níveis bem próximos aos verificados na fase de adultos (20 a 30 anos de idade) (Yilmaz *et al.*, 2005; Silva *et al.* 2011; Silva *et al.*, 2012; Goldberg *et al.*, 2012; Fortes, 2012).

Cabe ressaltar ainda, que alguns fatores são determinantes para a remodelação óssea como genética, idade, sexo, estágio pubertário, estilo de vida, nutrição, atividade física e presença de doenças ósseas e/ou crônicas, que podem alterar seus valores, mesmo durante a trajetória evolutiva da adolescência (Fares *et al.*, 2003; Seibel, 2007).

Assim, vários pesquisadores sugerem que entre os marcadores de formação óssea empregue-se a osteocalcina (OC) e a fosfatase alcalina óssea (FAO), que se mostram sensíveis para avaliar níveis de formação óssea. Entretanto, em relação aos marcadores de reabsorção óssea, alguns autores sugerem o S-CTx como um bom marcador, principalmente quando obtido em dosagem sanguínea. Além do papel diagnóstico e da possibilidade de se inferir sobre riscos de desenvolver

doenças osteometabólicas, os marcadores bioquímicos constituem importante ferramenta no acompanhamento evolutivo dessas doenças e das respostas aos medicamentos utilizados em sua contenção. Quando aliados à avaliação da densidade mineral óssea, têm sido apontados como excelente recurso quanto à aquisição do pico de massa óssea e intercorrências sofridas durante todas as fases da vida, que se associam à perda da massa óssea, desde a infância até o climatério e o envelhecimento (Rauchenzauner *et al.*, 2007; Fortes, 2012).

De acordo com Fortes (2012), ocorrem mudanças na remodelação óssea no decorrer da segunda década de vida, os valores dos marcadores ósseos se apresentam elevados nos primeiros anos da adolescência, quando o sexo feminino foi avaliado (10 a 12 anos) e quando essas meninas encontram-se em estágios de desenvolvimento puberal de mamas M3 e diminuem significativamente com o avançar da idade, quando ao final da puberdade os níveis dos marcadores avaliados foram próximos aos divulgados entre adultos jovens. Tais resultados são advindos de seu estudo realizado com adolescentes eutróficas. Os mesmos achados foram evidenciados em trabalho similar, porém com adolescentes do sexo masculino, em que os valores mais elevados dos marcadores ósseos avaliados foram constatados entre 13 e 15 anos de idade e coincidiam com o estágio de desenvolvimento pubertário G4 (Silva *et al.* 2011, Silva *et al.*, 2012, Goldberg *et al.*, 2012).

Sabe-se que, a formação do esqueleto, a aquisição e manutenção da massa óssea, massa magra e massa de gordura sofrem influências de vários fatores, dentre eles destacam-se o exercício físico, estado nutricional, ações hormonais e fatores nutricionais como ingestão de cálcio, fósforo, vitamina D e proteína (Bonofiglio *et al.*, 2001; Carter *et al.*, 2001).

Para tanto, a relação da massa óssea frente ao estado nutricional em adolescentes têm sido assunto de interesse de alguns pesquisadores. Ao consultar a literatura científica, verifica-se que alguns estudos têm sugerido uma relação entre os baixos níveis de OC no soro e o metabolismo energético relacionado à obesidade em seres humanos. Segundo alguns autores (Pittas *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2011), os principais componentes envolvidos na Síndrome Metabólica (MetS) como acúmulo de gordura visceral, alterações do perfil lipídico e da pressão arterial, correlacionam-se significativamente com baixos níveis séricos de OC em várias populações. Sobretudo, destaca-se que, em crianças obesas os níveis de OC circulante foram menores quando comparados aos de crianças eutróficas e se correlacionaram positivamente com a presença de resistência à insulina e negativamente com a concentração de leptina no soro (Reinehr, Roth, 2010).

Em adolescentes com excesso de peso, os efeitos da obesidade sobre a massa óssea e sua relação com marcadores bioquímicos de remodelação óssea não são totalmente elucidados. Em um estudo realizado por Dimitri, Wales e Bishop (2011) com 103 crianças entre 5 e 16 anos, divididas em dois grupos, um com 52 crianças superobesas/obesas e outro com 51 crianças eutróficas chamado de grupo controle, os autores encontraram que, a incidência de fraturas era mais comum entre o grupo com excesso de peso quando comparada à evidenciada em seus controles eutróficos, indicando que talvez esses pacientes com excesso de massa gordurosa tivessem uma menor massa óssea e portanto ossos mais tênues.

Para tanto, Kim e colaboradores (2013) investigaram a associação de OC total no soro com a obesidade e Síndrome Metabólica (MetS) em crianças coreanas e identificaram que o nível de OC foi significativamente menor em crianças com sobrepeso e obesidade em comparação às médias obtidas entre crianças eutróficas

e, ao analisarem a relação da OC com a adiposidade encontraram uma correlação negativa. Mesmo que o sexo e a idade fossem controlados, essa correlação significativa e negativa entre OC e o percentual de gordura corporal se mantinha. Além disso, verificaram diferenças significativas entre os grupos em relação à OC e a MetS, onde os participantes que não tinham os componentes da MetS tinham níveis significativamente mais elevados de OC do que aqueles que apresentavam um ou, pelo menos, dois fatores de risco para MetS acrescidos do aumento da circunferência da cintura.

Diante do exposto, ressalta-se que esse conhecimento adquire relevância, visto que estudos que contemplem a associação da densidade mineral óssea (DMO) com os biomarcadores de remodelação óssea são cada vez mais necessários para utilização na prática clínica, fornecendo uma avaliação e uma complementação mais precisa à compreensão do acúmulo e reabsorção da massa óssea nos indivíduos avaliados, de acordo com todas as especificidades pontuadas no decorrer da introdução deste estudo.

Em trabalho recentemente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se que adolescentes considerados superobesos apresentavam redução de sua massa óssea, avaliada pela realização de densitometria óssea, por atenuação de raio X de dupla energia (DXA), quando comparada à massa óssea obtida entre sobrepesos (Mosca, Silva, Goldberg, 2013).

Diante dessas observações, nos pareceu relevante avaliar o comportamento de alguns biomarcadores ósseos de formação (FAO e OC) e de reabsorção (S-CTx) em adolescentes de ambos os sexos que se apresentassem com excesso de peso, resultante a um acúmulo de massa gordurosa, que denominamos de sobrepesos, obesos e superobesos.

2 Objetivos

Investigar o impacto do excesso de gordura corporal sobre a remodelação óssea de adolescentes sobrepesos, obesos e superobesos segundo sexo, através da realização da densitometria óssea e da dosagem de biomarcadores ósseos de formação e reabsorção óssea.

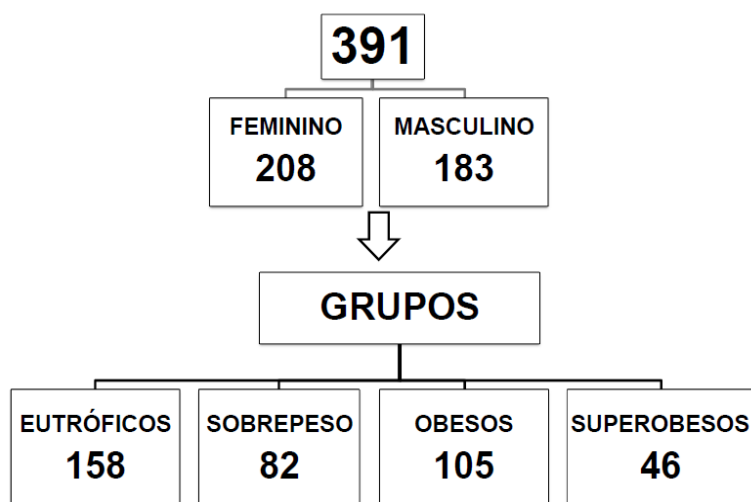
3 Casuística e Métodos

Foi realizado um estudo analítico, de natureza exploratória, descritivo e transversal, no período de março de 2010 a março de 2012.

3.1. Sujeitos

Adolescentes atendidos no Ambulatório de Medicina do Adolescente da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (SP), na faixa etária de 10 anos completos a 20 anos incompletos, eutróficos, sobrepesos, obesos e superobesos, foram convidados a participar deste estudo. O projeto foi aprovado previamente pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP) protocolo OF 190/2009-CEP (Anexo 1), e os adolescentes e seus responsáveis estavam cientes do seu conteúdo, através de esclarecimentos que foram feitos junto aos mesmos. Para que participassem da pesquisa, receberam e devolveram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), e o assentimento, assinados pelo binômio responsável/adolescente respectivamente.

O número de sujeitos incluídos na amostra, de acordo com o cálculo amostral foi de 391 adolescentes, onde foram classificados em grupos de acordo com o estado nutricional: eutróficos, sobrepesos, obesos e superobesos, como também por faixa etária e sexo, conforme fluxograma apresentado abaixo:



Esta amostra foi também baseada na disponibilidade de atendimento de casos novos no Ambulatório de Medicina do Adolescente da FMB-UNESP, bem como, a matrícula de adolescentes que se enquadrassem aos objetivos propostos. O número de indivíduos avaliados também seguiu o cálculo amostral realizado em trabalhos anteriores, desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais se avaliaram parâmetros semelhantes para adolescentes eutróficos, na mesma faixa etária, de ambos os sexos, Projetos esses apoiados pela Fapesp (Silva, Goldberg, Teixeira *et al.*, 2004; Silva, Goldberg, Teixeira *et al.*, 2007, Moretto *et al.*, 2011; Fortes, 2012). O cálculo foi realizado admitindo-se um nível de significância de 5% para o intervalo de confiança de 95%, determinados para uma distribuição normal, com $z = 1,96$ (Fonseca, Martins, 1996).

3.2. Critérios de Inclusão

Foram incluídos nesta pesquisa adolescentes que estivessem com seu IMC classificado entre o 5º percentil e <85º segundo idade e sexo, denominados eutróficos, aqueles que se encontravam com seu IMC acima ou igual ao 85º e menor que 95º classificados como sobrepesos, aqueles acima ou igual ao

95ºpercentil (CDC, 2000) como obesos e aqueles acima do 99º percentil da curva de IMC para sexo e idade, como superobesos (CDC, 2000; Freedman *et al.*, 2007, Barlow, 2007) (Anexo 3). Os adolescentes não podiam ser tabagistas e/ou etilistas, não podiam estar vinculados à prática de atividade física intensa, à exceção apenas das aulas de Educação Física do colégio em que estudavam.

3.3. Critérios de Não Inclusão

Como critérios de não inclusão determinou-se que não participariam desta pesquisa: os adolescentes com história de prematuridade; os com mais de 100kg de peso corporal; os submetidos à terapia prolongada com corticóides; os que tivessem utilizado suplementação com cálcio e/ou ferro nos últimos 12 meses que antecederam esta pesquisa; os adolescentes que apresentassem as seguintes patologias: diabetes *mellitus*, doenças ósseas congênitas ou adquiridas, doenças gastrointestinais acompanhadas de má-absorção, história de nefropatia - com ou sem insuficiência renal crônica, endocrinopatias, puberdade precoce ou atrasada; os que consumissem drogas de modo crônico; aqueles que utilizassem drogas que afetassem o metabolismo ósseo negativamente, tais como anticonvulsivantes ou antiácidos com alumínio; foram excluídas as adolescentes que usavam contraceptivos hormonais e as anteriormente ou atualmente grávidas devido à possível influência no ganho de massa óssea. Também foram excluídos aqueles com doenças metabólicas e genéticas constatadas pela história da moléstia atual, pelo exame físico geral e especial, em procedimentos laboratoriais ou de radiodiagnóstico, além de qualquer alteração do ciclo menstrual que pudesse reportar à presença de Síndrome do Ovário Policístico (SOP) entre as meninas avaliadas.

Quanto à avaliação dietética, não foram incluídos os adolescentes que fizessem uso exclusivo de dieta vegetariana; aqueles com alto consumo de fibras, acima dos valores recomendados para sua idade (>26 g/dia para adolescentes do sexo feminino ou >31 g/dia para adolescentes do sexo masculino (de 9–13 anos) ou >38 g/dia (para meninos e meninas de 14–16 anos) (IOM, 2005); cafeína >300 até 450 mg/dia (Rapuri, 2001), ou seja, aproximadamente duas ou três xícaras de café ao dia; refrigerantes em quantidade maior que 500ml/dia (Fitzpatrick, 2003; Mcgartland, 2003), além daqueles que não consumissem produtos lácteos diariamente.

3.4. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os adolescentes que não compareceram a alguma das etapas previstas, exemplo: realização de Idade Óssea, exame de sangue, não comparecimento no dia agendado para realização da Densitometria Óssea. Todos foram convocados pelo menos três vezes para realização dos procedimentos agendados, em momento próximo à primeira consulta, para que então fossem considerados excluídos do estudo.

3.5. Avaliação Antropométrica

Para a avaliação antropométrica foram aferidos o peso e a estatura dos adolescentes, conforme as técnicas preconizadas por Frisancho (1990). Peso: os adolescentes foram posicionados de maneira ereta sobre a balança do tipo plataforma (marca Filizola), com capacidade para 150 kg e graduação de

100gramas, utilizando roupas íntimas (100g) e sem calçados. Estatura: os adolescentes foram colocados descalços, em posição ereta, com os pés unidos e calcanhares encostados na parede, com olhar fixo no horizonte, sem estender a cabeça. O ápice da orelha e o canto externo do olho ficaram em linha paralela, formando um ângulo reto com a barra do estadiômetro, o qual estava fixado à parede. A barra foi apoiada sobre a cabeça, sendo então efetuada a leitura da altura em centímetros. Foram obtidas duas medidas da estatura e calculada a média. Estes dados foram utilizados para obtenção do IMC, definido como massa corporal em quilos dividido pela estatura em metro elevada ao quadrado (kg/m^2), e posterior classificação de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a partir das curvas do NCHS/CDC (CDC, 2002).

3.6. Radiografia de Mão e Punho

Na sequência foi obtida a idade óssea (IO) para a avaliação do grau de maturação esquelética. O método utilizado foi o de Greulich & Pyle (1959) chamado de método GP, em que se faz a radiografia de mão e punho a ser posteriormente comparada ao Atlas. Este exame foi realizado sob supervisão e orientação de profissional especializado.

3.7. Avaliação do Conteúdo Mineral Ósseo e da Densidade Mineral Óssea

Os adolescentes que cumpriram todas as etapas anteriores foram submetidos à avaliação da massa óssea mediante um exame de densitometria óssea, através de uma unidade de Densitometria Óssea por atenuação de raio x de

dupla energia (DXA), utilizando um aparelho Hologic QDR 4500, localizado no HC da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. Para a adequada avaliação da massa óssea, um *software* pediátrico foi utilizado e os resultados do conteúdo mineral ósseo (CMO) foram expressos em g e da densidade mineral óssea (DMO) em g/cm². Foi realizada a mensuração das regiões da coluna lombar, entre L1-L4 e do fêmur proximal total, incluindo as regiões: colo do fêmur, região trocantérica, intertrocantérica e área de Ward e a densitometria de corpo subtotal (sem o segmento da cabeça) e total. Além disso, foi possível identificar através do exame de DXA a quantidade de massa magra em gramas (MM), massa gorda em gramas (MG) e o percentual de gordura corporal (%GC). Ressalta-se que a quantidade de radiação a que os adolescentes foram expostos são consideradas seguras e sem prejuízo para sua saúde atual e futura (Lima *et al.*, 2001; Vicente, 2006).

3.8. Marcadores Bioquímicos de Remodelação Óssea

Os marcadores bioquímicos de remodelação óssea colhidos foram osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e o telopeptídeo carboxiterminal (S-CTx). Todos foram dosados e analisados como descrito na sequência.

Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada no ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas de Botucatu após avaliação médica e durante o período de 8:00 às 9:00 hr, após jejum noturno de pelo menos dez horas. Foram coletados 10 mL de sangue total com agulhas descartáveis e sistema de coleta a vácuo.

Osteocalcina

A osteocalcina (OC) ou proteína óssea gla (BGP) foi dosada através do *MetraTM Osteocalcin EIA kit – Biosystems* como indicador de remodelação óssea. O imunoensaio *MetraTM Osteocalcin*, competitivo, mede quantitativamente a osteocalcina intacta no soro. Para o ensaio foram utilizadas tiras revestidas de osteocalcina, um anticorpo anti osteocalcina de rato, um conjugado com fosfatase alcalina (IgG) anti-rato e um substrato p-Nitrofenil-fosfato (pNPP) para quantificar a osteocalcina no soro. A leitura foi realizada em microleitor de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm. O ensaio foi realizado no Laboratório Experimental da Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Fosfatase alcalina óssea

A fosfatase alcalina específica do osso (BAP) foi medida quantitativamente no soro através do *MetraTM BAP EIA kit – Biosystems* como um indicador da atividade osteoblástica. O ensaio *MetraTM BAP* é um imunoensaio quantitativo, num formato de tira de microtitulação que utiliza um anticorpo monoclonal anti - BAP revestido na tira para captar a BAP na amostra. A atividade enzimática da BAP captada é detectada com um substrato de p-Nitrofenil- fosfato (pNPP). A leitura foi realizada em microleitor de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm. O ensaio foi realizado no Laboratório Experimental da Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP.

Dosagem de telopéptido carboxiterminal (S-CTx)

O S-CTx foi dosado pelo kit *Elecsys β CrossLAPs/ serum.*, por eletro-imunoquimioluminescência ou ECLIA em equipamento automatizado ELECSYS –

ROCHETM. É um ensaio específico para isômeros interligados de fragmentos de colágeno do tipo I, independente de sua natureza. A especificidade do teste é garantida através do uso de dois anticorpos monoclonais, os quais reconhecem de forma linear os octapeptídeos β -8AA. Portanto a metodologia empregada quantifica a forma beta do ácido aspártico do telopeptídeos C-Terminais (β -CTX). Essas dosagens foram realizadas pelo Centro de Doenças Osteometabólicas da UNIFESP (CEDOM).

3.9 Análise Estatística

Os dados foram armazenados em planilha do Excel e analisados através do programa SAS for Windows v.9.2. Foi feita uma análise descritiva para as variáveis quantitativas, cujos valores foram apresentados em médias, desvios-padrão e mediana.

Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal, a comparação entre grupos foi feita por meio de uma Análise de Variância (ANOVA) com uma classificação simples, seguida do Teste de *Tukey*.

Para efetuar as demais análises, foi realizado o ajuste por idade cronológica (IC), onde os adolescentes foram subdivididos em três grupos: de 10 a <13 anos; de 13 a <16 anos; >16 anos. No caso do ajuste por IO, novamente foram agrupados, sendo no sexo feminino em quatro faixas - IO1: 10 a 11 anos, IO2: 12 a 13 anos, IO3: 14 a 15 anos e IO4: 16 a 19 anos. No caso dos meninos, esses foram agrupados em três faixas etárias sendo IO1: 10 a 12 anos, IO2: 13 a 15 anos e IO3: 16 a 19 anos.

A utilização da IO foi feita para verificar a interferência dessa variável nos grupos, evitando que se encontrasse uma diferença e essa não fosse apenas um efeito casual.

Os dados de FAO, OC, S-CTx apresentaram distribuição assimétrica. Para realizar a comparação entre grupos estratificados por sexo, foi utilizado o procedimento GENMOD do programa SAS for Windows v.9.2., utilizando-se um modelo linear generalizado com distribuição gama. As comparações múltiplas foram feitas seguindo o mesmo procedimento através da opção DIFF do mesmo programa (teste de Wald).

As associações entre os biomarcadores ósseos (FAO, OC e S-CTx) e MM, MG e % GC, IMC, CMO e DMO foram verificadas através da Correlação de Pearson. Essas mesmas associações foram obtidas estratificando por sexo.

Em todos os testes, foi fixado o nível de significância de 5% ou utilizado o p-valor correspondente.

5 Artigo Científico – versão em português

O impacto do excesso de gordura corporal sobre a remodelação óssea de adolescentes

Luciana Nunes Mosca¹, Tamara Beres Lederer Goldberg^{1,*}, Valéria Nóbrega da Silva¹, Cilmary Suemi Kurokawa², Anapaula C. Bisi Rizzo¹, Carla Cristiane da Silva³, Altamir dos Santos Teixeira⁴, José Eduardo Corrente⁵

¹Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Disciplina de Medicina do Adolescente, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP 18618-970, Brasil - lucianamosca@outlook.com, tamara@fmb.unesp.br, valerianutry@gmail.com anapaula.rizzo@uol.com.br

²Laboratório e Centro de Pesquisa Pediatria Experimental, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu, SP, UNESP, SP18618-970, Brasil - kurokawa@fmb.unesp.br

³Departamento de Educação Física, Universidade do Norte do Paraná, Paraná, Brasil - ccsilva@uenp.edu.br

⁴Doenças Tropicais e Diagnóstico por imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, Botucatu, SP 18618-970, Brasil- altamir@fmb.unesp.br

⁵Departamento de Estatística, Instituto de Biociências, UNESP, SP, Botucatu, SP18618-970, Brasil- jecorren@ibb.unesp.br

***Autor Correspondente:**

Tamara Beres Lederer Goldberg, MD, PhD

Departamento de Pediatria, Disciplina de Medicina do Adolescente

Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista - UNESP

Distrito de Rubião Júnior – s/nº - 18618-970 – Botucatu – SP – Brazil.

Email: tamara@fmb.unesp.br

Tel: +55 (14) 3811-6274 / 3811-6083

Resumo

O excesso de peso e a osteoporose são graves problemas de saúde pública, resultando em agravos à saúde da população. O objetivo desse estudo foi investigar o impacto do excesso de gordura corporal sobre a remodelação óssea de adolescentes sobrepesos, obesos e superobesos, através da realização de densitometria óssea e dosagem de biomarcadores de formação e reabsorção óssea. Obteve-se peso, estatura e determinou-se o Índice de Massa Corpórea (IMC) de 391 adolescentes de 10 a 20 anos. Foram classificados em: eutróficos, sobrepesos, obesos e superobesos. Obtida a idade óssea, avaliação do conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) pelo DXA em coluna lombar, fêmur proximal e corpo total e subtotal, além da coleta de sangue para avaliação dos biomarcadores ósseos: osteocalcina (OC), fosfatase alcalina óssea (FAO) e telopeptídeo carboxiterminal (S-CTx). Realizou-se Análise de Variância, seguida do Teste de *Tukey* para comparação entre grupos. Utilizou-se modelo linear generalizado com distribuição gama para comparação entre grupos estratificados por sexo e, Correlação de Pearson para verificar as associações entre os três biomarcadores ósseos e massa magra (MM), massa de gordura (MG) e percentual de gordura corporal (% GC), IMC, CMO e DMO, com $p < 0,05$. No sexo feminino os biomarcadores apresentaram maiores concentrações na faixa etária de 10 a 13 anos, e não houve diferenças estatísticas entre os grupos segundo estado nutricional. No sexo masculino, as médias dos marcadores apresentaram-se mais elevadas entre 13 a 15 anos. Segundo o estado nutricional, houve diferenças estatísticas nas idades mais avançadas para OC entre os superobesos; entre 10 a 12 anos para o S-CTx, sendo constatadas médias maiores nos adolescentes sobrepesos e obesos e, nas idades de 13 a 15 anos observou-se valores médios mais elevados entre os obesos e superobesos. Evidenciou-se no sexo feminino correlações significativas e negativas entre MM, MG e % GC frente a cada um dos três marcadores ósseos avaliados. No sexo masculino não foram observadas correlações entre a MM e MG e os três biomarcadores, à exceção do %GC que apresentou correlação significativa com a OC. Quanto maior o percentual e a massa de gordura, no sexo feminino, menores foram os valores dos biomarcadores de remodelação óssea, o que indica que o excesso de gordura corporal provoca um efeito negativo em relação ao comportamento desses marcadores durante a adolescência.

Palavras-chave: Adolescentes; Conteúdo Mineral Ósseo; Densidade Mineral óssea; Obesidade; Remodelação óssea; Osteocalcina.

1 Introdução

Sabe-se que a osteoporose e a obesidade são doenças crônicas frequentes e constituem-se em problemas de saúde pública devido ao seu impacto negativo sobre a saúde. As duas primeiras décadas de vida têm sido apontadas como períodos críticos para o aparecimento de osteoporose, pois a infância e a adolescência são fases de desenvolvimento exponencial da massa óssea. Assim, resta elucidar o impacto do excesso de gordura corporal, já presente nesses anos, frente à aquisição da massa óssea [1,2].

É durante esse período de intensas mudanças físicas, que englobam o estirão de crescimento, que ocorre um incremento de aproximadamente 8,5% de massa óssea ao ano entre adolescentes. Para que isso se evidencie, inicia-se na infância e continua durante a adolescência, uma sequência de eventos que caracterizam a formação e reabsorção óssea, duas fases importantes e acopladas que dependem da ação coordenada de três tipos de células, os osteoblastos, derivados de células mesenquimais, responsáveis pela formação de um novo osso sobre superfícies reabsorvidas; os osteoclastos com capacidade de solubilizar a matriz de colágeno, liberando cálcio e fosfato do osso, elementos resultantes da solubilização, que serão utilizados a montante no processo de formação óssea e os osteócitos, com função de sustentação da matriz óssea mineralizada [3-5].

O osso é um tecido altamente complexo e ativo, proporciona suporte rígido às extremidades corporais; serve como protetor de órgãos vitais; propicia a locomoção

por servir de base de inserção de diversos grupos musculares e representa um grande reservatório de elementos minerais. Recentemente o tecido ósseo tem sido reconhecido como um órgão endócrino e possui uma ligação complexa com o tecido adiposo pois, adipócitos e osteoblastos se originam a partir da mesma linhagem de células: *as células estaminais mesenquimais* (MSCs). Talvez, reduzir o número de adipócitos poderia aumentar o de osteoblastos devido à relação competitiva destas duas células durante o processo de diferenciação celular [5,6].

É importante ressaltar que o tecido adiposo desempenha um impacto importante sobre o metabolismo ósseo pela presença das chamadas adipocinas [6]. Algumas adipocinas possuem efeito positivo em relação à formação óssea por promoverem a maturação dos osteoblastos, outras são consideradas preditoras de fraturas ortopédicas [7-9], enquanto algumas podem inibir ou estimular a ativação dos osteoblastos e osteoclastos através de diversos mecanismos [10-14].

Durante o processo de formação óssea, são liberadas substâncias reconhecidas como marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, que resultam da ação fisiologicamente acoplada dos osteoclastos e osteoblastos. Em situações fisiológicas normais, a reabsorção e a formação são fenômenos dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea [4].

A duração do processo de reabsorção é mais curto que o de formação, os marcadores de reabsorção algumas vezes respondem mais rapidamente a determinadas mudanças como aquelas decorrentes da idade, quando o esqueleto está em seu pico de desenvolvimento, e acontece primariamente o crescimento longitudinal. Quando da modelação e remodelação óssea, processos simultâneos pelos quais o osso atinge sua forma e seu tamanho, os marcadores de formação e

reabsorção encontram-se em níveis elevados por acompanharem o desenvolvimento [15]. Os valores dos marcadores ósseos, sejam de formação e reabsorção, em ambos os sexos reduzem ao final da adolescência a níveis bem próximos aos verificados na fase de adultos (20 a 30 anos de idade) [16-20].

Quando aliados à avaliação da densidade mineral óssea, têm sido apontados como excelente recurso quanto à aquisição do pico de massa óssea e intercorrências sofridas durante todas as fases da vida, que se associam à perda da massa óssea, desde a infância até o climatério e o envelhecimento [20,21].

Em adolescentes com excesso de peso, os efeitos da obesidade sobre a massa óssea e sua relação com marcadores bioquímicos de remodelação óssea não são totalmente elucidados. Dimitri, Wales e Bishop [22] avaliando 103 crianças entre 5 e 16 anos, divididas em dois grupos (n=52 crianças superobesas/obesas e n=51 crianças eutróficas) encontraram que, a incidência de fraturas era mais comum entre o grupo com excesso de peso, indicando que talvez esses pacientes com excesso de massa gordurosa tivessem uma menor massa óssea e portanto ossos mais tênues.

Em trabalho recentemente desenvolvido, demonstrou-se que adolescentes considerados superobesos apresentavam redução de sua massa óssea, avaliada pela realização de densitometria óssea, por atenuação de raio X de dupla energia (DXA), quando comparada à massa óssea obtida entre sobrepesos [23].

No presente estudo pretende-se avaliar o comportamento de alguns biomarcadores ósseos de formação e de reabsorção em adolescentes de ambos os sexos que se apresentem com excesso de peso, resultante a um acúmulo de massa gordurosa, reconhecidos como sobrepesos, obesos e superobesos, buscando

elucidar a evolução do incremento de massa óssea diante desse grave problema nutricional.

2 Casuística e Métodos

Foram incluídos 391 adolescentes de 10-19 anos matriculados no Ambulatório de Medicina do Adolescente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (SP, Brasil), convidados a participar do estudo. O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelo adolescente e pelos pais e/ou responsáveis. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), OF.190/2009).

Para a avaliação antropométrica foram aferidos o peso (kg) e a estatura (m), conforme técnicas preconizadas por Frisancho [24] e posterior cálculo do IMC (kg/m^2) que foi utilizado para classificar o estado nutricional. Os adolescentes foram classificados como eutróficos (entre 5º percentil e <85º), sobrepesos ($\geq 85^\circ$ percentil e <95º), obesos ($\geq 95^\circ$ percentil), e superobesos ($> 99^\circ$ percentil), de acordo com as curvas de IMC para sexo e idades [25-27]. Os adolescentes não eram tabagistas e/ou etilistas, não estavam vinculados à prática de exercícios físicos regulares.

Os critérios de exclusão foram: a) adolescentes com história de prematuridade; b) com mais de 100kg (por impossibilidade de realização do exame de densitometria óssea, segundo recomendação do fabricante do aparelho); c) submetidos à terapia prolongada com corticóides; d) que tivessem utilizado suplementação com cálcio e/ou ferro nos últimos 12 meses que antecederam a coleta de dados; e) com diabetes *mellitus*, doenças ósseas congênitas ou adquiridas, doenças gastrointestinais, história de nefropatia, endocrinopatias, puberdade precoce ou atrasada; f) que utilizassem medicamentos de forma crônica; g) que usassem

contraceptivos hormonais h) as anteriormente ou atualmente grávidas. Os critérios de exclusão alimentares foram: uso exclusivo de dieta vegetariana; aqueles com alto consumo de fibras, acima dos valores recomendados para sua idade (>26 g/dia para adolescentes do sexo feminino ou >31 g/dia para adolescentes do sexo masculino (de 9–13 anos) ou >38 g/dia (para meninos e meninas de 14–16 anos) [28]; aqueles com consumo de cafeína de >300 mg/dia (>3 xícaras de café ao dia) [29-31], além daqueles que não consumissem produtos lácteos diariamente.

Para avaliar a maturação esquelética, foi obtida a idade óssea (IO) pelo método GP, em que as radiografias de mão e punho foram comparados com um atlas [32]. Os adolescentes submeteram-se ao exame de densitometria óssea por atenuação de Raio X de dupla energia (DXA), utilizando um aparelho (Hologic QDR 4500 Discovery A, Hologic Inc., Bedford, MA). Para a avaliação da massa óssea, um *software* pediátrico foi utilizado e os resultados do conteúdo ósseo foram expressos em g e a densidade em g/cm². Realizou-se mensuração das regiões da coluna lombar entre L1-L4 e do fêmur proximal total, incluindo as regiões: colo do fêmur, região trocantérica, intertrocantérica, a de corpo subtotal (sem o segmento da cabeça) e a densitometria de corpo total (para determinação do conteúdo mineral ósseo total, da densidade mineral óssea total e da composição corporal) [33,34].

Coleta de Sangue

Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa e centrifugadas por 15 minutos a 1.500 g para a separação do soro; as amostras de soro foram armazenadas a -70 °C até a análise dos biomarcadores FAO e OC e telopeptídeo carboxiterminal (S-CTx). FAO e OC foram medidos utilizando o ensaio de (Metra[™] Biosystems, San Diego, CA, EUA), com coeficientes intra e inter-ensaio de variação de 8% e 7,6%, respectivamente. S-CTx foi quantificada por um ensaio de imunoquimioluminescência, utilizando um kit comercial β -Cross Laps/serum kit

(Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA) and Elecsys 1010 (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA); o coeficiente de inter-ensaio de variação foi de 5%.

Análise Estatística

Realizada análise descritiva para as variáveis quantitativas, cujos valores foram apresentados em médias, desvios-padrão e mediana.

Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal, a comparação entre grupos foi feita por meio de uma Análise de Variância (ANOVA) com uma classificação simples, seguida do Teste de *Tukey*.

Para efetuar as demais análises, no sexo feminino, as adolescentes foram agrupadas segundo sua idade óssea (IO) em quatro faixas - IO1: 10 a 11 anos, IO2: 12 a 13 anos, IO3: 14 a 15 anos e IO4: 16 a 19 anos. No caso dos adolescentes, foram agrupados em três faixas etárias - IO1: 10 a 12 anos, IO2: 13 a 15 anos e IO3: 16 a 19 anos. Para realizar o ajuste por idade cronológica (IC), todos os adolescentes foram subdivididos em três grupos: de 10 a <13 anos; de 13 a <16 anos; >16 anos.

A utilização da IO foi feita para verificar a interferência dessa variável nos grupos, evitando que se encontrasse uma diferença e essa não fosse apenas um efeito casual.

Os dados de FAO, OC, S-CTx apresentaram distribuição assimétrica. Para realizar a comparação entre grupos estratificados por sexo, foi utilizado o procedimento GENMOD do programa SAS for Windows v.9.2., utilizando-se um modelo linear generalizado com distribuição gama. As comparações múltiplas foram feitas seguindo o mesmo procedimento através da opção DIFF do mesmo programa (teste de Wald).

As associações entre os biomarcadores ósseos (FAO, OC e S-CTx) e MM, MG e % GC, IMC, CMO e DMO foram obtidas através da Correlação de Pearson. Essas mesmas associações foram obtidas estratificando por sexo.

Em todos os testes, foi fixado o nível de significância de 5% ou utilizado o p-valor correspondente.

3 Resultados

Dentre 391 adolescentes que participaram do estudo, 158 (40,40%) foram classificados pelo IMC como eutróficos, 82 (20,97%) sobrepesos, 105 (26,85%) obesos e 46 (11,78%) superobesos, 208 (53,19%) pertenciam ao sexo feminino e 183 (46,81%) ao masculino.

Foram calculadas as médias da idade cronológica e da idade óssea dos adolescentes segundo a classificação do estado nutricional através do IMC. Nos sexos feminino e masculino, observou-se que as médias, tanto de IC, quanto de IO, em todos os grupos nutricionais, não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Salienta-se que para todos os grupamentos nutricionais, segundo os sexos, ocorreu avanço nas médias das IO em relação às médias das IC (Tabela 1).

Tabela 1. Idade cronológica (IC) e idade óssea (IO) dos adolescentes de ambos os sexos avaliados segundo classificação nutricional (IMC).

	IMC				P
	Eutrófico	Sobrepeso	Obeso	Superobeso	
Sexo Feminino	(n=72)	(n=53)	(n=62)	(n=21)	
IC	13.64 ^a ± 2.76	14.42 ^a ± 2.41	13.66 ^a ± 2.44	13.49 ^a ± 1.65	0.050
Sexo Masculino	(n=86)	(n=29)	(n=43)	(n=25)	
IC	13.48 ^a ± 2.53	14.05 ^a ± 2.01	13.76 ^a ± 1.92	13.73 ^a ± 1.92	0.753
	IMC				P
	Eutrófico	Sobrepeso	Obeso	Superobeso	
Sexo Feminino	(n=72)	(n=53)	(n=62)	(n=21)	
IO	14.39 ^a ± 2.61	14.94 ^a ± 2,41	14.53 ^a ± 2,26	14.40 ^a ± 2,17	0.794
Sexo Masculino	(n=86)	(n=29)	(n=43)	(n=25)	
IO	13.98 ^a ± 2,68	14.74 ^a ± 2,51	14.41 ^a ± 1,87	14.56 ^a ± 1,26	0.550

Nota: IMC (kg/m²) – Índice de massa corporal; IC – Idade cronológica; IO – Idade óssea.

Teste ANOVA com um fator de classificação seguido pelo teste de Tukey.

Letras diferentes indicam diferenças; letras iguais não indicam diferenças.

A caracterização antropométrica e nutricional dos adolescentes, segundo IC e IO, apresenta-se na Tabela 2. Para ambos os sexos, as diferenças significativas foram detectadas para as variáveis: peso e IMC em todos os grupos nutricionais, segundo IC e IO. Quanto à estatura, não houve diferença estatística significativa, seja ajustada pela IC ou pela IO. Estão expressos também os valores das médias de MM, MG e %GC. Para a maioria dos adolescentes, de ambos os sexos, as médias foram crescentes daqueles com eutrofia em direção aos superobesos, sendo as diferenças significantes, $p < 0,01$. Em relação ao indicador MM, não se constatou diferenças significantes entre os adolescentes obesos e superobesos, mas a quantidade de gordura em gramas e o % GC apresentaram diferenças estatísticas entre todos os grupos nutricionais, para ambos os sexos ($p < 0,01$).

Tabela 2. Caracterização das adolescentes do sexo feminino e masculino segundo o estado nutricional (médias e desvio padrão), ajustado pela idade cronológica (IC) e idade óssea (IO).

Estado Nutricional: Sexo feminino (n=208)						
Variáveis	Eutrófico (n=72)	Sobrepeso (n=53)	Obeso (n=62)	Superobeso (n=21)	P (IC)	P (IO)
Peso (kg)	47.74±9.57 ^{aA}	59.59±9.61 ^{bB}	71.28±13.19 ^{cC}	88.89±17.09 ^{dD}	0.0001	0.0001
Estatura (m)	1.56±0.10 ^{aA}	1.58±0.08 ^{aA}	1.58±0.07 ^{aA}	1.57±0.05 ^{aA}	0.4915	0.5275
IMC (kg/m ²)	19.35±2.45 ^{aA}	23.72±1.71 ^{bB}	28.45±3.79 ^{cC}	36.00±6.02 ^{dD}	0.0001	0.0001
Massa magra (g)	31820.48±5715.62 ^{bB}	37974.13± 5482.44 ^{aA}	43649.20±7428.82 ^{dAC}	49140.79± 4824.06 ^{dAC}	0.0001	0.0001
Gordura (g)	13732.60±4864.02 ^{aA}	19962.32 4824.5 ^{bB}	26351.65±6613.80 ^{cC}	35386.46 6811.09 ^{dD}	0.0001	0.0001
GC (%)	28.49±5.07 ^{aA}	32.98±4.31 ^{bB}	36.65±4.06 ^{cC}	40.86±4.11 ^{dD}	0.0001	0.0001
Estado Nutricional: Sexo masculino (n=183)						
	Eutrófico (n=86)	Sobrepeso (n=29)	Obeso (n=43)	Superobeso (n=25)	P (IC)	P (IO)
Peso (kg)	50.62±12.22 ^{aA}	62.91±13.26 ^{bB}	75.53±13.25 ^{cC}	87.04±7.95 ^{dD}	0.0001	0.0001
Estatura (m)	1.63±0.12 ^{aA}	1.64±0.12 ^{aA}	1.64±0.10 ^{aA}	1.63±0.06 ^{aA}	0.9761	0.0788
IMC (kg/m ²)	18.73±2.55 ^{aA}	23.11±1.72 ^{bB}	27.76±2.78 ^{cC}	33.48±2.73 ^{dD}	0.0001	0.0001
Massa magra (g)	38161.72±10413.12 ^{bB}	45614.87±11804.59 ^{aA}	50284.30±10102.04 ^{aA}	52679.58±657.62 ^{aA}	0.0001	0.0001
Gordura (g)	8535.58±2668.21 ^{bB}	16211.66±4590.15 ^{dD}	23778.60 4915.22 ^{cC}	31822.86±6459.29 ^{aA}	0.0001	0.0001
GC (%)	18.56±4.77 ^{aB}	26.41±6.61 ^{bC}	31.55±5.18 ^{cA}	36.18±6.05 ^{dA}	0.0001	0.0001

Nota: IMC (kg/m²) – Índice de massa corporal; GC (%) – Percentual de Gordura corporal.

Teste ANOVA seguida de Teste de Tukey.

Letras iguais indicam diferenças não significantes entre os grupos após ajustes pela idade.

IC – Idade cronológica; IO – Idade óssea.

Letras minúsculas – comparação para IC. Letras maiúsculas – comparações para IO

Na tabela 3 foram analisados os biomarcadores ósseos (FAO, OC, S-CTx) dos adolescentes de ambos os sexos com excesso de peso segundo as faixas etárias. Em relação ao sexo feminino, observou-se que, o comportamento dos três biomarcadores foi semelhante, onde apresentavam valores mais elevados nas faixas etárias 10 a 11 anos e 12 a 13 anos, o que corresponde aos anos de aceleração máxima de crescimento, quando ocorre o pico de velocidade máxima de crescimento estatural (PHV).

Quanto ao sexo masculino, constatou-se que a média dos três biomarcadores apresentavam-se mais elevadas no grupo etário 13 a 15 anos, momento em que acontece o PHV entre os meninos.

Os resultados referentes à CMO e DMO dos adolescentes segundo estado nutricional estão apresentados em trabalho em anexo (Anexo 5).

Tabela 3. Biomarcadores ósseos (FAO, OC, S-CTx) de adolescentes de ambos os sexos com excesso de peso (n=233) segundo a idade óssea (IO).

BIOMARCADORES ÓSSEOS										
Feminino (n=136)		FAO (U/L)			OC (ng/mL)			S-CTx (ng/mL)		
Idade (anos)	n	$\bar{X}$	DP	mediana	$\bar{X}$	DP	mediana	$\bar{X}$	DP	mediana
10-11	10	162.46	33.64	165.85	37.85	11.61	35.88	1.56	0.41	1.55
12-13	38	163.16	55.42	161.50	31.88	16.61	31.65	1.51	0.45	1.48
14-15	28	75.63	40.29	58.51	22.51	12.68	20.79	0.97	0.37	0.93
16-19	60	58.73	50.64	47.38	16.40	9.21	14.05	0.71	0.26	0.66
Masculino (n=97)										
10-12	8	166.53	52.22	172.62	26.67	10.73	25.99	1.78	0.49	1.86
13-15	64	186.10	73.24	190.52	34.27	15.40	30.93	1.77	0.49	1.77
16-19	25	88.85	43.19	84.50	23.28	11.99	19.99	1.08	0.36	1.09

Nota: FAO – fosfatase alcalina óssea; OC – osteocalcina; S-CTx - telopeptídeo carboxiterminal. Faixas etárias segundo Idade óssea (IO).

Ao observar os resultados referentes aos três biomarcadores, de acordo com a classificação do IMC dos adolescentes, sexos e faixas etárias, constatou-se que não houve diferenças estatísticas entre os biomarcadores das adolescentes com sobrepeso, obesas e superobesas.

Quando a mesma análise foi efetuada para os adolescentes do sexo masculino, foram encontradas diferenças apenas nas idades mais avançadas (16 e 19 anos) para a OC, com médias mais elevadas entre os superobesos. Em relação ao S-CTx as diferenças ocorreram nas primeiras faixas etárias (10 a 12 anos), com médias maiores nos adolescentes sobrepesos e obesos, indicando maior reabsorção óssea e de 13 a 15 anos, onde os valores médios mais elevados foram entre os obesos e superobesos (Tabela 4).

Tabela 4. Média, desvio padrão e mediana dos biomarcadores ósseos (FAO, OC, S-CTx) de adolescentes do sexo feminino e masculino com excesso de peso segundo avaliação nutricional (IMC) e faixas etárias.

Sexo feminino (n=208)														
Sobrepeso (n=53)					Obeso (n=62)					Superobeso (n=21)				
FAO (U/L)														
Idade (anos)	N	$\bar{X}$	DP	mediana	n	$\bar{X}$	DP	mediana	n	$\bar{X}$	DP	mediana	Total	P
10-11	4	167.67	33.83	165.86	5	161.71	40.44	167.31	1	150.59	-	150.58	10	0.895
12-13	18	162.50	62.59	159.57	14	158.30	46.29	162.72	6	176.48	59.63	161.87	38	0.841
14-15	8	80.84	41.26	74.69	15	68.29	40.61	53.97	5	89.03	43.22	72.30	28	0.571
16-19	23	52.63	32.62	41.77	28	65.37	64.94	51.60	9	49.65	18.19	41.56	60	0.271
OC (ng/mL)														
10-11	4	43.28	13.78	35.98	5	35.74	11.77	36.04	1	32.11	-	32.11	10	0.551
12-13	18	32.87	19.44	29.85	14	31.41	12.57	31.17	6	29.98	18.37	34.53	38	0.946
14-15	8	28.83	12.30	26.54	15	19.46	14.16	17.38	5	20.32	4.74	20.24	28	0.346
16-19	23	17.67	10.85	13.52	28	16.72	8.66	14.98	9	13.05	7.49	9.92	60	0.374
S-CTx (ng/mL)														
10-11	4	1.48	0.61	1.28	5	1.61	0.38	1.63	1	1.63	-	1.63	10	0.897
12-13	18	1.60	0.46	1.52	14	1.39	0.40	1.48	6	1.50	0.53	1.50	38	0.462
14-15	8	0.98	0.29	0.89	15	0.90	0.32	0.93	5	1.16	0.64	1.06	28	0.443
16-19	23	0.73	0.30	0.72	28	0.72	0.25	0.66	9	0.62	0.20	0.57	60	0.457
Sexo masculino (n=183)														
Sobrepeso (n=29)					Obeso (n=43)					Superobeso (n=25)				
FAO (U/L)														
Idade (anos)	N	$\bar{X}$	DP	mediana	n	$\bar{X}$	DP	mediana	n	$\bar{X}$	DP	mediana	Total	P
10-12	3	199.72	32.60	199.72	3	145.65	23.40	133.50	2	164.64	103.39	164.65	8	0.471
13-15	15	201.26	105.27	146.19	30	182.66	65.91	195.38	19	181.59	61.67	178.36	64	0.776
16-19	11	96.37	53.78	82.48	10	74.76	27.06	78.33	4	105.49	51.15	127.55	25	0.366
OC (ng/mL)														
10-12	3	30.68	6.62	30.68	3	24.42	15.58	20.01	2	26.03	10.65	26.04	8	0.807
13-15	15	29.66	17.58	28.01	30	34.67	14.58	32.06	19	36.60	15.36	31.07	64	0.502
16-19	11	23.10	11.92	23.14	10	19.27	6.44	16.68	4	32.67	18.45	36.13	25	0.164
S-CTx (ng/mL)														
10-12	3	2.19 ^A	0.44	2.19	3	1.92 ^A	0.13	1.92	2	1.24 ^B	0.24	1.24	8	0.008
13-15	15	1.40 ^B	0.44	1.30	30	1.84 ^A	0.46	1.81	19	1.89 ^A	0.47	1.78	64	0.008
16-19	11	1.08	0.36	1.10	10	1.00	0.25	0.97	4	1.24	0.60	1.36	25	0.554

Nota: FAO – fosfatase alcalina óssea; OC – osteocalcina; S-CTx - telopeptídeo carboxiterminal.

Multiple comparison using PROC GENMOD from SAS program pelo Teste Gamma.

Letras diferentes indicam diferenças; letras iguais não indicam diferenças ao nível de 5%.

Faixas etárias segundo Idade óssea (IO).

Na tabela 5 foram confrontados os biomarcadores ósseos (FAO, OC e S-CTx) dos adolescentes do sexo feminino e masculino classificados segundo o IMC como eutróficos e com excesso de peso segundo as faixas etárias por IO. No sexo feminino, ao analisar o comportamento do biomarcador FAO constatou-se diferenças

estatísticas nos grupamentos etários 10 a 11 anos (IO_1); 12 a 13 anos (IO_2) e 16 a 19 anos (IO_4) entre as adolescentes eutróficas e com excesso de peso, enquanto que não houve diferenças estatísticas na faixa etária de 14 a 15 anos (IO_3). Quanto a OC, as diferenças foram encontradas nas faixas etárias 14 a 15 anos (IO_3) e 16 a 19 anos (IO_4) entre as adolescentes eutróficas e com excesso de peso. E, finalmente, quando observou-se o comportamento do biomarcador S-CTx, verificou-se que as diferenças ocorreram somente no grupo etário mais avançado, 16 a 19 anos (IO_4) entre as adolescentes eutróficas e com excesso de peso.

Quando a mesma análise foi realizada com os adolescentes do sexo masculino, observou-se em relação ao biomarcador FAO diferenças estatísticas somente no grupo etário 13 a 15 anos (IO_2) entre os adolescentes eutróficos e com excesso de peso. Em contrapartida, quanto ao biomarcador OC as diferenças ocorreram na faixa etária 16 a 19 anos (IO_3) entre os adolescentes eutróficos e com excesso de peso. E ao analisar o comportamento do S-CTx verificou-se que as diferenças aconteceram nos grupamentos etários 13 a 15 anos (IO_2) e 16 a 19 anos (IO_3) entre os adolescentes do eutróficos e com excesso e peso (Tabela 5).

Tabela 5. Biomarcadores ósseos (FAO, OC e S-CTx) dos adolescentes do sexo feminino e masculino eutróficos e com excesso de peso segundo faixas etárias.

Sexo feminino (n=208)							
FAO (U/L)							
Eutróficas (n=72)				Excesso de peso (n=136)			
Faixas etárias	N	$\bar{X}$	DP	N	$\bar{X}$	DP	P
IO ₁	12	108.59 ^B	31.41	10	162.46 ^A	33.64	0.039
IO ₂	16	114.91 ^B	42.15	38	163.16 ^A	55.42	0.017
IO ₃	15	66.54 ^A	33.13	28	75.63 ^A	40.29	0.383
IO ₄	29	34.17 ^B	13.62	60	58.73 ^A	50.64	0.001
OC (ng/mL)							
IO ₁	12	47.69	26.66	10	37.85	11.61	0.381
IO ₂	16	23.19	19.55	38	31.88	16.61	0.199
IO ₃	15	8.98 ^B	6.35	28	22.51 ^A	12.68	0.001
IO ₄	29	5.85 ^B	3.47	60	16.40 ^A	9.21	0.001
S-CTx (ng/mL)							
IO ₁	12	1.85	0.58	10	1.56	0.41	0.292
IO ₂	16	1.38	0.78	38	1.51	0.45	0.416
IO ₃	15	0.77	0.23	28	0.97	0.37	0.052
IO ₄	29	0.52 ^B	0.20	60	0.71 ^A	0.26	0.001
Sexo masculino (n=183)							
FAO (U/L)							
Eutróficos (n=86)				Excesso de peso (n=97)			
Faixas etárias	N	$\bar{X}$	DP	N	$\bar{X}$	DP	P
IO ₁	16	111.42	42.41	8	166.53	52.22	0.054
IO ₂	44	151.47 ^B	71.10	64	186.10 ^A	73.24	0.036
IO ₃	26	89.85	49.67	25	88.85	43.19	0.937
OC (ng/mL)							
IO ₁	16	30.02	9.15	8	26.67	10.73	0.579
IO ₂	44	37.86	15.20	64	34.27	15.40	0.275
IO ₃	26	31.69 ^A	16.69	25	23.28 ^B	11.93	0.027
S-CTx (ng/mL)							
IO ₁	16	1.68	0.24	8	1.78	0.49	0.671
IO ₂	44	2.01 ^A	0.57	64	1.77 ^B	0.49	0.044
IO ₃	26	1.87 ^A	0.87	25	1.08 ^B	0.36	0.001

Nota: FAO – fosfatase alcalina óssea, OC – osteocalcina, S-CTx - telopeptídeo carboxiterminal.

IO₁=10-11 anos

IO₂=12-13 anos

IO₃=14-15 anos

IO₄=16-19 anos.

Letras diferentes indicam diferenças; letras iguais não indicam diferenças.

Faixas etárias segundo Idade óssea (IO).

Eutróficas: IO₁=IO₂>IO₃>IO₄.

Excesso de peso: IO₁=IO₂>IO₃>IO₄.

Na tabela 6 apresentamos as correlações de Pearson entre os biomarcadores ósseos e variáveis nutricionais e aquelas resultantes da realização da densitometria, para a amostra final de adolescentes com excesso de peso de ambos os sexos.

Em relação ao sexo feminino evidenciou-se correlações significativas e negativas entre MM, MG e %GC frente a cada um dos três biomarcadores ósseos, ou seja, quanto maior o percentual e MG, menores foram as concentrações dos biomarcadores FAO, OC e S-CTX. Além disso, observou-se correlações negativas e significativas entre o IMC, CMO e DMO de coluna, fêmur, corpo subtotal e total, frente a cada um dos três biomarcadores ósseos.

Em contrapartida, no sexo masculino não foram observadas correlações entre a MM e MG e os três biomarcadores, à exceção do % GC que apresentou correlação significativa com a OC, entretanto, verificou-se correlação negativa significativa entre CMO (lombar, corpo subtotal e corpo total) e DMO (lombar e corpo total) e os biomarcadores FAO e S-CTx. No caso da OC, apenas observou-se significância negativa para o CMO na região lombar.

Tabela 6. Correlação de Pearson entre os Biomarcadores ósseos (FAO, OC e S-CTx) e IMC, MM, MG, % GC, CMO e DMO nos quatro sítios avaliados para a amostra final de adolescentes com excesso de peso de ambos os sexos.

	Sexo feminino (n=136)			Sexo masculino (n=97)		
	FAO (U/L)	OC (ng/mL)	S-CTx (ng/mL)	FAO (U/L)	OC (ng/mL)	S-CTx (ng/mL)
IMC (kg/m ²)	-0.392 (<0.001)	-0.398 (<0.001)	-0.441 (<0.001)	-0.172 (0.085)	-0.001 (0.999)	-0.055 (0.590)
MM (g)	-0.498 (<0.001)	-0.446 (<0.001)	-0.497 (<0.001)	-0.200 (0.050)	-0.181 (0.078)	-0.197 (0.058)
MG (g)	-0.461 (<0.001)	-0.449 (<0.001)	-0.431 (<0.001)	-0.001 (0.996)	0.132 (0.201)	0.045 (0.668)
GC (%)	-0.204 (0.016)	-0.259 (0.002)	-0.189 (0.028)	0.072 (0.478)	0.216 (0.031)	0.135 (0.190)
CMO-Coluna (g/cm ²)	-0.587 (<0.001)	-0.467 (<0.001)	-0.554 (<0.001)	-0.358 (0.001)	-0.216 (0.031)	-0.321 (0.001)
CMO-Fêmur (g/cm ²)	-0.452 (<0.001)	-0.352 (<0.001)	-0.445 (<0.001)	-0.137 (0.175)	-0.114 (0.259)	-0.110 (0.282)
CMO-Subtotal (g/cm ²)	-0.565 (<0.001)	-0.452 (<0.001)	-0.547 (<0.001)	-0.299 (0.003)	-0.115 (0.258)	-0.278 (0.006)
CMO-Corpo total (g/cm ²)	-0.596 (<0.001)	-0.462 (<0.001)	-0.573 (<0.001)	-0.243 (0.016)	-0.061 (0.551)	-0.253 (0.013)
DMO-Coluna (g/cm ²)	-0.59645 (<0.001)	-0.458 (<0.001)	-0.553 (<0.001)	-0.390 (<0.001)	-0.117 (0.247)	-0.360 (0.003)
DMO-Fêmur (g/cm ²)	-0.505 (<0.001)	-0.396 (<0.001)	-0.487 (<0.001)	-0.178 (0.077)	-0.123 (0.2223)	-0.246 (0.015)
DMO-Subtotal (g/cm ²)	-0.581 (<0.001)	-0.431 (<0.001)	-0.540 (<0.001)	-0.342 (0.006)	-0.137 (0.178)	-0.383 (0.001)
DMO-Corpo total (g/cm ²)	-0.629 (<0.001)	-0.432 (<0.001)	-0.581 (<0.001)	-0.387 (<0.001)	-0.128 (0.207)	-0.459 (<0.001)

Nota: FAO – fosfatase alcalina óssea; OC – osteocalcina; S-CTx - telopeptídeo carboxiterminal; IMC (kg/m²) – Índice de massa corporal; MM (g) – Massa magra em gramas; MG (g) – Massa de gordura em gramas; % GC – Percentual de gordura corporal; CMO - conteúdo mineral ósseo; DMO - densidade mineral óssea.

Teste Correlação de Pearson.

4 Discussão

Os marcadores apresentaram concentrações evolutivas que acompanharam as curvas de crescimento, num comportamento que poderia ser considerado como apresentando um paralelismo à aceleração e desaceleração do crescimento, próprias dessa fase da vida, mesmo que em situação nutricional altamente adversa, no caso, a constatação de níveis crescentes tanto absolutos

como relacionados ao percentual de gordura desses adolescentes. Esse mesmo comportamento evolutivo dos biomarcadores ósseos já havia sido evidenciado por nosso grupo de pesquisa, em estudos publicados avaliando adolescentes de ambos os sexos, na condição nutricional de eutrofia [17,19,20,35].

Sabe-se que, entre adolescentes, o critério idade cronológica é considerado muitas vezes impreciso, assim, o emprego da idade óssea e a avaliação dos eventos pubertários apresenta-se como alternativa bastante sensível para compará-los [17]. Para tanto, constatamos que em todos os grupamentos nutricionais, segundo os sexos, ocorreu avanço nas médias das idades ósseas em relação às médias das idades cronológicas. Essa constatação já era promulgada na literatura especializada para o sexo feminino [36-39], entretanto, para o sexo masculino havia controvérsias [40]. Recentemente Vandewalle e colaboradores [41] acompanhando adolescentes nessa condição nutricional, relataram que adolescentes obesos do sexo masculino, apresentavam avanço da idade óssea frente à idade cronológica, quando comparados a meninos eutróficos, resultados confirmados em nosso estudo.

Encontramos que tanto a FAO, como a OC e o S-CTx apresentaram valores mais elevados nas faixas etárias que continham o pico de velocidade de crescimento estatural (PHV) na amostra total de adolescentes com excesso de peso. Nas meninas esse período foi constatado entre a faixa etária de 10 a 13 anos, que corresponderia aos anos de aceleração máxima de crescimento. O PHV entre meninas brasileiras é apresentado como ocorrendo aos 11,3 anos, seguindo-se na sequência a desaceleração de crescimento. Entretanto, no caso dos meninos, estudos revelam que o PHV ocorre por volta de 13,3 anos, idade contida no segundo grupamento etário, 13 a 15 anos, em que as médias dos três biomarcadores também se apresentaram mais elevadas quando comparadas às demais faixas etárias [42].

Desta maneira, verifica-se a existência de uma associação importante, entre o PHV e o processo de velocidade de incremento de massa óssea, onde há evidências de que o PHV apresenta dimorfismo sexual, sendo constatado cerca de dois anos antes em meninas quando comparado ao momento evidenciado nos meninos.

Quanto ao depósito de massa óssea, Vatanparast e Whiting [43] constataram que o pico de velocidade de incremento de massa óssea (PBMCV), avaliado pelo conteúdo mineral ósseo, ocorreu em média em 0,7 de ano após o PHV, estando claramente relacionado à maturação dos adolescentes. Sabe-se que, nas meninas a metade do conteúdo total de cálcio é incorporado durante a puberdade, enquanto que, nos meninos esse processo acontece mais rapidamente, sendo adquirido metade a dois terços do conteúdo total de cálcio até o final da puberdade [17,19,20, 35,44-47].

Os achados de nosso estudo demonstraram ainda que, no sexo feminino não houve diferenças estatísticas significativas entre os biomarcadores de remodelação das adolescentes com sobrepeso, obesas e superobesas, segundo os diversos grupamentos etários propostos. Entretanto, no sexo masculino, foram encontradas diferenças apenas em relação ao biomarcador S-CTx nas primeiras faixas etárias (10 a 12 anos), sendo que as médias maiores, que indicam maior reabsorção óssea foram observadas nos adolescentes sobrepesos e obesos e para a faixa etária de 13 a 15 anos, onde os valores médios mais elevados foram entre os obesos e superobesos. Nossos resultados reforçam constatações promulgadas por Dimitri e colaboradores [22], que não obtiveram aumento de outro marcador ósseo de formação analisado, propeptídeo amino terminal do procolágeno tipo 1 (P1NP) entre suas 52 crianças e adolescentes excessivamente obesos, mas que constataram elevação das médias de S-CTx quando essas foram ajustadas segundo estágios puberais e sexo, entre o grupo de obesos frente ao de eutróficos [22,48].

Diante dessas constatações, pode-se aventar hipóteses que outros fatores exerçam influência sobre a massa óssea de adolescentes além apenas do excesso de gordura corporal isoladamente, como a ação de alguns hormônios [49,50]. Assim, a influência resultante do desencadear da puberdade relacionada ao aumento da massa de gordura, seria outra possível explicação para a constatação da elevação dos marcadores ósseos de remodelação nessa fase da vida. Como a puberdade é caracterizada pelo processo de maturação física com efeitos a longo prazo sobre a saúde, nos últimos anos foi demonstrado que, a adiposidade ou as alterações na composição corporal exercem efeitos importantes e decisivos no desenvolvimento físico dos adolescentes, devido ao fato de que quando com excesso de peso, especificamente na fase pré-pubere, apresentam maior velocidade de crescimento e

idade óssea avançada, que entretanto não resultam em benefício ao ganho estatural final [51].

Complementando, algumas adipocinas (citocinas) secretadas pelo tecido adiposo estão sendo investigadas por desempenharem um papel importante na regulação do crescimento no contexto da obesidade. Dentre elas, especificamente, a leptina tem sido apontada, devido ao fato de estar envolvida no início e progressão da puberdade, de se apresentar altamente correlacionada com a quantidade de gordura corporal e pela hipótese de haver uma ligação entre a obesidade e a secreção de GH prejudicada, o que é descrito nas meninas, como enfatizado por Leonibus e colegas [51]. Em contrapartida, nos meninos, com peso adequado para a idade, a leptina sérica diminui após o início da puberdade, devido à maior aquisição de massa magra, retornando aos níveis normais em torno de 30 a 40 meses após essa fase [52-55].

Sabe-se ainda, que a leptina em concentrações aumentadas é um hormônio que pode provocar um impacto negativo sobre o metabolismo ósseo de crianças e adolescentes obesos, embasado no fato de que, concentrações elevadas aceleram o processo de reabsorção e reduzem a formação óssea, sendo que as consequências são alterações na microestrutura óssea desses indivíduos e ainda aumento do risco de fraturas [22,56,57].

Entretanto, esses resultados ainda permanecem contraditórios e inconclusivos, pois a concentração sérica das adipocinas pode ser afetada por múltiplos fatores como idade, sexo, raça, tabagismo, presença de patologias (diabetes), níveis hormonais, atividade física, entre outros. Desta forma, embora as pesquisas tenham realizado ajustes para a idade, sexo e outras variáveis estudadas, todas apresentam limitações próprias que podem influenciar os resultados obtidos relacionados à alteração da microarquitetura e da constatação de fraturas ósseas [58,59]. Nesse contexto ainda, alguns estudos, utilizando ratos, demonstraram que existe uma via endócrina entre o osso e a homeostase de energia e que além das funções tradicionais, o osso se apresenta também como um órgão endócrino que é capaz de produzir OC, sendo capaz de influenciar nos mecanismos de liberação, sensibilidade e resistência à insulina [57, 58, 60, 61].

Na sequência, constatou-se que as concentrações de FAO foram significativamente maiores nas meninas com excesso de peso em relação às eutróficas na quase totalidade das faixas etárias e o mesmo comportamento foi

observado para OC e S-CTx, porém, somente nas faixas etárias mais avançadas. Esses achados no tocante à elevação do S-CTx, mais uma vez, podem ser explicados através da resposta inflamatória crônica provocada pelo excesso de peso, onde é desencadeado o processo denominado osteoclastogênese, induzido pelas citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo, tais como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, e TNF- α , que estão notoriamente elevadas nos indivíduos obesos, assim ocorrendo maior reabsorção óssea, o que conseqüentemente poderia resultar em redução de incremento da massa óssea durante a fase de puberdade desses adolescentes obesos [49,62-66].

Em contrapartida, no sexo masculino as concentrações de FAO foram significativamente maiores nos adolescentes com excesso de peso somente na faixa etária de 13 a 15 anos. Por outro lado, os valores de OC e S-CTx foram significativamente menores nos meninos com excesso de peso em relação aos eutróficos, porém nas faixas etárias mais avançadas, onde esse último fato sugere uma menor formação óssea nesses indivíduos. Esse mesmo comportamento foi observado no estudo realizado por Viljakainen e colaboradores [58].

Ainda na tentativa de esclarecer os possíveis efeitos do excesso de gordura corporal sobre as variáveis relativas à formação e reabsorção óssea, evidenciou-se no sexo feminino correlações significativas e negativas entre massa gorda (g), percentual de gordura corporal com os três biomarcadores ósseos, ou seja, quanto maior o percentual e a massa de gordura, menores os valores dos marcadores FAO, OC e S-CTX. Em relação à OC os dados confirmam os encontrados na literatura referentes a esse marcador ósseo [67,68], os quais apontaram que quanto maior o excesso de peso, menor a OC. Salienta-se novamente que os autores não investigaram o comportamento de outros biomarcadores de formação óssea (FAO) em alguns dos estudos analisados ou de reabsorção óssea (S-CTX), como também não aprofundaram suas pesquisas quanto a análise segundo a faixa etária, como realizado por nós. De maneira diversa, no sexo masculino não foram observadas correlações entre a massa magra e massa de gordura e os três biomarcadores, à exceção do percentual de gordura que apresentou correlação positiva e significativa com a OC.

Concentrações de OC sérica menores em mulheres obesas na pós-menopausa quando comparadas a não obesas tem sido observadas e reforçam o fato de que podem sinalizar o risco metabólico nesse grupo de indivíduos. Além

disso, adultos com sobrepeso e obesos apresentaram menores concentrações de OC total, carboxilada e não carboxilada frente a adultos com peso adequado [69-71]. Ainda Polgreen e colaboradores [69] propuseram que quanto maior a presença de fatores de risco cardiovascular, menores as concentrações de OC. Apesar dessa possibilidade, questiona-se se a relação OC e IMC é dependente do tecido ósseo ou se relaciona ao tecido gorduroso, já que esse também é capaz produzir e secretá-la [72]. Destaca-se que o papel da osteocalcina na regulação da gordura corporal e perfil lipídico não está bem estabelecido e outros estudos necessitam ser desenvolvidos [73].

Na sequência, constatou-se correlações negativas e significativas entre o IMC, CMO e DMO de coluna, fêmur, corpo subtotal e total, frente a cada um dos três biomarcadores ósseos. Entretanto, quando a mesma análise foi realizada para o sexo masculino, observou-se que, todas elas foram negativas e significantes entre as variáveis de avaliação óssea e o S-CTx e de grande parte delas frente a FAO, entretanto para a OC esse mesmo comportamento não foi identificado, destacando que, quanto maiores os valores de DMO e CMO, menores foram os valores de alguns biomarcadores analisados.

Para tanto, as constatações do presente estudo são de grande relevância à comunidade científica, pois recomenda-se o uso de mais de um biomarcador de remodelação óssea para melhor detectar os efeitos do excesso de peso sobre o crescimento longitudinal e o acúmulo mineral ósseo, uma vez que a sensibilidade e os valores preditivos dos marcadores individualmente ainda permanecem inconclusivos. Assim, ao avaliarmos o comportamento dos dois biomarcadores ósseos de formação (FAO e OC) e um de reabsorção (S-CTx) nos adolescentes de ambos os sexos em seus vários estados nutricionais e, segundo faixas etárias diferentes, foi possível vivenciar e identificar a dificuldade de interpretação desses marcadores frente a um período de grandes transformações biológicas, no qual os participantes se encontravam. Mediante a interpretação da evolução dos marcadores ósseos, foi possível observar os eventos de formação e reabsorção óssea através da dosagem dos mesmos, mas lamentavelmente, os resultados não nos permitiram distinguir sua atuação entre fases de crescimento, modelação e remodelação óssea, aliado ainda ao fato de que representam apenas uma média de todos esses eventos que acontecem simultaneamente nesse período da vida, com velocidades diversas nos vários locais do esqueleto [74-78].

Diante de todas as observações e inferências, poderíamos aventar que esse seria um mecanismo de proteção desenvolvido pelo organismo para tentar enfrentar essa situação metabolicamente grave, que se apresenta pela alta prevalência e gradação de um estado de obesidade em indivíduos ainda em fase de crescimento e desenvolvimento físico, na "tentativa" de preservar sua massa óssea, tanto para o momento atual como na vida futura.

5. Conclusão

Nosso estudo revelou que o excesso de gordura corporal pode provocar um impacto negativo em relação ao comportamento desses marcadores no sexo feminino, pois quanto maior o percentual e a massa de gordura, menores foram os valores dos biomarcadores de remodelação óssea.

Quando correlacionados aos valores de CMO e DMO, que representam a incorporação da massa óssea, constatou-se um comportamento inversamente proporcional, pois, quanto maiores os resultados de CMO e DMO menores os valores dos biomarcadores analisados.

Diante do exposto, evidenciou-se que os biomarcadores de remodelação óssea apresentaram valores evolutivos que acompanharam o desenvolvimento linear em comprimento do esqueleto, onde os valores dos marcadores tanto de formação, quanto de reabsorção são elevados nos primeiros anos da puberdade em ambos os sexos e diminuem significativamente com o avançar da idade, ou seja, os desvios nutricionais por excesso parecem não oferecer quaisquer benefícios adicionais em termos de formação óssea nessa fase da vida.

7 Referências

[1] Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab.2007; 92: 1640-46.

- [2] National osteoporosis foundation: Strong voices for strong bones. Washington, DC: Available from: <http://www.nof.org/files/nof/public/content/file/63/upload/49.pdf> (cited 01 March 2013).
- [3] Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46: 72-8.
- [4] Seibel MJ. Bone turnover in nutrition-related disorders markus. *Wien Med Wochenschr.* 2007; 24: 582–8.
- [5] Giacaglia LR, Martin RM, Silva RAL. Terapia nutricional em doenças ósseas. In: Silva SMC, Mura JDP. *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.* 2ª edição. São Paulo: Roca; 2011. 813-28.
- [6] Liu Y, Song CY, Wu SS, Liang QH, Yuan LQ, Liao EY. Novel adipokines and bone metabolism. *Int J Endocrinol.* 2013; 1-9.
- [7] Hyun WL, Sang YK, Kim AY, Eun JL, Choi JY, Jae BK. Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. *StemCells.* 2009; 27: 2254–62.
- [8] Huang CY, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, Tang HC. Adiponectin increases BMP-2 expression in osteoblasts via AdipoR receptor signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2010; 224: 475–83.

- [9] Luo E et al. Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits. *Acta Biomater.*2012; 8: 734–43.
- [10] Zhang H et al. Relationships between serum adiponectin, apelin, leptin, resistin, visfatin levels and bone mineral density, and bone biochemical markers in postmenopausal Chinese women. *J Endocrinol Invest.*2010; 33: 707–11.
- [11] Wu N, Wang QP, Li H, Wu XP, Sun ZQ, and X. H. Luo. Relationships between serum adiponectin, leptin concentrations and bone mineral density, and bone biochemical markers in chinese women. *Clin Chim Acta.*2010; 411: 771–5.
- [12] Rhie YJ, Lee KH, Chung SC, Kim HS, Kim DH. Effects of body composition, leptin, and adiponectin on bone mineral density in prepubertal girls. *J Korean Med Sci.* 2010; 25: 1187–90.
- [13] Iida T, Domoto T, Takigawa A., et al. Relationships among blood leptin and adiponectin levels, fat mass, and bone mineral density in japanese pre- and postmenopausal women. *Hiroshima J Med Sci.* 2011; 60: 71–8.
- [14] Mosca LN, Silva VN, Goldberg TBL. Does excess weight interfere with bone mass accumulation during adolescence? *Nutrients.*2013; 5: 2047-61.

- [15] Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, Bono S, Ginty F, Goldberg GR. Symposium on 'Nutrition and health in children and adolescents'. Session 1: Nutrition in growth and development. Nutrition and bone growth and development. Proc Nutr Soc. 2006; 65: 348–60.
- [16] Yilmaz D et al. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers and growth parameters. J Bone Miner Metab. 2005; 23: 476–82.
- [17] Silva CC, Goldberg TBL, Nga HS, Kurokawa CS, Capela RC, Teixeira AS, Dalmas JC. Impact of skeletal maturation on bone metabolism biomarkers and bone mineral density in healthy Brazilian male adolescents. J Pediatr. 2011; 87: 450-60.
- [18] Silva CC, Kurokawa CS, Nag HS, Moretto MR, Dalmas JC, Goldberg TB. Bone metabolism biomarkers, body weight, and bone age in healthy Brazilian male adolescents. J Pediatr Endocrinol. 2012; 25: 479-84.
- [19] Goldberg TBL, Fortes CMT, Kurokawa CS, Silva CC, Moretto MR, Nunes HRDC. Relationship between bone age and pubertal breast stage to bone biomarkers and bone mineral density in healthy brazilian female adolescents. Arch Dis Child. 2012; 97(2): 126.
- [20] Fortes CMT. Densidade mineral óssea de adolescentes do sexo feminino e suas relações com biomarcadores ósseos [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2012.

- [21] Rauchenzauner M et al. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab.*2007; 2: 443–9.
- [22] Dimitri P, Wales JK, Bishop N. Adipokines, bone-derived factors and bone turnover in obese children; evidence for altered fat-bone signalling resulting in reduced bone mass. *Bone.*2011; 48: 189–96.
- [23] Mosca LN, Lederer Goldberg TB, Nóbrega da Silva V, da Silva CC, Kurokawa CS, Bisi Rizzo AC, Corrente JE. Excess body fat negatively affects bone mass in adolescents. *Nutrition.*2014; 30: 847-52.
- [24] Frisancho AR. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. University of Michigan; 1990.
- [25] Center of Disease Control and Prevention [CDC].National Center for health statistics CDC Growth Charts 2000.United States. [Documento online]. Disponível em<URL:http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens_bmi/about_child_rensbmi.html#What%20is%20BMI> [acesso em 14 jul 2012].
- [26] Freedman DS, Mei Z, Srinivasan SS, Brenson GS, Dietz WH. Cardiovascular risk factors and excess adiposity among overweight children and adolescents: The Bogalusa Heart Study. *J Pediatr.*2007; 150: 12-17.

- [27] Barlow SE and the Expert Committee. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *pediatrics*.2007; 120: 164-92.
- [28] Institute of Medicine (IOM). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). Washington DC: National Academies Press; 2005.
- [29] Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr*.2001; 74: 694-700.
- [30] Fitzpatrick L, Heaney RP. Got soda? *J Bone Miner Res*. 2003; 18: 1570-2.
- [31] McGartland C, Robson PJ, Murray L, et al. Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: the northern ireland young hearts project. *J Bone Mineral Res*. 2003; 18: 1563-9.
- [32] Greulich W, Pyle S. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist; 1959.
- [33] Lima F, Falco V, Baima J, Carazzato JG, Pereira RMR. Effect of impact load and active load on bone metabolism and body composition of adolescent athletes. *Med Sci Sports Exerc*.2001; 33: 18-23.

- [34] Vicente RG. How does exercise affect bone development during growth? *Sports Méd.*2006; 36: 561-9.
- [35] Moretto MR, Silva CC, Kurokawa CS, Fortes CM, Capela RC, Teixeira AS, Dalmas JC, Goldberg TB. Bone mineral density in healthy female adolescents according to age, bone age and pubertal breast stage. *Open Orthop J.* 2011; 5: 324-30.
- [36] Adami F, Vasconcelos FAG. Obesidade e maturação sexual precoce em escolares de Florianópolis – SC. *Rev Bras Epidemiol.* 2008; 11: 549-60.
- [37] Kaplowitz, PB. Link between body fat and the timing of puberty. *Pediatrics.*2008; 3: 208-1.
- [38] Wagner IV et al. Effects of obesity on human sexual development. *Nat Rev Endocrinol.*2012; 8: 246- 54.
- [39] Biro FM, Pinney SM, Huang B, Baker ER, Chandler DW, Dorn LD. Hormone Changes in Peripubertal Girls. *J Clin Endocrinol Metab.*2014; 99: 3829–35.
- [40] Condorelli RA et al. The gonadal function in obese adolescents: review. *J Endocrinol Invest.* 2014; 37: 1133–42.
- [41] Vandewalle S et al. Sex steroids in relation to sexual and skeletal maturation in obese male adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.*2014; 8: 2977–85.

[42] Colli AS. Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiras. Maturação sexual. São Paulo: Editora Brasileira de Ciências, 1988.

[43] Vatanparast H, Whiting SJ, Adolescence, the optimum time to maximize bone mass through calcium & vitamin D. University of Saskatchewan, College of Pharmacy and Nutrition. The Whitehall-Robins Report.2005; 14.

[44] Lloyd, T, Rollings, N, Andon, MB, et al. Determinants of bone density in young women. I. Relationships among pubertal development, total body bone mass, and total body bone density in premenarchal females. J Clin Endocrinol Metab.1992; 375:83.

[45] Magarey, AM, Boulton, TJ, Chatterton, BE, et al. Bone growth from 11 to 17 years: relationship to growth, gender and changes with pubertal status including timing of menarche. Acta Pediatr 1999; 88:139.

[46] Yilmaz D et al. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers and growth parameters. J Bone Miner Metab.2005; 23: 476–82.

[47] Rauchenzauner M et al. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. J Clin Endocrinol Metab.2007; 2: 443–49.

[48] Tenta R et al. Osteoprotegerin and nuclear factor-kappaB ligand are associated with leptin and adiponectin levels, in apparently healthy women. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2010; 10: 174-9.

[49] Radetti G, Franceschi R, Adami S, Longhi S, Rossini M, Gatti D. Higher circulating parathormone is associated with smaller and weaker bones in obese children. *Calcif Tissue Int.* 2014; 95: 1–7.

[50] Foo JP, Polyzos SA, Anastasilakis AD, Chou S, Mantzoros CS. The effect of leptin replacement on parathyroidhormone, RANKL-osteoprotegerin axis, and wntinhibitors in young women with hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: E2252–E8.

[51] Leonibus CD, Marcovecchio ML, Chiarelli F. Update on statural growth and pubertal development in obese children. *Pediatric Reports.* 2012; 4e35: 119-26.

[52] Ahima, RS et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.*1996; 382: 250-2.

[53] Matkovic et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab.*1997; 82: 3239-45.

[54] Biro FM, Kirkland JL, Middleman AB, Duryea Teresa, Hoppin AG. Normal puberty. Wolters Kluwer Health. 2010. 1-27. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/normal-puberty?topicKey=PEDS/584>. Acesso em 03/02/2016.

- [55] Maskin de Jensen A, López M, Mir C, Martínez M, Ibañez de Pianesi M, Erhard M. Niveles séricos de leptina y su relación con la excreción de sodio en niños y adolescentes obesos. *Rev argent endocrinol metab.* 2011;48: 127-35.
- [56] Dimitri et al. Leptin may play a role in bone microstructural alterations in obese children. *J Clin Endocrinol Metab.*2014; 100: 594-602.
- [57] Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab.*2008; 19: 161-6.
- [58] Viljakainen H et al. Suppressed Bone Turnover in Obesity: A link to energy metabolism? A Case-Control Study. *J Clin Endocrinol Metab.*2014; 99: 2155–63.
- [59] Wang Jing-Wen, Tang Qing-Ya, Ruan Hui-Juan, Cai W. Relation between serum osteocalcin levels and body composition in obese children. *JPGN.*2014; 58: 729–32.
- [60] Paldánius PM et al. The effect of oral glucose tolerance test on serum osteocalcin and bone turnover markers in young adults. *Calcif Tissue Int.* 2012; 90: 90-5.
- [61] Lieben L, CallewaertF, Bouillon R. Bone and Metabolism: A complex crosstalk. *Horm Res*, 2009;71:134–8.

[62] Takayanagi T et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 integrate RANKL signaling in the terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002; 3: 889–01.

[63] Kudo O, Fuzikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNF/IL-1) induction of human osteoclast formation. *J Pathol*. 2002; 198: 220–27.

[64] Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of RANKL, osteoprotegerin, RANK in mouse calvariae. *J Immunol*. 2002; 169: 3353–62.

[65] Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res*. 2002; 21: 73–80.

[66] Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res*. 2011; 6: 1-7.

[67] Reinehr T, Roth CL. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2010; 34: 852-8.

[68] Kim GS, Jekal Y, Kim HS, Im JA, Park JY, Chu SH. Reduced serum total osteocalcin is associated with central obesity in Korean children. *Obes Res Clin Pract*. 2013; 8: 230-37.

- [69] Polgreen LE, Jacobs DR Jr, Nathan BM, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity (Silver Spring)*.2012; 20: 2194–01.
- [70] Ferron M et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*.2010; 142: 296–08.
- [71] Abseyi N, Şıklar Z, Berberoğlu M, Hacıhamdioğlu B, Erdeve SS, Öçal G. Relationships between osteocalcin, glucose metabolism, and adiponectin in obese children: is there crosstalk between bone tissue and glucose metabolism? *J Clin Res PediatrEndocrinol*.2012; 4: 182-88.
- [72] Dubnov-Raz G, Ish-Shalom S, Chodick G, Rozen GS, Giladi A, Constantini NW. Osteocalcin is independently associated with body mass index in adolescent girls. *Pediatric Obesity*.2012; 7: 313–18.
- [73] Garcia-Martín A, Cortes-Berdonces M, Luque-Fernandez I, Rozas-Moreno P, Quesada-Charneco M, Munoz-Torres M. Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause*.2011; 18: 537-41.
- [74] Creighton DL, Morgan AL, Boardley D, Brolinson PG. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. *J Appl Physiol*. 2001; 90: 565–70.

[75] van der Sluis IM, Hop WC, van Leeuwen JPTM, et al. A cross-sectional study on biochemical parameters of bone turnover and vitamin D metabolites in healthy Dutch children and young adults. *Horm Res.* 2002; 57: 170–79.

[76] Jürimäe J, Mäestu J, Jürimäe T. Bone turnover markers during pubertal development: relationships with growth factors and adipocytokines. *Med Sport Sci.* 2010; 55: 114-27.

[77] Jürimäe J. Interpretation and application of bone turnover markers in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr.* 2010; 22: 494–00.

[78] Walsh JS, Henry YM, Fatayerji D, Eastell R. Hormonal determinants of bone turnover before and after attainment of peak bone mass. *Clin Endocrinol.* 2010; 72, 320-2.

6 Artigo Científico encaminhado para publicação

The impact of excess body fat on bone remodeling in adolescents

Luciana Nunes Mosca¹, Tamara Beres Lederer Goldberg^{1,*}, Valéria Nóbrega da Silva¹, Cilmary Suemi Kurokawa², Anapaula C. Bisi Rizzo¹, Carla Cristiane da Silva³, Altamir dos Santos Teixeira⁴, José Eduardo Corrente⁵

¹ Postgraduate Program in Gynecology, Obstetrics, and Mastology, Discipline of Adolescent Medicine, Department of Pediatrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP 18618-970, Brazil - lucianamosca@outlook.com, tamara@fmb.unesp.br, valerianutry@gmail.com, anapaula.rizzo@uol.com.br

² Clinical and Experimental Pediatric Research Center, Department of Pediatrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), SP18618-970, Brazil - kurokawa@fmb.unesp.br

³ Department of Physical Education, University of North Paraná, Paraná, Brazil - ccsilva@uenp.edu.br

⁴ Tropical Disease and Image Diagnosis, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP 18618-970, Brazil- altamir@fmb.unesp.br

⁵ Department of Statistics, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP18618-970, Brazil - jecorren@ibb.unesp.br

*Corresponding author:

Corresponding author contact information: tamara@fmb.unesp.br; Tel.: +55-14 - 3811-6274 / +55-14-3811-6083.

Word count: 4067 words of text (excluding abstract, figure captions, and references); 352 words of abstract; 6 tables

Disclosure statement: The authors have nothing to disclose.

The authors declare no conflicts of interest

Fellowships supporting the writing of the paper: Fellowships supporting the writing of the paper: Supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) – Process nos. 07/07731-0 and 2011/05991-0, and Pro-Rector for Research of UNESP

Abstract

Excess weight and osteoporosis are serious public health problems. The aim of this study was to investigate the impact of excess body fat on bone remodeling in overweight, obese and extremely obese adolescents by bone densitometry and by measuring biomarkers of bone formation and resorption. Body weight, height and body mass index (BMI) were determined in 391 adolescents aged 10 to 20 years. The participants were classified as eutrophic, overweight, obese, and extremely obese. Bone age was obtained and bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) were evaluated in the lumbar spine, proximal femur, and total and subtotal body. Blood samples were collected for evaluation of the following bone biomarkers: osteocalcin, bone alkaline phosphatase (BAP), and serum carboxy-terminal telopeptide (S-CTx). Analysis of variance followed by the Tukey test was used for comparison between groups. A generalized linear model with gamma distribution was applied to compare the groups stratified by sex and Pearson's correlation test to evaluate associations between the three bone biomarkers and lean mass (LM), fat mass (FM), body fat percentage (BF%), BMI, BMC and BMD ($p < 0.05$). In girls with excess weight, the concentrations of the biomarkers were higher in the 10 to 13-year age group and no significant differences were observed between groups according to nutritional status. In boys with excess weight, the mean levels of the markers were higher in those aged 13 to 15 years. According to nutritional status, significant differences were only observed in mean S-CTx for the age groups between 10-12 and 13-15 years, with higher levels in overweight and obese adolescents aged 10-12 years and between obese and extremely obese

adolescents aged 13-15 years. In girls, significant negative correlations were observed between LM, FM and BF% and each of the three bone markers studied. There was no correlation between LM or FM and the three biomarkers in boys, except for BF%, which was significantly correlated with osteocalcin. The higher the fat percentage and FM in girls, the lower the levels of the biomarkers of bone remodeling, indicating that excess body fat has a negative effect on the evolution of these markers during adolescence.

Keywords: Adolescents; Bone Mineral Content; Bone Mineral Density; Obesity; Bone Remodeling; Osteocalcin.

Introduction

Osteoporosis and obesity are common chronic diseases that represent public health problems due to their negative health impact. The first two decades of life have been indicated as critical periods for the occurrence of osteoporosis, since childhood and adolescence are phases of exponential bone mass development. It thus remains necessary to elucidate the impact of excess body fat, already present during those years, on bone mass accrual [1,2].

An increase in bone mass of approximately 8.5% per year occurs in adolescents exactly during this period of intense physical changes that comprises the growth spurt. This requires that a sequence of events involving bone formation and resorption starts in childhood and continues during adolescence. These two important and connected processes depend on the coordinated action of three types of cells: osteoblasts, which are derived from mesenchymal cells and are responsible for the formation of new bone on resorbed surfaces; osteoclasts, which have the ability to solubilize the collagen matrix, releasing calcium and phosphate from bone that will subsequently be used in the process of bone formation, and osteocytes whose function is to provide support for the mineralized bone matrix [3-5].

Bone is a highly complex and active tissue that provides rigid support to body extremities, serves as a protection of vital organs, promotes locomotion by serving as the basis for the insertion of different muscle groups, and is a large reservoir of mineral elements. Recently, bone tissue has been recognized as an endocrine organ

and a complex link with adipose tissue has been proposed since adipocytes and osteoblasts originate from the same cell line: mesenchymal stem cells. Reducing the number of adipocytes may increase the number of osteoblasts due to the competitive relationship between these cells during the process of cell differentiation [5,6].

Adipose tissue plays an important role in bone metabolism because of the production of the so-called adipokines [6]. Some adipokines exert a positive effect on bone formation by promoting the maturation of osteoblasts and others are predictors of orthopedic fractures [7-9], while some adipokines can inhibit or stimulate the activation of osteoblasts and osteoclasts through different mechanisms [10-14].

Substances recognized as biochemical markers of bone metabolism are released during the processes of bone formation and resorption, which result from the physiologically coupled action of osteoclasts and osteoblasts. In normal physiological situations, bone resorption and formation are dependent phenomena and the predominance of one over the other may result in the gain or loss of bone mass [4].

The duration of the process of bone resorption is shorter than that of bone formation. Markers of bone resorption sometimes respond faster to certain changes, such as those due to age when the skeleton is at its peak of development and longitudinal growth predominates. With respect to bone modeling and remodeling, simultaneous processes by which bone attains its shape and size, markers of bone formation and resorption are present at high levels since they accompany the development [15]. The levels of bone markers of either bone formation or resorption decline at the end of adolescence in both genders to levels close to those seen in adults (20 to 30 years of age) [16-20]. When combined with the evaluation of bone mineral density (BMD), bone markers have been indicated as an excellent resource to evaluate peak bone mass acquisition and complications suffered during different phases of life associated with the loss of bone mass, ranging from childhood to menopause and aging [20,21].

In adolescents with excess weight, the effects of obesity on bone mass and its relationship with biochemical markers of bone remodeling are not fully elucidated. Dimitri, Wales and Bishop [22], evaluating 103 children aged 5 to 16 years divided into two groups (extremely obese/obese: $n = 52$ and eutrophic: $n = 51$), found that fractures were more common in the excess weight group, suggesting lower bone mass and thus thinner bones in these patients with excess fat mass. A recent study

demonstrated a reduction in bone mass, evaluated by bone densitometry using dual energy X-ray absorptiometry (DXA), in extremely obese adolescents when compared to overweight adolescents [23].

The objective of the present study was to evaluate the evolution of some biomarkers of bone formation and resorption in adolescent girls and boys with excess weight resulting from the accumulation of fat mass, classified as overweight, obese and extremely obese, in order to elucidate the evolution of bone mass in response to this severe nutritional problem.

Materials and Methods

A total of 391 adolescents aged 10–19 years registered at the Adolescent Outpatient Clinic of the Botucatu Medical School University Hospital (SP, Brazil) were invited to participate in the study. The informed consent form was signed by the adolescents or by their parents or legal guardians. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School (UNESP, OF.190/2009).

Weight (kg) and height (m) were obtained as described previously [24] and the body mass index (BMI, kg/m^2) was subsequently calculated and used to classify nutritional status. Adolescents were classified as eutrophic (between the 5th and 85th percentiles), overweight (≥ 85 th and < 95 th percentiles), obese (≥ 95 th percentile), and extremely obese (> 99 th percentile) according to BMI curves, age and gender [25–27]. The adolescents were non-smokers and non-drinkers and did not perform regular physical activity.

Exclusion criteria were: a) a history of prematurity, b) weight more than 100kg (as this exceeded equipment's manufacturer recommendations for bone densitometry measures), c) long-term therapy with corticosteroids, d) use of supplemental calcium and/or iron in the last 12 months prior to data collection, e) presence of diabetes mellitus, congenital or acquired bone disease, gastrointestinal disease, a history of renal disease, endocrine disorders, precocious or delayed puberty, f) chronic medication use, g) use of hormonal contraceptives, and h) being or having been pregnant. Dietary exclusion criteria were the consumption of an exclusive high-fiber vegetarian diet with a fiber content above age-appropriate recommendations [> 26 g/day for female adolescents or > 31 g/day for male

adolescents (9–13 years) and >26 g/day for females or >38 g/day for males (14–18 years)] [28], caffeine intake >300 mg/day (>3 cups of coffee per day) [29–31], and lack of daily consumption of dairy products.

To evaluate skeletal maturation, bone age was obtained by the GP method [32], in which the hand and wrist radiographs were compared to the atlas. The adolescents were then submitted to bone densitometry by DXA (Hologic QDR 4500 Discovery A, Hologic, Inc., Bedford, MA). The bone mass results were analyzed with appropriate pediatric software and the bone mineral content (BMC) results are expressed as gram and as density in g/cm². Measurements were taken in the L1–L4 lumbar spinal region and total proximal femur, including the femoral neck, trochanteric and intertrochanteric regions, subtotal body (whole body less head), and whole body (to obtain total BMC, BMD, and whole-body composition) [33,34].

Blood collection

Blood samples were collected by venous puncture and centrifuged for 15 minutes at 1,500 g for the separation of serum. The serum samples were stored at -70 °C until the time of analysis of the biomarkers [bone alkaline phosphatase (BAP), osteocalcin, and carboxy-terminal telopeptide (S-CTx)]. BAP and osteocalcin were measured using an assay from Metra™ Biosystems (San Diego, CA, USA), with intra- and interassay coefficients of variation of 8% and 7.6%, respectively. S-CTx was quantified by electroimmuno-chemiluminescence (ECLIA) using the Elecsys beta-Cross Laps serum assay in an automated Elecsys device (Roche™, Indianapolis, IN, USA). The interassay coefficient of variation was 5%.

Statistical analysis

The quantitative variables were submitted to descriptive analysis and are reported as the mean, standard deviation and median. Quantitative variables showing a normal distribution were compared between groups by analysis of variance (ANOVA) with simple classification, followed by the Tukey test.

For the remaining analyses, female adolescents were grouped according to bone age (BA) into four groups: BA1, 10 to 11 years; BA2, 12 to 13 years; BA3, 14 to 15 years, and BA4, 16 to 19 years. Male adolescents were grouped into three age

groups: BA1, 10 to 12 years; BA2, 13 to 15 years, and BA3, 16 to 19 years. To adjust for chronological age (CA), all adolescents were subdivided into three groups: 10 to <13 years; 13 to <16 years, and >16 years. Bone age was used to verify interference of this variable in the groups, avoiding that a possible difference found would not only be a casual effect.

The variables BAP, osteocalcin and S-CTx showed an asymmetrical distribution. The GENMOD procedure of the SAS for Windows v.9.2 program was used for the comparison between groups stratified by sex, applying a generalized linear model with gamma distribution. Multiple comparisons were done using the same procedure through the DIFF option of the same program (Wald test).

The associations between the bone biomarkers (BAP, osteocalcin, and S-CTx) and lean mass (LM), fat mass (FM), body fat percentage (BF%), BMI, BMC and BMD were evaluated using Pearson's correlation test. The same associations were obtained stratifying by sex.

In all tests, the level of significance was set at 5% or the corresponding p-value was used.

Results

Among the 391 adolescents participating in the study, 158 (40.4%) were classified based on BMI as eutrophic, 82 (20.97%) as overweight, 105 (26.85%) as obese, and 46 (11.78%) as extremely obese; 208 (53.19%) were females and 183 (46.81%) were males.

The mean CA and BA of the adolescents were calculated according to the classification of nutritional status based on BMI. The mean CA or BA did not differ significantly between nutritional groups in either girls or boys. Advancement of mean BA over mean CA was observed in all nutritional groups according to sex (Table 1).

The anthropometric and nutritional characterization of the adolescents according to CA and BA is shown in Table 2. In both genders, significant differences in weight and BMI were observed between all nutritional groups according to CA and BA. There was no significant difference in height when adjusted for CA or BA. The mean values of LM, FM and BF% are also shown. In most adolescent boys and girls, the mean values increased from the eutrophic to the extremely obese state and the differences were significant ($p < 0.01$). With respect to LM, no significant differences

were observed between obese and extremely obese adolescents, but the amount of fat in gram and BF% differed significantly between all nutritional groups in boys and girls($p<0.01$).

Table 3 shows the analysis of the bone biomarkers (BAP, osteocalcin, and S-CTx) in male and female adolescents with excess weight according to bone age. In girls, the three biomarkers showed a similar evolution, with higher values in the 10 to 12-year and 12 to 13-year age groups, which correspond to the period of maximum acceleration of growth when the peak height velocity (PHV) occurs. In boys, the mean levels of the three biomarkers were higher in the 13 to 15-year age group, a period corresponding to the PHV in boys.

Analysis of the three biomarkers according to nutritional classification, sex and age group showed no significant differences between the biomarkers of overweight, obese or extremely obese adolescents.

When the same analysis was performed in adolescent boys (Table 4), significant differences were only observed in mean S-CTx levels for the age groups between 10-12 and 13-15 years, with higher levels in overweight and obese adolescents of the 10 to 12-year group and between obese and extremely obese adolescents in the 13 to 15-year group.

Table 5 compares the bone biomarkers (BAP, osteocalcin, and S-CTx) between male and female adolescents classified based on BMI as eutrophic and excess weight according to BA group. In girls, significant differences in BAP were observed between eutrophic adolescents and adolescents with excess weight in the 10 to 11-year (BA1), 12 to 13-year (BA2) and 16 to 19-year (BA4) groups, but not in the 14 to 15-year (BA3) group. Regarding osteocalcin, differences between eutrophic and excess weight adolescents were observed in the 14 to 15-year (BA3) and 16 to 19-year (BA4) groups. Finally, analysis of the evolution of S-CTx showed differences between eutrophic and excess weight adolescents only in the older age group (16 to 19 years, BA4).

When the same analysis was performed in male adolescents, significant differences in BAP between eutrophic and excess weight adolescents were only observed in the 13 to 15-year (BA2) group. In contrast, differences in osteocalcin between eutrophic and excess weight adolescents occurred in the 16 to 19-year (BA3) group. Analysis of the evolution of S-CTx revealed differences between eutrophic and excess weight adolescents in the 13 to 15 -year (BA2) and 16 to 19-

year (BA3) groups.

Table 6 shows the Pearson correlations of bone biomarkers with the nutritional variables and densitometry parameters for the final sample of adolescents of both genders with excess weight. In girls, significant negative correlations were observed between LM, FM and BF% and each of the three bone biomarkers, i.e., the higher BF% and FM, the lower the concentrations of BAP, osteocalcin and S-CTx. Furthermore, BMI and lumbar spine, femoral, subtotal body and total body BMC and BMD were negatively and significantly correlated with each of the three bone biomarkers.

In contrast, no correlations between LM or FM and the three biomarkers were observed in boys, except for BF%, which was significantly correlated with osteocalcin. However, a significant negative correlation was found between BMC (lumbar spine, subtotal body and total body) and BMD (lumbar spine and total body) and BAP and S-CTx. Osteocalcin only showed a significant negative correlation with lumbar spine BMC.

Discussion

The bone markers showed evolving concentrations that accompanied the growth curves of the adolescents. This behavior may be considered to occur in parallel to the acceleration and deceleration of growth typical of this phase of life, although in highly adverse nutritional conditions such as increasing FM and body fat percentage among adolescents. The same evolution of bone biomarkers has been demonstrated by our research group in studies evaluating eutrophic male and female adolescents [17,19,20,35].

In adolescents, CA is often considered to be imprecise and the use of BA and evaluation of pubertal events is therefore a sensitive alternative for comparison between them [17]. In this respect, advancement of mean BA over mean CA occurred in boys and girls in all nutritional groups. This observation has also been made in the specialized literature for girls [36-39], but controversies exist for boys [40]. Recently, Vandewalle al. [41], studying obese adolescents, observed advancement of BA over CA in obese male adolescents when compared to eutrophic boys, results confirmed in our study.

We found higher BAP, osteocalcin and S-CTx levels in the age groups that

contained the PHV in the total sample of adolescents with excess weight. In girls, this period comprised the age of 10 to 13 years, which would correspond to the years of maximum acceleration of growth. In Brazilian girls, the PHV occurs at 11.3 years and is followed by growth deceleration. However, in the case of boys, studies have shown that the PHV occurs at about 13.3 years, an age present in the second age group, 13 to 15 years, in which the mean levels of the three biomarkers were also higher when compared to the other age groups. Thus, an important association exists between PHV and peak bone mineral content velocity. Evidence indicates sexual dimorphism in PHV, which is observed about 2 years earlier in girls than in boys [42].

With respect to bone mass accrual, Vatanparast and Whiting [43] found that peak bone mineral content velocity occurs on average 0.7 years after PHV and is clearly related to the maturation of adolescents. It is known that in girls half the total calcium content is incorporated during puberty, while this process occurs faster in boys, with half to two-thirds of total calcium content being acquired until the end of puberty [17,19,20,35,44-47].

Our study found no significant differences in the biomarkers of bone remodeling between overweight, obese and extremely obese female adolescents in the different age groups proposed. On the other hand, in boys, differences were observed for S-CTx in the early age groups (10 to 12 years), with higher mean values that indicate greater bone resorption in overweight and obese adolescents, and in the 13 to 15-year age group, with higher values in obese and extremely obese adolescents. Our results support the observations of Dimitri et al. [22] who found no increase in another marker of bone formation, procollagen type 1 amino-terminal propeptide (P1NP), in 52 excessively obese children and adolescents, but observed an increase in mean S-CTx levels in the obese group compared to eutrophic subjects when adjusted for pubertal stage and sex [22,48].

These findings raise the hypothesis that factors other than excessive body fat, such as some hormones, influence bone mass in adolescents [49,50]. Thus, the influence resulting from the onset of puberty associated with increased fat mass would be another possible explanation for the increase in markers of bone remodeling during this phase of life. Puberty is characterized by the process of physical maturation, with long-term effects on health. It has been demonstrated in recent years that excessive adiposity or alterations in body composition exert important and decisive effects on the physical development of adolescents. In this

respect, adolescents with excess weight, specifically during the prepubertal phase, exhibit greater growth velocity and advanced bone age which, however, result in no beneficial effect on final height gain [51].

Furthermore, some adipokines (cytokines) secreted by adipose tissue are being investigated because they play an important role in growth regulation within the context of obesity. Among these adipokines, leptin is specifically interesting because it is involved in the onset and progression of puberty and is highly correlated with the amount of body fat and because of the hypothesis of an association between obesity and impaired GH secretion described in girls, as highlighted by Leonibus et al. [51]. In contrast, in boys with adequate weight for age, serum leptin declines after the onset of puberty due to higher lean mass acquisition, returning to normal levels at about 30 to 40 months after this phase [52-55].

It is also known that elevated leptin concentrations can have a negative impact on bone metabolism in obese children and adolescents based on the fact that elevated concentrations accelerate the process of bone resorption and reduce bone formation. The consequences are alterations in the bone microstructure of these individuals and an increased fracture risk [22,56,57].

However, these results are still contradictory and inconclusive since the serum concentrations of adipokines can be affected by multiple factors such as age, sex, race, smoking, presence of diseases (diabetes), hormone levels, and physical activity. In this respect, despite adjustment for age, sex and other variables, all studies have their limitations that could influence the results obtained regarding alterations in microarchitecture and the observation of bone fractures [58,59]. Within this context, studies using rats have shown the existence of an endocrine pathway between bone and energy homeostasis and that, in addition to traditional functions, bone also serves as an endocrine organ that can produce osteocalcin, influencing mechanisms of insulin release, sensitivity and resistance [57, 58, 60, 61].

The concentrations of BAP were significantly higher in girls with excess weight compared to their eutrophic counterparts in almost all age groups. The same was observed for osteocalcin and S-CTx, but only in the more advanced age groups. This increase in S-CTx can again be explained by the chronic inflammatory response caused by excess weight, in which inflammatory cytokines produced by adipose tissue, including IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α , induce a process called osteoclastogenesis. These cytokines are notoriously elevated in obese individuals,

causing greater bone resorption and consequently decreasing bone mass accrual in these obese adolescents during puberty [49,62-66].

In contrast, in boys, BAP concentration were significantly higher in adolescents with excess weight only in the 13 to 15-year age group. On the other hand, osteocalcin and S-CTx levels were significantly lower in boys with excess weight compared to eutrophic adolescents, but in the more advanced age groups. The latter fact suggests lower bone formation in these individuals. The same trend has been reported by Viljakainen et al. [58].

In an attempt to clarify the possible effects of excess body fat on the variables related to bone formation and resorption, significant negative correlations between FM (g) and BF% and the three bone biomarkers were observed in girls, i.e., the higher FM and BF%, the lower the levels of BAP, osteocalcin and S-CTx. With respect to osteocalcin, the results confirmed literature data on this bone marker [67,68], showing that the higher excess weight, the lower the level of osteocalcin. It is noted again that the authors of some of the studies analyzed did not investigate the evolution of other biomarkers of bone formation (BAP) or bone resorption (S-CTx) nor did they perform a more detailed analysis according to age group as done in the present study. Differently, no correlations between LM or FM and the three biomarkers were observed in boys, except for BF%, which was positively and significantly correlated with osteocalcin.

Lower serum osteocalcin concentrations have been observed in postmenopausal obese women when compared to non-obese women and may indicate a metabolic risk of this group. Furthermore, overweight and obese adults exhibited lower total, carboxylated and non-carboxylated osteocalcin concentrations than adults with adequate weight [69-71]. Polgreen et al. [69] proposed that the higher the frequency of cardiovascular risk factors, the lower the concentrations of osteocalcin. Despite this possibility, it is questionable whether the relationship between osteocalcin and BMI is dependent on bone tissue or is related to fat tissue since the latter is also able to produce and secrete osteocalcin [72]. It should be noted that the role of osteocalcin in the regulation of body fat and lipid profile is not well established and further studies are needed [73].

Subsequently, negative and significant correlations were observed between BMI, BMC and BMD of the lumbar spine, femur, subtotal body and total body and each of the three bone biomarkers. When the same analysis was performed for boys,

all correlations were negative and significant between the variables of bone evaluation and S-CTx and between most of the variables and BAP. However, the same was not observed for osteocalcin, emphasizing that the higher the values of BMD and BMC, the lower the levels of some of the biomarkers analyzed.

The findings of the present study are important for the scientific community since they recommend the use of more than one biomarker of bone remodeling to better detect the effects of excess weight on longitudinal growth and bone mineral accrual, because the sensitivity and predictive values of individual markers remain inconclusive. The evaluation of the evolution of two biomarkers of bone formation (BAP and osteocalcin) and one marker of bone resorption (S-CTx) in female and male adolescents according to nutritional status and age group revealed the difficulty in interpreting these markers in response to a period of major biological transformations faced by the participants. By interpreting the evolution of bone markers, it was possible to observe the events of bone formation and resorption through the measurement of these markers. However, unfortunately, the results do not permit to distinguish their activity between the phases of bone growth, modeling and remodeling. Furthermore, the markers only represent an average of all of these events that occur simultaneously during this period of life, with different velocities at different skeletal sites [74-78].

In view of these observations and inferences, we suggest these to be mechanisms of protection developed by the organism to cope with this metabolically serious situation characterized by the high prevalence and different degrees of obesity in individuals who are still in the phase of growth and physical development, in an attempt to preserve their bone mass now and later in life.

Conclusion

Our results showed that excess body fat can have a negative impact on the evolution of biomarkers of bone remodeling in female adolescents, since the higher the body fat percentage and fat mass, the lower the levels of these markers. Regarding BMC and BMD, which are measures of bone mass incorporation, an inversely proportional relationship was observed, i.e., the higher BMC and BMD, the lower the levels of the biomarkers analyzed.

Given the above, the evolution of the biomarkers of bone remodeling

accompanied the growth curves. Markers of both bone formation and resorption are elevated in the first years of adolescence in boys and girls and decrease significantly with increasing age, i.e., nutritional imbalances by excess do not seem to offer any additional benefits for bone formation during this phase of life.

Table 1. Chronological age (CA) and bone age (BA) of male and female adolescents according to BMI.

		BMI				P
		Eutrophic (n=72)	Overweight (n=53)	Obese (n=62)	Extremely obese (n=21)	
Female						
	CA (years)	13.64 ^a ± 2.76	14.42 ^a ± 2.41	13.66 ^a ± 2.44	13.49 ^{a±} 1.65	0.050
Male						
	CA (years)	13.48 ^a ± 2.53	14.05 ^a ± 2.01	13.76 ^a ± 1.92	13.73 ^a ± 1.92	0.753
		BMI				P
		Eutrophic (n=72)	Overweight (n=53)	Obese (n=62)	Extremely obese (n=21)	
Female						
	BA (years)	14.39 ^a ± 2.61	14.94 ^a ± 2,41	14.53 ^a ± 2,26	14.40 ^a ± 2,17	0.794
Male						
	BA (years)	13.98 ^a ± 2,68	14.74 ^a ± 2,51	14.41 ^{a±} 1,87	14.56 ^a ± 1,26	0.550

BMI, Body Mass Index; CA, Chronological Age; BA, Bone Age.

Same letters indicate no significant differences among groups (eutrophics, overweight, obese and extremely obese). ANOVA followed by Tukey Test.

Table 2. Characterization of male and female adolescents according to nutritional status (mean standard deviation), adjusted for chronological age (CA), and bone age (BA).

Variables	Female (n=208)				P	P
	Eutrophic (n=72)	Overweight (n=53)	Obese (n=62)	Extremely obese (n=21)	(CA)	(BA)
Weight (kg)	47.74±9.57 ^{aA}	59.59±9.61 ^{bB}	71.28±13.19 ^{cC}	88.89±17.09 ^{dD}	0.0001	0.0001
Height (m)	1.56±0.10 ^{aA}	1.58±0.08 ^{aA}	1.58±0.07 ^{aA}	1.57±0.05 ^{aA}	0.4915	0.5275
BMI (kg/m ²)*	19.35±2.45 ^{aA}	23.72±1.71 ^{bB}	28.45±3.79 ^{cC}	36.00±6.02 ^{dD}	0.0001	0.0001
Lean mass (g)	31820.48±5715.62 ^{bB}	37974.13± 5482.44 ^{aA}	43649.20±7428.82 ^{dAC}	49140.79± 4824.06 ^{dAC}	0.0001	0.0001
Fat mass (g)	13732.60±4864.02 ^{aA}	19962.32 4824.5 ^{bB}	26351.65±6613.80 ^{cC}	35386.46 6811.09 ^{dD}	0.0001	0.0001
BF (%)**	28.49±5.07 ^{aA}	32.98±4.31 ^{bB}	36.65±4.06 ^{cC}	40.86±4.11 ^{dD}	0.0001	0.0001
Variables	Male (n=183)				P	P
	Eutrophic (n=86)	Overweight (n=29)	Obese (n=43)	Extremely obese (n=25)	(CA)	(BA)
Weight (kg)	50.62±12.22 ^{aA}	62.91±13.26 ^{bB}	75.53±13.25 ^{cC}	87.04±7.95 ^{dD}	0.0001	0.0001
Height (m)	1.63±0.12 ^{aA}	1.64±0.12 ^{aA}	1.64±0.10 ^{aA}	1.63±0.06 ^{aA}	0.9761	0.0788
BMI (kg/m ²)*	18.73±2.55 ^{aA}	23.11±1.72 ^{bB}	27.76±2.78 ^{cC}	33.48±2.73 ^{dD}	0.0001	0.0001
Lean mass (g)	38161.72±10413.12 ^{bB}	45614.87±11804.59 ^{aA}	50284.30±10102.04 ^{aCA}	52679.58±657.62 ^{aA}	0.0001	0.0001
Fat mass (g)	8535.58±2668.21 ^{bB}	16211.66±4590.15 ^{dD}	23778.60 4915.22 ^{cC}	31822.86±6459.29 ^{aA}	0.0001	0.0001
BF (%)**	18.56±4.77 ^{aB}	26.41±6.61 ^{bC}	31.55±5.18 ^{aA}	36.18±6.05 ^{dA}	0.0001	0.0001

BMI, Body Mass Index; BF, body fat percentage; CA, Chronological Age; BA, Bone Age.

Different letters indicate significant differences among groups (eutrophics, overweight, obese and extremely obese).

Same letters indicate no significant differences among groups (eutrophics, overweight, obese and extremely obese).

Lower Letters – compared by CA. Capital Letters compared by BA.

ANOVA followed by Tukey Test.

Table 3. Bone biomarkers (BAP, OC, S-CTx) of male and female adolescents with excess weight (n = 233) according to bone age.

Bone Biomarkers										
Female (n=136)		BAP (U/L)			OC (ng/mL)			S-CTx (ng/mL)		
Age	n	mean	SD	median	mean	SD	median	mean	SD	median
10-11	10	16.46	33.64	165.85	37.85	11.61	35.88	1.56	0.41	1.55
12-13	38	163.16	55.42	161.50	31.88	16.61	31.65	1.51	0.45	1.48
14-15	28	75.63	40.29	58.51	22.51	12.68	20.79	0.97	0.37	0.93
16-19	60	58.73	50.64	47.38	16.40	9.21	14.05	0.71	0.26	0.66
Male (n=97)										
10-12	8	166.53	52.22	172.62	26.67	10.73	25.99	1.78	0.49	1.86
13-15	64	186.10	73.24	190.52	34.27	15.40	30.93	1.77	0.49	1.77
16-19	25	88.85	43.19	84.50	23.28	11.99	19.99	1.08	0.36	1.09

BAP, Bone Alkaline Phosphatase; OC, Osteocalcin; S-CTx, Carboxy-Terminal Telopeptide.
Age groups according to bone Age (BA).

Table 4. Mean, standard deviation and median of the bone biomarkers (BAP, OC, S-CTx) in female and male adolescents with excess weight according to nutritional status (BMI) and age group.

Female (n=208)														
Overweight (n=53)					Obese (n=62)				Extremely obese (n=21)					
BAP (U/L)														
Age	n	mean	SD	median	n	mean	SD	median	n	mean	SD	median	Total	P
10-11	4	167.67	33.83	165.86	5	161.71	40.44	167.31	1	150.59	-	150.58	10	0.895
12-13	18	162.50	62.59	159.57	14	158.30	46.29	162.72	6	176.48	59.63	161.87	38	0.84
14-15	8	80.84	41.26	74.69	15	68.29	40.61	53.97	5	89.03	43.22	72.30	28	0.571
16-19	23	52.63	32.62	41.77	28	65.37	64.94	51.60	9	49.65	18.19	41.56	60	0.271
OC (ng/mL)														
10-11	4	43.28	13.78	35.98	5	35.74	11.77	36.04	1	32.11	-	32.11	10	0.551
12-13	18	32.87	19.44	29.85	14	31.41	12.57	31.17	6	29.98	18.37	34.53	38	0.946
14-15	8	28.83	12.30	26.54	15	19.46	14.16	17.38	5	20.32	4.74	20.24	28	0.346
16-19	23	17.67	10.85	13.52	28	16.72	8.66	14.98	9	13.05	7.49	9.92	60	0.374
S-CTx (ng/mL)														
10-11	4	1.48	0.61	1.28	5	1.61	0.38	1.63	1	1.63	-	1.63	10	0.897
12-13	18	1.60	0.46	1.52	14	1.39	0.40	1.48	6	1.50	0.53	1.50	38	0.462
14-15	8	0.98	0.29	0.89	15	0.90	0.32	0.93	5	1.16	0.64	1.06	28	0.443
16-19	23	0.73	0.30	0.72	28	0.72	0.25	0.66	9	0.62	0.20	0.57	60	0.457
Male (n=183)														
Overweight (n=29)					Obese (n=43)				Extremely obese (n=25)					
BAP (U/L)														
Age	n	mean	SD	median	n	mean	SD	median	n	mean	SD	median	Total	P
10-12	3	199.72	32.60	199.72	3	145.65	23.40	133.50	2	164.64	103.39	164.65	8	0.471
13-15	15	201.26	105.27	146.19	30	182.66	65.91	195.38	19	181.59	61.67	178.36	64	0.776
16-19	11	96.37	53.78	82.48	10	74.76	27.06	78.33	4	105.49	51.15	127.55	25	0.366
OC (ng/mL)														
10-12	3	30.68	6.62	30.68	3	24.42	15.58	20.01	2	26.03	10.65	26.04	8	0.807
13-15	15	29.66	17.58	28.01	30	34.67	14.58	32.06	19	36.60	15.36	31.07	64	0.502
16-19	11	23.10	11.92	23.14	10	19.27	6.44	16.68	4	32.67	18.45	36.13	25	0.164
S-CTx (ng/mL)														
10-12	3	2.19 ^A	0.44	2.19	3	1.92 ^A	0.13	1.92	2	1.24 ^B	0.24	1.24	8	0.008
13-15	15	1.40 ^B	0.44	1.30	30	1.84 ^A	0.46	1.81	19	1.89 ^A	0.47	1.78	64	0.008
16-19	11	1.08	0.36	1.10	10	1.00	0.25	0.97	4	1.24	0.60	1.36	25	0.554

BAP, Bone Alkaline Phosphatase; OC, Osteocalcin; S-CTx, Carboxy-Terminal Telo peptide.

Multiple comparison using PROC GENMOD from SAS program.

Different letters indicate significant differences among groups (overweight, obese and extremely obese) at 5%.

Same letters indicate no significant differences among groups (overweight, obese and extremely obese) at 5%.

Age groups according to bone Age (BA).

Table 5. Bone biomarkers (BAP, OC, S-CTx) of eutrophic and excess weight female and male adolescents according to age group.

Female (n=208)							
BAP (U/L)							
Eutrophic (n=72)				Excess weight (n=136)			
Age group	n	mean	SD	n	mean	SD	P
BA ₁	12	108.59 ^B	31.41	10	162.46 ^A	33.64	0.039
BA ₂	16	114.91 ^B	42.15	38	163.16 ^A	55.42	0.017
BA ₃	15	66.54 ^A	33.13	28	75.63 ^A	40.29	0.383
BA ₄	29	34.17 ^B	13.62	60	58.73 ^A	50.64	0.001
OC (ng/mL)							
BA ₁	12	47.69	26.66	10	37.85	11.61	0.381
BA ₂	16	23.19	19.55	38	31.88	16.61	0.199
BA ₃	15	8.98 ^B	6.35	28	22.51 ^A	12.68	0.001
BA ₄	29	5.85 ^B	3.47	60	16.40 ^A	9.21	0.001
S-CTx (ng/mL)							
BA ₁	12	1.85	0.58	10	1.56	0.41	0.292
BA ₂	16	1.38	0.78	38	1.51	0.45	0.416
BA ₃	15	0.77	0.23	28	0.97	0.37	0.052
BA ₄	29	0.52 ^B	0.20	60	0.71 ^A	0.26	0.001
Male (n=183)							
BAP (U/L)							
Eutrophic (n=86)				Excess weight (n=97)			
Age group	n	mean	SD	n	mean	SD	P
BA ₁	16	111.42	42.41	8	166.53	52.22	0.054
BA ₂	44	151.47 ^B	71.10	64	186.10 ^A	73.24	0.036
BA ₃	26	89.85	49.67	25	88.85	43.19	0.937
OC (ng/mL)							
BA ₁	16	30.02	9.15	8	26.67	10.73	0.579
BA ₂	44	37.86	15.20	64	34.27	15.40	0.275
BA ₃	26	31.69 ^A	16.69	25	23.28 ^B	11.93	0.027
S-CTx (ng/mL)							
BA ₁	16	1.68	0.24	8	1.78	0.49	0.671
BA ₂	44	2.01 ^A	0.57	64	1.77 ^B	0.49	0.044
BA ₃	26	1.87 ^A	0.87	25	1.08 ^B	0.36	0.001

BAP, Bone Alkaline Phosphatase; OC, Osteocalcin; S-CTx, Carboxy-Terminal Telopeptide.

BA₁=10-11 anosBA₂=12-13 anosBA₃=14-15 anosBA₄=16-19 anos.

Different letters indicate significant differences among groups (eutrophic and overweight).

Same letters indicate no significant differences among groups (eutrophic and overweight).

Age groups according to bone Age (BA).

Eutrophic: BA₁=BA₂>BA₃>BA₄.Overweight: BA₁=BA₂>BA₃>BA₄.

Table 6. Pearson correlation between bone biomarkers (BAP, OC, S-CTx) and body mass index, lean mass, fat mass, body fat percentage, bone mineral content and bone mineral density evaluated at four sites in the final sample of female and male adolescents with excess weight.

	Female (n=136)			Male (n=97)		
	BAP (U/L)	OC (ng/mL)	S-CTx (ng/mL)	BAP (U/L)	OC (ng/mL)	S-CTx (ng/mL)
BMI (kg/m ²)	-0.392 (<0.001)	-0.398 (<0.001)	-0.441 (<0.001)	-0.172 (0.085)	-0.001 (0.999)	-0.055 (0.590)
LM (g)	-0.498 (<0.001)	-0.446 (<0.001)	-0.497 (<0.001)	-0.200 (0.050)	-0.181 (0.078)	-0.197 (0.058)
FM (g)	-0.461 (<0.001)	-0.449 (<0.001)	-0.431 (<0.001)	-0.001 (0.996)	0.132 (0.201)	0.045 (0.668)
BF (%)	-0.204 (0.016)	-0.259 (0.002)	-0.189 (0.028)	0.072 (0.478)	0.216 (0.031)	0.135 (0.190)
BMC-Spine (g/cm ²)	-0.587 (<0.001)	-0.467 (<0.001)	-0.554 (<0.001)	-0.358 (0.001)	-0.216 (0.031)	-0.321 (0.001)
BMC-Femur (g/cm ²)	-0.452 (<0.001)	-0.352 (<0.001)	-0.445 (<0.001)	-0.137 (0.175)	-0.114 (0.259)	-0.110 (0.282)
BMC-Subtotal (g/cm ²)	-0.565 (<0.001)	-0.452 (<0.001)	-0.547 (<0.001)	-0.299 (0.003)	-0.115 (0.258)	-0.278 (0.006)
BMC-Total (g/cm ²)	-0.596 (<0.001)	-0.462 (<0.001)	-0.573 (<0.001)	-0.243 (0.016)	-0.061 (0.551)	-0.253 (0.013)
BMD-Spine (g/cm ²)	-0.59645 (<0.001)	-0.458 (<0.001)	-0.553 (<0.001)	-0.390 (<0.001)	-0.117 (0.247)	-0.360 (0.003)
BMD-Femur (g/cm ²)	-0.505 (<0.001)	-0.396 (<0.001)	-0.487 (<0.001)	-0.178 (0.077)	-0.123 (0.2223)	-0.246 (0.015)
BMD-Subtotal (g/cm ²)	-0.581 (<0.001)	-0.431 (<0.001)	-0.540 (<0.001)	-0.342 (0.006)	-0.137 (0.178)	-0.383 (0.001)
BMD-Total (g/cm ²)	-0.629 (<0.001)	-0.432 (<0.001)	-0.581 (<0.001)	-0.387 (<0.001)	-0.128 (0.207)	-0.459 (<0.001)

BAP, Bone Alkaline Phosphatase; OC, Osteocalcin; S-CTx, Carboxy-Terminal Telopeptide; BMI, Body Mass Index; LM, Lean Mass; FM, Fat Mass; BF (%), body fat percentage; BMC, Bone Mineral Content; BMD, Bone Mineral Density.
Pearson correlation Test.

References

- [1] Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.*2007; 92: 1640-46.
- [2] National osteoporosis foundation: Strong voices for strong bones. Washington, DC: Available from:<http://www.nof.org/files/nof/public/content/file/63/upload/49.pdf> (cited 01 March 2013).
- [3] Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.*2002; 46: 72-8.
- [4] Seibel MJ. Bone turnover in nutrition-related disorders markus. *Wien Med Wochenschr.* 2007; 24: 582–8.
- [5] Giacaglia LR, Martin RM, Silva RAL. Terapia nutricional em doenças ósseas. In: Silva SMC, Mura JDP. *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.* 2ª edição. São Paulo: Roca; 2011. 813-28.
- [6] Liu Y, Song CY, Wu SS, Liang QH, Yuan LQ, Liao EY. Novel adipokines and bone metabolism. *Int J Endocrinol.*2013; 1-9.
- [7] Hyun WL, Sang YK, Kim AY, Eun JL, Choi JY, Jae BK. Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. *StemCells.*2009; 27: 2254–62.
- [8] Huang CY, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, Tang HC. Adiponectin increases BMP-2 expression in osteoblasts via AdipoR receptor signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2010; 224: 475–83.
- [9] Luo E et al. Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits. *Acta Biomater.*2012; 8: 734–43.

- [10] Zhang H et al. Relationships between serum adiponectin, apelin, leptin, resistin, visfatin levels and bone mineral density, and bone biochemical markers in postmenopausal Chinese women. *J Endocrinol Invest.*2010; 33: 707–11.
- [11] Wu N, Wang QP, Li H, Wu XP, Sun ZQ, and X. H. Luo. Relationships between serum adiponectin, leptin concentrations and bone mineral density, and bone biochemical markers in chinese women. *Clin Chim Acta.*2010; 411: 771–75.
- [12] Rhie YJ, Lee KH, Chung SC, Kim HS, Kim DH. Effects of body composition, leptin, and adiponectin on bone mineral density in prepubertal girls. *J Korean Med Sci.* 2010; 25: 1187–90.
- [13] Iida T, Domoto T, Takigawa A., et al. Relationships among blood leptin and adiponectin levels, fat mass, and bone mineral density in japanese pre- and postmenopausal women. *Hiroshima J Med Sci.* 2011; 60: 71–8.
- [14] Mosca LN, Silva VN, Goldberg TBL. Does excess weight interfere with bone mass accumulation during adolescence? *Nutrients.*2013; 5: 2047-61.
- [15] Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, Bono S, Ginty F, Goldberg GR. Symposium on 'Nutrition and health in children and adolescents'. Session 1: Nutrition in growth and development. Nutrition and bone growth and development. *Proc Nutr Soc.* 2006; 65: 348–60.
- [16] Yilmaz D et al. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers and growth parameters. *J Bone Miner Metab.*2005; 23: 476–82.
- [17] Silva CC, Goldberg TBL, Nga HS, Kurokawa CS, Capela RC, Teixeira AS, Dalmas JC. Impact of skeletal maturation on bone metabolism biomarkers and bone mineral density in healthy Brazilian male adolescents. *J Pediatr.* 2011; 87: 450-60.
- [18] Silva CC, Kurokawa CS, Nag HS, Moretto MR, Dalmas JC, Goldberg TB. Bone metabolism biomarkers, body weight, and bone age in healthy Brazilian male

adolescents. *J Pediatr Endocrinol*. 2012; 25: 479-84.

[19] Goldberg TBL, Fortes CMT, Kurokawa CS, Silva CC, Moretto MR, Nunes HRDC. Relationship between bone age and pubertal breast stage to bone biomarkers and bone mineral density in healthy brazilian female adolescents. *Arch Dis Child*. 2012; 97(2): 126.

[20] Fortes CMT. Densidade mineral óssea de adolescentes do sexo feminino e suas relações com biomarcadores ósseos [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2012.

[21] Rauchenzauner M et al. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 2: 443–49.

[22] Dimitri P, Wales JK, Bishop N. Adipokines, bone-derived factors and bone turnover in obese children; evidence for altered fat-bone signalling resulting in reduced bone mass. *Bone*. 2011; 48: 189–96.

[23] Mosca LN, Lederer Goldberg TB, Nóbrega da Silva V, da Silva CC, Kurokawa CS, Bisi Rizzo AC, Corrente JE. Excess body fat negatively affects bone mass in adolescents. *Nutrition*. 2014; 30: 847-52.

[24] Frisancho AR. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. University of Michigan; 1990.

[25] Center of Disease Control and Prevention [CDC]. National Center for health statistics CDC Growth Charts 2000. United States. [Documento online]. Disponível em <URL: http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens_bmi/about_child_rensbmi.html#What%20is%20BMI> [acesso em 14 jul 2012].

[26] Freedman DS, Mei Z, Srinivasan SS, Brenson GS, Dietz WH. Cardiovascular risk factors and excess adiposity among overweight children and adolescents: The Bogalusa Heart Study. *J Pediatr*. 2007; 150: 12-17.

[27] Barlow SE and the Expert Committee. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *pediatrics*.2007; 120: 164-92.

[28] Institute of Medicine (IOM). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). Washington DC: National Academies Press; 2005.

[29] Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr*.2001; 74: 694-700.

[30] Fitzpatrick L, Heaney RP. Got soda? *J Bone Miner Res*. 2003; 18: 1570-2.

[31] McGartland C, Robson PJ, Murray L, et al. Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: the northern ireland young hearts project. *J Bone Mineral Res*. 2003; 18: 1563-9.

[32] Greulich W, Pyle S. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist; 1959.

[33] Lima F, Falco V, Baima J, Carazzato JG, Pereira RMR. Effect of impact load and active load on bone metabolism and body composition of adolescent athletes. *MedSci Sports Exerc*.2001; 33: 18-23.

[34] Vicente RG. How does exercise affect bone development during growth? *Sports Méd*.2006; 36: 561-9.

[35] Moretto MR, Silva CC, Kurokawa CS, Fortes CM, Capela RC, Teixeira AS, Dalmas JC, Goldberg TB. Bone mineral density in healthy female adolescents according to age, bone age and pubertal breast stage. *Open Orthop J*. 2011; 5: 324-30.

- [36] Adami F, Vasconcelos FAG. Obesidade e maturação sexual precoce em escolares de Florianópolis – SC. Ver Bras Epidemiol. 2008; 11: 549-60.
- [37] Kaplowitz, PB. Link between body fat and the timing of puberty. Pediatrics. 2008; 3: 208-1.
- [38] Wagner IV et al. Effects of obesity on human sexual development. Nat Rev Endocrinol. 2012; 8: 246- 54.
- [39] Biro FM, Pinney SM, Huang B, Baker ER, Chandler DW, Dorn LD. Hormone Changes in Peripubertal Girls. J Clin Endocrinol Metab. 2014; 99: 3829–35.
- [40] Condorelli RA et al. The gonadal function in obese adolescents: review. J Endocrinol Invest. 2014; 37: 1133–42.
- [41] Vandewalle S et al. Sex steroids in relation to sexual and skeletal maturation in obese male adolescents. J Clin Endocrinol Metab. 2014; 8: 2977–85.
- [42] Colli AS. Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiras. Maturação sexual. São Paulo: Editora Brasileira de Ciências, 1988.
- [43] Vatanparast H, Whiting SJ, Adolescence, the optimum time to maximize bone mass through calcium & vitamin D. University of Saskatchewan, College of Pharmacy and Nutrition. The Whitehall-Robins Report. 2005; 14.
- [44] Lloyd, T, Rollings, N, Andon, MB, et al. Determinants of bone density in young women. I. Relationships among pubertal development, total body bone mass, and total body bone density in premenarchal females. J Clin Endocrinol Metab. 1992; 375:83.
- [45] Magarey, AM, Boulton, TJ, Chatterton, BE, et al. Bone growth from 11 to 17 years: relationship to growth, gender and changes with pubertal status including timing of menarche. Acta Paediatr 1999; 88:139.

- [46] Yilmaz D et al. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers and growth parameters. *J Bone Miner Metab.*2005; 23: 476–82.
- [47] Rauchenzauner M et al. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab.*2007; 2: 443–9.
- [48] Tenta R et al. Osteoprotegerin and nuclear factor-kappaB ligand are associated with leptin and adiponectin levels, in apparently healthy women. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2010; 10: 174-9
- [49] Radetti G, Franceschi R, Adami S, Longhi S, Rossini M, Gatti D. Higher circulating parathormone is associated with smaller and weaker bones in obese children. *Calcif Tissue Int.* 2014; 95: 1–7.
- [50] Foo JP, Polyzos SA, Anastasilakis AD, Chou S, Mantzoros CS. The effect of leptin replacement on parathyroid hormone, RANKL-osteoprotegerin axis, and wntin hibitors in young women with hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: E2252–E8.
- [51] Leonibus CD, Marcovecchio ML, Chiarelli F. Update on statural growth and pubertal development in obese children.*Pediatric Reports.* 2012; 4e35: 119-26.
- [52] Ahima, RS et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.*1996; 382: 250-2.
- [53] Matkovic et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab.*1997; 82: 3239-45.
- [54] Biro FM, Kirkland JL, Middleman AB, Duryea Teresa, Hoppin AG. Normal puberty. Wolters Kluwer Health. 2010. 1-27. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/normal-puberty?topicKey=PEDS/584>. Acesso em 03/02/2016.

- [55] Maskin de Jensen A, López M, Mir C, Martínez M, Ibañez de Pianesi M, Erhard M. Niveles séricos de leptina y su relación con la excreción de sodio en niños y adolescentes obesos. *Rev argent endocrinol metab.* 2011;48: 127-35.
- [56] Dimitri et al. Leptin may play a role in bone microstructural alterations in obese children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 100: 594-602.
- [57] Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19: 161-6.
- [58] Viljakainen H et al. Suppressed Bone Turnover in Obesity: A link to energy metabolism? A Case-Control Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: 2155–63.
- [59] Wang Jing-Wen, Tang Qing-Ya, Ruan Hui-Juan, Cai W. Relation between serum osteocalcin levels and body composition in obese children. *JPGN.* 2014; 58: 729–32.
- [60] Paldánus PM et al. The effect of oral glucose tolerance test on serum osteocalcin and bone turnover markers in young adults. *Calcif Tissue Int.* 2012; 90: 90-5.
- [61] Lieben L, Callewaert F, Bouillon R. Bone and Metabolism: A complex crosstalk. *Horm Res*, 2009;71:134–8.
- [62] Takayanagi T et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 integrate RANKL signaling in the terminal differentiation of osteoclasts. *DevCell.* 2002; 3: 889–01.
- [63] Kudo O, Fuzikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNF/IL-1) induction of human osteoclast formation. *J Pathol.* 2002; 198: 220–27.
- [64] Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL6, leukemia inhibitory

factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of RANKL, osteoprotegerin, RANK in mouse calvariae. *J Immunol.*2002; 169: 3353–62.

[65] Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprostheticosteolysis. *J Orthop Res.* 2002; 21: 73–80.

[66] Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res.*2011; 6: 1-7.

[67] Reinehr T, Roth CL. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *Int J Obes (Lond).* 2010; 34: 852-8.

[68] Kim GS, Jekal Y, Kim HS, Im JA, Park JY, Chu SH. Reduced serum total osteocalcin is associated with central obesity in Korean children. *Obes Res Clin Pract.*2013; 8: 230-37.

[69] Polgreen LE, Jacobs DR Jr, Nathan BM, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity (Silver Spring).*2012; 20: 2194–01.

[70] Ferron M et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell.*2010; 142: 296–08.

[71] Abseyi N, Şıklar Z, Berberoğlu M, Hacıhamdioğlu B, Erdevi SS, Öçal G. Relationships between osteocalcin, glucose metabolism, and adiponectin in obese children: is there crosstalk between bone tissue and glucose metabolism? *J Clin Res PediatrEndocrinol.*2012; 4: 182-88.

[72] Dubnov-Raz G, Ish-Shalom S, Chodick G, Rozen GS, Giladi A, Constantini NW. Osteocalcin is independently associated with body mass index in adolescent girls. *Pediatric Obesity.*2012; 7: 313–18.

[73] Garcia-Martín A, Cortes-Berdonces M, Luque-Fernandez I, Rozas-Moreno P,

Quesada-Charneco M, Munoz-Torres M. Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause*.2011; 18: 537-41.

[74] Creighton DL, Morgan AL, Boardley D, Brolinson PG. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. *J Appl Physiol*. 2001; 90: 565–70.

[75] van der Sluis IM, Hop WC, van Leeuwen JPTM, et al. A cross-sectional study on biochemical parameters of bone turnover and vitamin D metabolites in healthy Dutch children and young adults. *Horm Res*. 2002; 57: 170–79.

[76] Jürimäe J, Mäestu J, Jürimäe T. Bone turnover markers during pubertal /development: relationships with growth factors and adipocytokines. *Med Sport Sci*. 2010; 55: 114-27.

[77] Jürimäe J. Interpretation and application of bone turnover markers in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr*.2010; 22: 494–00.

[78] Walsh JS, Henry YM, Fatayerji D, Eastell R. Hormonal determinants of bone turnover before and after attainment of peak bone mass. *ClinEndocrinol*.2010; 72, 320-27

7 Referências consultadas

Abseyi N, Şıklar Z, Berberoğlu M, Hacıhamdioğlu B, Erdeve SS, Öçal G. Relationships Between Osteocalcin, Glucose Metabolism, and Adiponectin in Obese Children: Is there Crosstalk Between Bone Tissue and Glucose Metabolism? *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2012; 4: 182-88.

Adami F, Vasconcelos FAG. Obesidade e maturação sexual precoce em escolares de Florianópolis – SC. *Rev Bras Epidemiol*. 2008; 11: 549-60.

Ahima, RS et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*.1996; 382: 250-52.

Bae et al. The association between serum osteocalcin levels and metabolic syndrome in Koreans. *Osteoporos Int*. 2011; 22: 2837-46.

Barlow SE and the Expert Committee. Expert Committee Recommendations Regarding the Prevention, Assessment, and Treatment of Child and Adolescent Overweight and Obesity: Summary Report. *Pediatrics*.2007; 120: 164-92.

Biro FM, Kirkland JL, Middleman AB, Duryea Teresa, Hoppin AG. Normal Puberty. Wolters Kluwer Health. 2010. 1-27. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/normal-puberty?topicKey=PEDS/584>. Acesso em 03/02/2016.

Biro FM, Pinney SM, Huang B, Baker ER, Chandler DW, Dorn LD. Hormone Changes in Peripubertal Girls. *J Clin Endocrinol Metab*.2014; 99: 3829–35.

Bonofiglio D, Maggiolini M, Catalano S, Marsico S, Aquila S, Ando S. Bone mineral density is inversely related to parathyroid hormone in adolescent girls. *Horm Metab Res*. 2001; 33: 170–74.

Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res*.2011; 6: 1-7.

Carter LM, Whiting SJ, Drinkwater DT, Zello GA, Faulkner RA, Bailey DA. Self-reported calcium intake and bone mineral content in children and adolescents. *J Am Coll Nutr*. 2001; 20: 502–09.

Center of Disease Control and Prevention [CDC]. National Center for health statistics CDC Growth Charts 2000. United States. [Documento online]. Disponível em <URL:http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens_bmi/about_child_rensbmi.html#What%20is%20BMI> [acesso em 14 jul 2012].

Colli AS. Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiras. Maturação sexual. São Paulo: Editora Brasileira de Ciências, 1988(17).

Condorelli RA et al. The gonadal function in obese adolescents: review. J Endocrinol Invest. 2014; 37: 1133–42.

Creighton DL, Morgan AL, Boardley D, Brolinson PG. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. J Appl Physiol. 2001; 90: 565–70.

Dimitri P, Wales JK, Bishop N. Adipokines, bone-derived factors and bone turnover in obese children; evidence for altered fat-bone signalling resulting in reduced bone mass. Bone.2011; 48: 189–96.

Dimitri et al. Leptin may play a role in bone microstructural alterations in obese children. J Clin Endocrinol Metab.2014; 100: 594-602.

Dimitri P, Wales JK, Bishop N. Adipokines, bone-derived factors and bone turnover in obese children; evidence for altered fat-bone signalling resulting in reduced bone mass. Bone.2011; 48: 189-96.

Dubnov-Raz G, Ish-Shalom S, Chodick G, Rozen GS, Giladi A, Constantini NW. Osteocalcin is independently associated with body mass index in adolescent girls. Pediatric Obesity.2012; 7: 313–18.

Endres DB, Rude RK. Mineral and bone metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER. Tietz.Clin Chem Lab Med. 5ed. 2001; 795-21.

Fares JE, Choucair M, Nabulsi M, Salamoun M, Shahine CH, Fuleihan GE. Effect of gender, puberty, and vitamin D status on biochemical markers of bone remodeling.Bone.2003; 33: 242-47.

Ferron M et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. Cell.2010; 142: 296–08.

Fitzpatrick L, Heaney RP. Got soda? J Bone Miner Res. 2003; 18: 1570-2.

Fonseca JS, Martins GA. Curso de Estatística. 6.ed. São Paulo: Atlas, 1996.

Foo JP, Polyzos SA, Anastasilakis AD, Chou S, Mantzoros CS. The Effect of Leptin Replacement on Parathyroid Hormone, RANKL-Osteoprotegerin Axis, and WntInhibitors in Young Women With Hypothalamic Amenorrhea. J Clin Endocrinol Metab. 2014; 99: E2252–E2258.

Fortes CMT et al. Relationship between chronological and bone ages and pubertal stage of breasts with bone biomarkers and bone mineral density in adolescents. *J. Pediatr. (Rio J.)*[online]. 2014; 90: 624-31.

Fortes CMT. Densidade mineral óssea de adolescentes do sexo feminino e suas relações com biomarcadores ósseos [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2012.

Freedman DS, Mei Z, Srinivasan SS, Brenson GS, Dietz WH. Cardiovascular risk factors and excess adiposity among overweight children and adolescents: The Bogalusa Heart Study. *J Pediatr.*2007; 150: 12-17.

Frisancho AR. Antropometric standards for the assement of growth and nutritional status. University of Michigan; 1990.

Garcia-Martin A, Cortes-Berdonces M, Luque-Fernandez I, Rozas-Moreno P, Quesada-Charneco M, Munoz-Torres M. Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause.* 2011; 18: 537-41.

Giacaglia LR, Martin RM, Silva RAL. Terapia nutricional em doenças ósseas. In: Silva SMC, Mura JDP. Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. 2ª edição. São Paulo: Roca; 2011. 813-28.

Goldberg TBL, Fortes CMT, Kurokawa CS, Silva CC, Moretto MR, Nunes HRDC. Relationship between Bone Age and Pubertal Breast Stage to Bone Biomarkers and Bone Mineral Density in Healthy Brazilian Female Adolescents. *Arch Dis Child*.2012; 97(2): 126.

Goldberg TBL. Modelação e remodelação óssea e suas relações com os eventos pubertários [tese livre docência]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina; 2006.

Greulich W, Pyle S. Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist; 1959.

Huang CY, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, Tang HC. Adiponectin increases BMP-2 expression in osteoblasts via AdipoR receptor signaling pathway.*J Cell Physiol*. 2010; 224: 475–83.

Hyun WL, Sang YK, Kim AY, Eun JL, Choi JY, Jae BK. Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells.*StemCells*.2009; 27: 2254–62.

Iida T, Domoto T, Takigawa A., et al. Relationships among blood leptin and adiponectin levels, fat mass, and bone mineral density in Japanese pre- and postmenopausal women. *Hiroshima J Med Sci*. 2011; 60: 71–8.

Institute of Medicine (IOM). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). Washington DC: National Academies Press; 2005.

Jürimäe J, Mäestu J, Jürimäe T. Bone turnover markers during pubertal development: relationships with growth factors and adipocytokines. *Med Sport Sci*. 2010; 55: 114-27.

Jürimäe J. Interpretation and application of bone turnover markers in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr*.2010; 22: 494–00.

Kaplowitz, PB. Link between body fat and the timing of puberty.*Pediatrics*.2008; 3: 208-1.

Kim GS, Jekal Y, Kim HS, Im JA, Park JY, Chu SH. Reduced serum total osteocalcin is associated with central obesity in Korean children. *Obes Res Clin Pract*.2013; 8: 230-37.

Klentrou P, Ludwa IA, Falk B. Factors associated with bone turnover and speed of sound in early and late-pubertal females. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2011; 36: 707-14.

Kudo O, Fuzikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNF/IL-1) induction of human osteoclast formation. *J Pathol*. 2002; 198: 220–27.

Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab*.2008; 19: 161-66.

Leonibus CD, Marcovecchio ML, Chiarelli F. Update on statural growth and pubertal development in obese children. *Pediatric Reports*. 2012; 4e35: 119-26.

Lieben L, Callewaert F, Bouillon R. Bone and Metabolism: A Complex Crosstalk. *Horm Res*, 2009;71:134–38.

Lima F, Falco V, Baima J, Carazzato JG, Pereira RMR. Effect of impact load and active load on bone metabolism and body composition of adolescent athletes. *Med Sci Sports Exerc*.2001; 33: 18-23.

Liu Y, Song CY, Wu SS, Liang QH, Yuan LQ, Liao EY. Novel Adipokines and Bone Metabolism. *Int J Endocrinol*.2013; 1-9.

Lloyd, T, Rollings, N, Andon, MB, et al. Determinants of bone density in young women. I. Relationships among pubertal development, total body bone mass, and total body bone density in premenarchal females. *J Clin Endocrinol Metab.*1992; 375:83.

Luo E et al. Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits. *Acta Biomater.*2012; 8: 734–43.

Magarey, AM, Boulton, TJ, Chatterton, BE, et al. Bone growth from 11 to 17 years: relationship to growth, gender and changes with pubertal status including timing of menarche. *Acta Paediatr* 1999; 88:139.

Maskin de Jensen A, López M, Mir C, Martínez M, Ibañez de Pianesi M, Erhard M. Niveles séricos de leptina y su relación con la excreción de sodio en niños y adolescentes obesos. *Rev argent endocrinol metab.* 2011; 48: 127-35.

Matkovic et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab.*1997; 82: 3239-45.

McGartland C, Robson PJ, Murray L, et al. Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: The Northern Ireland Young Hearts Project. *J Bone Mineral Res.* 2003; 18: 1563-9.

Moretto MR, Silva CC, Kurokawa CS, Fortes CM, Capela RC, Teixeira AS, Dalmas JC, Goldberg TB. Bone Mineral Density in Healthy Female Adolescents According to Age, Bone Age and Pubertal Breast Stage. *Open Orthop J.* 2011; 5: 324-30.

Mosca LN, Lederer Goldberg TB, Nóbrega da Silva V, da Silva CC, Kurokawa CS, Bisi Rizzo AC, Corrente JE. Excess body fat negatively affects bone mass in adolescents. *Nutrition.*2014; 30: 847-52.

Mosca LN, Silva VN, Goldberg TBL. Does Excess Weight Interfere with Bone Mass Accumulation during Adolescence? *Nutrients.*2013; 5: 2047-61.

National Osteoporosis Foundation: Strong voices for strong bones. Washington, DC: Available from: <http://www.nof.org/files/nof/public/content/file/63/upload/49.pdf> (cited 01 March 2013).

Official positions of the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) on DXA evaluation in children and adolescents. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25: 37–47.

Official positions of the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) on Dual-energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the revised 2013 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom.* 2014; 2: 225-42.

Paldánus PM et al. The Effect of Oral Glucose Tolerance Test on Serum Osteocalcin and Bone Turnover Markers in Young Adults. *Calcif Tissue Int.* 2012; 90: 90-5.

Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of RANKL, osteoprotegerin, RANK in mouse calvariae. *J Immunol.* 2002; 169: 3353–2.

Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 827-32.

Polgreen LE, Jacobs DR Jr, Nathan BM, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. Association of Osteocalcin With Obesity, Insulin Resistance, and Cardiovascular Risk Factors in Young Adults. *Obesity (Silver Spring).* 2012; 20: 2194–01.

Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, Bono S, Ginty F, Goldberg GR. Symposium on 'Nutrition and health in children and adolescents'. Session 1: Nutrition in growth and development. Nutrition and bone growth and development. *Proc Nutr Soc.* 2006; 65: 348–60.

Radetti G, Franceschi R, Adami S, Longhi S, Rossini M, Gatti D. Higher Circulating Parathormone is Associated with Smaller and Weaker Bones in Obese Children. *Calcif Tissue Int.* 2014; 95: 1–7.

Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74: 694-700.

Rauchenzauner M et al. Sex- and Age-Specific Reference Curves for Serum Markers of Bone Turnover in Healthy Children from 2 Months to 18 Years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 2: 443–49.

Reinehr T, Roth CL. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *Int J Obes (Lond).* 2010; 34: 852-8.

Rhie YJ, Lee KH, Chung SC, Kim HS, Kim DH. Effects of body composition, leptin, and adiponectin on bone mineral density in prepubertal girls. *J Korean Med Sci.* 2010; 25: 1187–90.

Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res.* 2002; 21: 73–80.

Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46: 72-78.

Seibel MJ. Bone turnover in nutrition-related disorders Markus. *Wien Med Wochenschr.* 2007; 24: 582–88.

Silva CC, Goldberg TBL, Nga HS, Kurokawa CS, Capela RC, Teixeira AS, Dalmas JC. Impact of skeletal maturation on bone metabolism biomarkers and bone mineral density in healthy Brazilian male adolescents. *J Pediatr.* 2011; 87: 450-60.

Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. Bone Mineralization in Brazil adolescents: the years of maximum bone mass incorporation. Arch Latino am Nutr. 2007; 57: 118-24.

Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. Mineralização óssea em adolescentes do sexo masculino: anos críticos para a aquisição da massa óssea. J Pediatr. 2004; 80: 461-67.

Silva CC, Kurokawa CS, Nag HS, Moretto MR, Dalmas JC, Goldberg TB .Bone metabolism biomarkers, body weight, and bone age in healthy Brazilian male adolescents. J Pediatr Endocrinol. 2012; 25: 479-84.

Takayanagi T et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 integrate RANKL signaling in the terminal differentiation of osteoclasts. Dev Cell. 2002; 3: 889–01.

Williams CL, Bollella M, Wynder EL. A new recommendation for dietary fiber in childhood. Pediatrics. 1995; 96: 985-8.

Tenta R et al. Osteoprotegerin and nuclear factor-kappaB ligand are associated with leptin and adiponectin levels, in apparently healthy women. J Musculo skeletal Neuronal Interact. 2010; 10: 174-79.

van der Sluis IM, Hop WC, van Leeuwen JPTM, et al. A cross-sectional study on biochemical parameters of bone turnover and vitamin D metabolites in healthy Dutch children and young adults. Horm Res. 2002; 57: 170–79.

Vandewalle S et al. Sex Steroids in Relation to Sexual and Skeletal Maturation in Obese Male Adolescents. J Clin Endocrinol Metab. 2014; 8: 2977–2985.

Vatanparast H, Whiting SJ, Adolescence, the optimum time to maximize bone mass through calcium & vitamin D. University of Saskatchewan, College of Pharmacy and Nutrition. The Whitehall-Robins Report. 2005; 14.

Vicente RG. How does exercise affect bone development during growth? *Sports Méd.*2006; 36: 561-9.

Viljakainen H et al. Suppressed Bone Turnover in Obesity: A Link to Energy Metabolism? A Case-Control Study. *J Clin Endocrinol Metab.*2014; 99: 2155–63.

Wagner IV et al. Effects of obesity on human sexual development. *Nat Rev Endocrinol.*2012; 8: 246- 54.

Walsh JS, Henry YM, Fatayerji D, Eastell R. Hormonal determinants of bone turnover before and after attainment of peak bone mass. *Clin Endocrinol .*2010; 72, 320-27.

Wang Jing-Wen, Tang Qing-Ya, Ruan Hui-Juan, Cai W .Relation Between Serum Osteocalcin Levels and Body Composition in Obese Children. *JPGN.*2014; 58: 729–32.

Wu N, Wang QP, Li H, Wu XP, Sun ZQ, and X. H. Luo. Relationships between serum adiponectin, leptin concentrations and bone mineral density, and bone biochemical markers in Chinese women. *Clin Chim Acta.*2010; 411: 771–5.

Yilmaz D et al. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers and growth parameters. *J Bone Miner Metab.*2005; 23: 476–82.

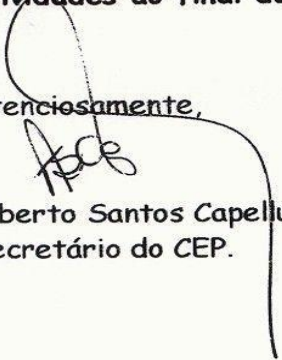
Zhang H et al. Relationships between serum adiponectin, apelin, leptin, resistin, visfatin levels and bone mineral density, and bone biochemical markers in postmenopausal Chinese women. *J Endocrinol Invest.*2010; 33: 707–11.

Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 1640-46.

Anexos

Anexo 1

8.1 Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP)

 Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br		 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997
Botucatu, 01 de junho de 2.009		OF. 190/2009-CEP
Ilustríssima Senhora Profª Drª Tamara Beres Lederer Goldberb Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu. Prezada Drª. Tamara , De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto: (Protocolo CEP 3208-2009) "Densidade mineral óssea de adolescentes sobrepesos e obesos: o impacto do excesso de gordura corporal sobre a mineralização óssea", a ser conduzido por Luciana Nunes Mosca, orientada por Vossa Senhoria, com a participação de Cilmary Suemi Kurokawa, Carla Cristiane da Silva, Altamir Santos Teixeira, José Carlos Dalma, recebeu parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 01/06/2009. Situação do Projeto: APROVADO. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto. Atenciosamente,  Alberto Santos Capelluppi Secretário do CEP.		



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: smolina@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 23 de Junho de 2015

OF. 77/2015-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Adjunta Tamara Beres L. Goldberg
Departamento de Pediatria da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo SIPE 3208-2009) **"Densidade mineral óssea de adolescentes sobrepesos e obesos: o impacto do excesso de gordura corporal sobre a mineralização óssea"** aprovado por este CEP em 01/06/2009 foi dividido em 2 partes à saber:

Projeto I - (Protocolo SIPE 3208-2009- A) "Densidade mineral óssea de adolescentes sobrepeso, obesos e superobesos: o impacto do excesso de gordura corporal sobre a massa óssea" foi conduzido por Luciana Nunes Mosca, sobre orientação da Profª Adjunta Tamara Beres L. Goldberg, o qual resultou em **Dissertação de Mestrado** conforme **Relatório Final de Atividades** apresentado pelos pesquisadores.

Projeto II - (Protocolo SIPE 3208-2009- B) "O impacto do excesso de gordura corporal sobre a remodelação óssea de adolescentes" está sendo conduzido por Luciana Nunes Mosca, sobre orientação da Profª Adjunta Tamara Beres L. Goldberg, o qual resultará em **Tese de Doutorado**.

Atenciosamente,


Profª Drª Silvana Andréa Molina Lima
Coordenadora do CEP.

Anexo 2

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu **Luciana Nunes Mosca**, aluna especial de mestrado desta Universidade, convido-o (a) para participar da seguinte pesquisa científica:

I – DADOS SOBRE A PESQUISA:

1. Título da pesquisa:		
2. Pesquisador responsável: Luciana Nunes Mosca Orientadora: Profa. Dra. Tamara Beres Lederer Goldberg, docente do Departamento de Pediatria e responsável pelo Ambulatório de Adolescente da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.		
Cargo/função: Aluna de Pós-graduação/Professora	Inscr.Cons.Regional: CRN 20.656 Nutrição	Unidade ou Departamento do Solicitante: Depto de Pediatria e Programa de Pós-graduação em GO e Mastologia da FMB-UNESP
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo). ☐ SEM RISCO ☒ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐ RISCO MAIOR		

4. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

O presente trabalho se justifica por meio das seguintes constatações: 1) embora existam alguns estudos nacionais, dos quais pelo menos dez realizados por pesquisadores da Faculdade de Medicina de Botucatu, e internacionais, para avaliar a massa óssea em indivíduos saudáveis durante a segunda década de vida, são poucas as investigações que pesquisaram o conteúdo e a densidade mineral óssea de crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. 2) Em relação a estes poucos estudos realizados, obtidos através de levantamento bibliográfico, os critérios de exclusão da amostra final não levaram em conta variáveis que poderiam interferir nos resultados observados, tais como: presença de processos inflamatórios, doenças ósseas anteriores, alterações hormonais ou doenças endócrinas, a avaliação precisa dos eventos da puberdade, a caracterização da maturidade esquelética, entre as causas que poderiam participar no acúmulo de massa óssea, bem como, não se detecta a realização de inquéritos alimentares relativos ao consumo de cálcio entre os adolescentes; 3) as avaliações relativas à massa óssea serão obtidas pelo exame chamado de Densitometria Óssea (DXA) em adolescentes com sobrepeso e obesidade. Pretende-se com a avaliação da Densidade Mineral Óssea (DMO) utilizando o

exame de Densitometria Óssea de coluna, fêmur proximal e corpo total esclarecer o possível efeito do excesso de gordura corporal sobre o ganho de massa óssea em adolescentes de 10 a 20 anos incompletos de idade, de ambos os sexos.

OBJETIVOS

1. Avaliar o conteúdo e a densidade mineral óssea de adolescentes considerados sobrepesos ou obesos na faixa de idade de 10 a 20 anos incompletos, de ambos os sexos;
2. Realizar, interpretar e correlacionar: as avaliações antropométricas, as avaliações dos caracteres sexuais secundários, as idades ósseas através de radiografia da mão e punho, os exames de Densitometria Óssea para avaliação da massa óssea, os inquéritos e consumo alimentar, os marcadores bioquímicos de remodelação óssea de adolescentes voluntários sobrepesos e obesos;
3. Investigar o impacto do excesso de gordura corporal sobre a mineralização óssea dos adolescentes.

5. Procedimentos que serão utilizados:

Avaliação Corporal: serão medidos o peso e a altura dos adolescentes. Estes dados serão utilizados para fazer o cálculo do IMC (índice de massa corporal) classificando-os de acordo com seu peso e altura em: baixo peso, normal, com sobrepeso ou obesos. Será realizado também exame geral e específico dos adolescentes, para que qualquer alteração física possa ser encontrada aplicando o exame de avaliação dos caracteres sexuais secundários como: desenvolvimento das mamas (meninas), dos genitais (meninos) e dos pêlos pubianos (meninas e meninos). Este exame será realizado por um profissional especializado. **Radiografia de Mão e Punho:** será feita para avaliar a idade óssea (IO) dos adolescentes e o seu grau de maturação esquelética através de uma fotografia do punho. **Avaliação do Conteúdo Mineral Ósseo e da Densidade Mineral Óssea:** os adolescentes que cumprirem todas as etapas anteriores irão fazer uma avaliação da quantidade de massa óssea através de um exame chamado Densitometria Óssea, onde serão fotografadas as regiões da coluna lombar, das pernas (osso do fêmur total) e corpo total. Ressalta-se que a quantidade de radiação a que os adolescentes serão expostos são consideradas seguras e sem prejuízo para sua saúde atual e futura. Estes exames (Idade óssea e Densitometria Óssea) serão realizados na Clínica Tomocentro, uma vez que o Prof^o responsável pela clínica faz parte da equipe de pesquisa que desenvolverá este projeto. **Inquérito Alimentar:** a avaliação alimentar será realizada por meio do registro alimentar de 3 dias. Este será entregue na primeira consulta. Serão fornecidos explicações e detalhes do preenchimento do registro nesta oportunidade, incluindo a necessidade do preenchimento do mesmo em dias alternados, ou seja, o adolescente deverá recordar o que comeu durante dois dias durante a semana e um dia da alimentação do fim de semana. Os adolescentes deverão anotar todos os alimentos e as preparações consumidas, na forma de medidas caseiras e de preferência colocar a marca do produto, quando possível. Isto tudo para descobrir a quantidade de energia (kcal), carboidratos (açúcar), proteínas, gorduras e cálcio (mg) contidos na alimentação diária. **Coleta de sangue:** serão coletados 10 mL de sangue total com agulhas descartáveis e sistema de coleta a vácuo por profissional treinada, lotada no Laboratório Experimental da Pediatria do Hospital das Clínicas de Botucatu, após avaliação médica, durante o período de 8:00 às 9:00h, após jejum noturno de pelo menos dez horas, para observação dos marcadores de remodelação óssea em soro.

6. Desconfortos e riscos esperados:

Para que participem deste trabalho, os adolescentes e seus responsáveis serão voluntários e os interessados assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido, uma vez estando cientes do conteúdo do projeto, de seus benefícios à sua saúde e sabendo que se retirarem seu consentimento para esta participação, não sofrerão qualquer prejuízo em seu acompanhamento de saúde. Todos os procedimentos serão realizados em horários que não conflitem com seu período de frequência à atividade escolar. Como já apresentado detalhadamente em outros Projetos aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), desde 2002, os exames em questão: idade óssea e DXA, não ocasionam qualquer desconforto e não incorrem em risco aos pacientes. Quanto à coleta sanguínea, existe um pequeno desconforto, porém a profissional que a realizará tem experiência e saberá como contornar a situação.

7. Benefícios que poderão ser obtidos:

Os benefícios estão relacionados aos conhecimentos obtidos pela pesquisa, uma vez que quase que de imediato os adolescentes e seus responsáveis ficarão cientes sobre os resultados de sua avaliação óssea, recebendo de forma gratuita os resultados da idade óssea, da Densitometria Óssea que expressarão a qualidade atual e as possibilidades futuras do ganho de massa óssea.

8. Métodos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

Não há outros procedimentos alternativos que possam avaliar o conteúdo mineral ósseo, bem como a perda de massa óssea.

9. Duração da pesquisa:

4 anos após a aprovação do comitê de ética, sendo que os 2 primeiros serão utilizados para a realização da Dissertação de Mestrado.

A aprovação do CEP será elaborado em 2 vias, sendo 1 entregue á mim e o outro será mantido em arquivo pelo pesquisador. Assim, concordo voluntariamente em participar deste estudo e declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para participação neste estudo.

Local, e data .

Assinatura do Adolescente

_____, _____ de _____ de _____

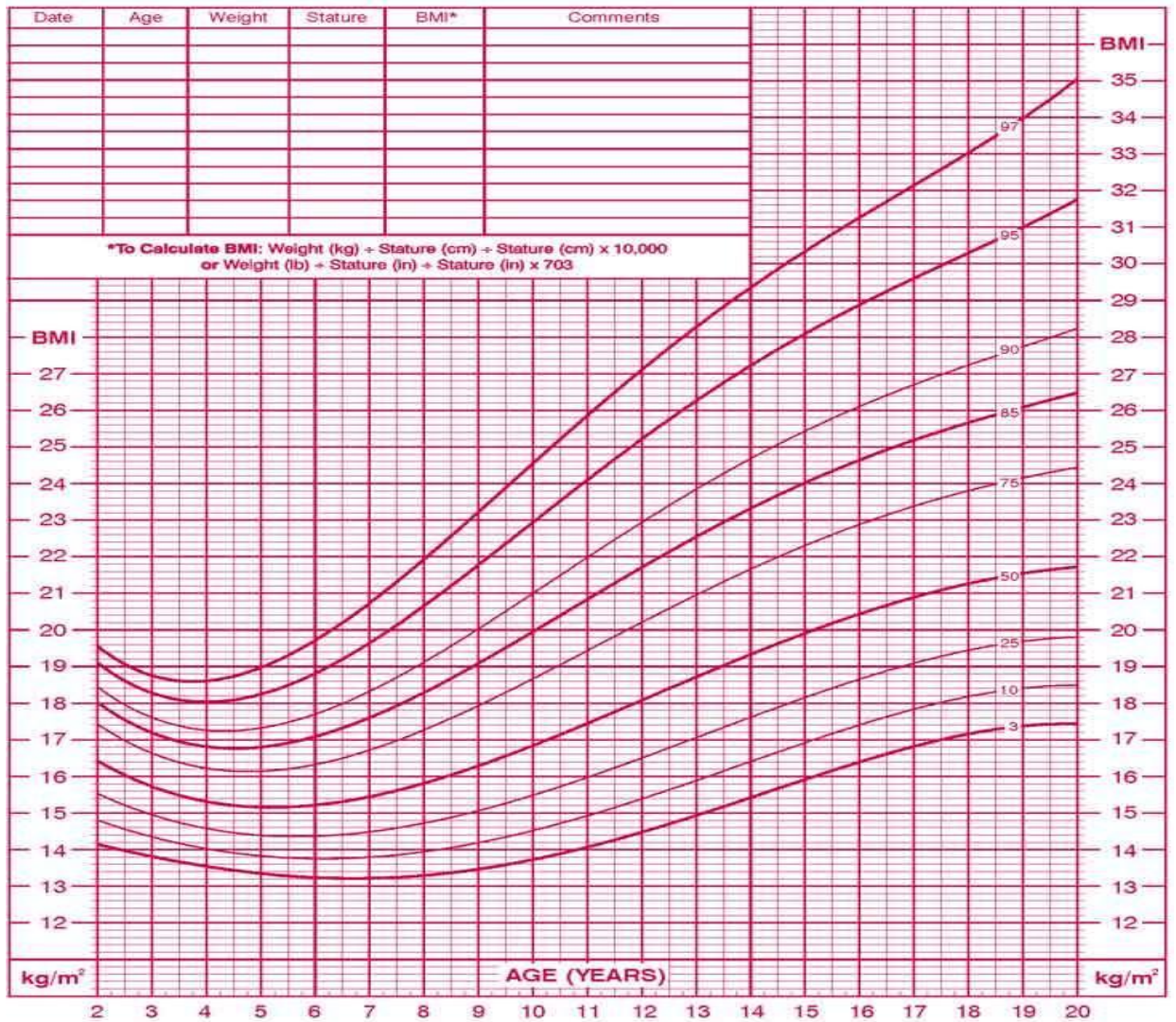
Assinatura do Responsável pelo Adolescente

Assinatura do Pesquisador

2 to 20 years: Girls
Body mass index-for-age percentiles

NAME _____

RECORD # _____



Published May 30, 2000 (modified 10/16/00).

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>



SAFER • HEALTHIER • PEOPLE™

Anexo 4

8.4 Comprovante de envio para publicação

Elsevier Editorial System(tm) for Bone
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: The impact of excess body fat on bone remodeling in adolescents

Article Type: Full length article

Keywords: Adolescents; Bone Mineral Content; Bone Mineral Density; Obesity; Bone Remodeling; Osteocalcin.

Corresponding Author: Prof. Tamara Beres Lederer Goldberg, M.D., Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Botucatu School of Medicine/ São Paulo State University (UNESP)

First Author: Luciana N Mosca, M.Sc.

Order of Authors: Luciana N Mosca, M.Sc.; Tamara Beres Lederer Goldberg, M.D., Ph.D.; Valéria N da Silva, M.Sc.; Cilmary S Kurokawa, M.Sc., Ph.D.; Anapaula C Bisi Rizzo, M.D., M.Sc.; Carla C da Silva, M.Sc., Ph.D.; Altamir dos S Teixeira, M.D., M.Sc.; José E Corrente, Ph.D.

Abstract: Excess weight and osteoporosis are serious public health problems. The aim of this study was to investigate the impact of excess body fat on bone remodeling in overweight, obese and extremely obese adolescents by bone densitometry and by measuring biomarkers of bone formation and resorption. Body weight, height and body mass index (BMI) were determined in 391 adolescents aged 10 to 20 years. The participants were classified as eutrophic, overweight, obese, and extremely obese. Bone age was obtained and bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) were evaluated in the lumbar spine, proximal femur, and total and subtotal body. Blood samples were collected for evaluation of the following bone biomarkers: osteocalcin, bone alkaline phosphatase (BAP), and serum carboxy-terminal telopeptide (S-CTX). Analysis of variance followed by the Tukey test was used for comparison between groups. A generalized linear model with gamma distribution was applied to compare the groups stratified by sex and Pearson's correlation test to evaluate associations between the three bone biomarkers and lean mass (LM), fat mass (FM), body fat percentage (BF%), BMI, BMC and BMD ($p < 0.05$). In girls with excess weight, the concentrations of the biomarkers were higher in the 10 to 13-year age group and no significant differences were observed between groups according to nutritional status. In boys with excess weight, the mean levels of the markers were higher in those aged 13 to 15 years. According to nutritional status, significant differences were only observed in mean S-CTX for the age groups between 10-12 and 13-15 years, with higher levels in overweight and obese adolescents aged 10-12 years and between obese and extremely obese adolescents aged 13-15 years. In girls, significant negative correlations were observed between LM, FM and BF% and each of the three bone markers studied. There was no correlation between LM or FM and the three biomarkers in boys, except for BF%, which was significantly correlated with osteocalcin. The higher the fat percentage and FM in girls, the lower the levels of the biomarkers of bone remodeling,

indicating that excess body fat has a negative effect on the evolution of these markers during adolescence.

Suggested Reviewers: Paul Dimitri P.hD.
Department of Pediatric Endocrinology, Sheffield Children's NHS
Foundation Trust
paul.dimitri@sch.nhs.uk

Thomas Reinehr Prof. Dr.
Department of Pediatric Nutrition Medicine, University of Witten/Herdecke
T.Reinehr@kinderklinik-datteln.de

Susan J Whiting
Ph.D., Professor of Nutrition, College of Pharmacy and Nutrition,
University of Saskatc, University of Saskatchewan, Canada
susan.whiting@usask.ca

José M Fernández-Real M.D., Ph.D.
Department of Diabetes Endocrinology and Nutrition, Hospital de Girona
"Dr. Josep Trueta", França
jmfernandezreal.girona.ics@gencat.cat

Opposed Reviewers:

Anexo 5

8.5 Artigo Científico (publicação do mestrado)

Nutrition 30 (2014) 847–852



Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjrn.com

Applied nutritional investigation

Excess body fat negatively affects bone mass in adolescents



Luciana Nunes Mosca M.Sc.^a, Tamara Beres Lederer Goldberg M.D., Ph.D.^{a,*},
 Valéria Nóbrega da Silva M.Sc.^a, Carla Cristiane da Silva M.Sc.^b,
 Cilmary Suemi Kurokawa M.Sc., Ph.D.^c, Anapaula C. Bisi Rizzo M.Sc.^a,
 José Eduardo Corrente Ph.D.^d

^a Department of Pediatrics, Adolescent Medicine Course, Graduate Program in Gynecology, Obstetrics, and Mastology, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University, UNESP, Brazil

^b Department of Physical Education, University of North Paraná, Paraná, Brazil

^c Clinical and Experimental Pediatric Research Center, Department of Pediatrics, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil

^d Department of Statistics, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 August 2013

Accepted 7 December 2013

Keywords:

Adolescents
 Bone mineral content
 Bone mineral density
 Obesity
 Osteoporosis
 Overweight

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the effects of excess body fat on bone mass in overweight, obese, and extremely obese adolescents.

Methods: This study included 377 adolescents of both sexes, ages 10 to 19 y. Weight, height, body mass index (BMI), bone age, bone mineral content (BMC), and bone mineral density (BMD) were obtained by dual-energy x-ray absorptiometry. The results were adjusted for chronological age and bone age. Comparisons according to nutritional classification were performed by analysis of variance, followed by Tukey test. Linear regression models were used to explain the variation in BMD and BMC in the L1–L4 lumbar spinal region, proximal femur, and whole body in relation to BMI, lean mass, fat mass (FM), and body fat percentage (BF%), considering $P < 0.05$.

Results: For all nutritional groups, average bone age was higher than chronological age. In both sexes, weight and BMI values increased from eutrophic to extremely obese groups, except for BMD and BMC, which did not differ among male adolescents, and were smaller in extremely obese than in obese female adolescents ($P < 0.01$). Significant differences were observed for FM and BF% values among all nutritional groups ($P < 0.01$). Positive, moderate to strong correlations were detected between BMD and BMC for BMI, lean mass, and FM. A negative and moderate correlation was found between BMC and BF%, and between BMD and BF% at all bone sites analyzed in males and between BF% and spine and femur BMD, in females.

Conclusion: The results reveal a negative effect of BF% on bone mass in males and indicate that the higher the BF% among overweight adolescents, the lower the BMD and BMC values.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Obesity is a pathologic epidemic of the group of non-transmissible chronic diseases. It is associated with a number of comorbidities and has been a subject of great interest for researchers as well as for health agencies worldwide. Obesity may be defined as a disorder of energy metabolism that results in excessive accumulation of body fat, with serious organic and psychosocial complications [1].

Overweight in adolescence is a major concern because of the association between obesity and metabolic abnormalities. These metabolic abnormalities, which were more evident in adults until recently, lately have been found with high frequency in adolescents [2–8]. The spurt period is of great importance for bone mineral acquisition, which rises exponentially in both genders. During this period, bone formation exceeds resorption, resulting in bone modeling and remodeling [9–13]. A few years after growth is completed, bone mass continues to increase until reaching a peak. The acquired skeletal mass remains for a few years, depending on the bone region, or declines after reaching the peak [14,15]. Several factors influence bone mass gain, such as sex, ethnicity, heredity, body weight, diet (calcium content,

* Corresponding author. Tel.: +55 to 14 to 3811 to 6274; fax: +55 to 14 to 3811 to 6083.

E-mail address: tamara@fmb.unesp.br (T. B. L. Goldberg).

vitamin D intake or supplementation), frequent physical activity, and hormonal processes that influence bone mineralization. Among these factors, body weight, consisting primarily of fat mass (FM) and lean mass (LM), has been identified as a major determinant of bone mineral content (BMC). Body weight gain interferes with both the acquisition and loss of bone mass and is directly associated to the risk for overweight or obesity [16].

Because erroneous eating habits during childhood and adolescence may result in overweight, which in turn may lead to impaired peak bone mass acquisition and contribute to the increased risk for low bone mineral density (BMD) and fragility fractures in adulthood [17], understanding the effects of obesity on bone mass is extremely important. Studies have shown that the correlation between obesity and BMD may not protect against osteoporotic fractures, given the adiposity associated with the disease [18–23]. Studies of children and adolescents have yielded conflicting results regarding the relationships between FM and bone size and density [18]. It has been shown that obese children have insufficient bone mass relative to body weight and may be at increased risk for bone fractures [18]. Conversely, other studies have reported that bone mass, as assessed by BMC, is high when adjusted for height and LM of obese adolescents [24–26]. Given the lack of a consensus regarding the effect of fat on BMC and BMD, we sought to determine the effects of excess body fat on bone mass in overweight, obese, and extremely obese adolescents.

Materials and methods

Adolescents ages 10 to 19 y registered at the Adolescent Outpatient Clinic of Botucatu Medical School Clinical Hospital (SP, Brazil) were invited to participate in the study. The informed consent form was signed by the adolescent, or by their parents or guardians. The study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu Medical School (UNESP, OF.190/2009).

Anthropometric measures of weight (kg) and height (m) were obtained as previously recommended [27], and the body mass index (BMI, kg/m²) was subsequently calculated. BMI was used to classify nutritional status. Adolescents were classified into eutrophic (between the 5th and 85th percentiles), overweight (≥ 85 th and < 95 th percentiles), obese (≥ 95 th percentile), and extremely obese (> 99 th percentile), according to BMI curves, age, and sex [28,29]. Adolescents were non-smokers or non-drinkers, and did not practice regular physical activity.

Exclusion criteria were:

1. adolescents with history of prematurity;
2. weight > 100 kg (as it exceeded equipment manufacturer's recommendations for bone densitometry measures);
3. long-term therapy with corticosteroids;
4. use of supplemental calcium and/or iron in the 12 mo before data collection;
5. history of diabetes mellitus, congenital or acquired bone disease, gastrointestinal disease, history of renal disease, endocrine disorders, precocious or delayed puberty;
6. chronic use of medication;
7. use of hormone contraceptives;
8. current or past pregnancy.

Dietary exclusion criteria were:

1. an exclusively vegetarian diet;
2. high consumption of fiber [30,31];
3. failure to consume dairy products daily.

To evaluate skeletal maturation, bone age (BA) was obtained by the Greulich-Pyle method [32], in which the hand and wrist radiographs were compared with the atlas. Adolescents were then submitted to bone densitometry by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) (Hologic QDR 4500 Discovery A, Hologic Inc., Bedford, MA, USA). Bone mass results were analyzed with proper pediatric software and BMC results were expressed in g, and density in g/cm². Measurements were taken of the L1–L4 lumbar spinal region and the total proximal femur, including the femur neck, trochanteric, and intertrochanteric regions, of subtotal body

(whole body less head), and of whole-body densitometry (to obtain total BMC, BMD, and whole-body composition) [33–35].

Statistical analysis

Data were analyzed using SAS (Cary, NC, US) for Windows v.9.2. Descriptive analysis was performed for quantitative variables, and values were expressed as mean, SD, median, and minimum and maximum values. For quantitative variables with normal distribution, comparison between groups was performed by analysis of variance with simple classification, followed by the Tukey test adjusted for chronological age (CA) and bone age (BA). To adjust according to CA, adolescents were divided into three groups as follows: 10 to 13 y; 14 to 16 y; ≥ 16 y. When adjusted for BA, the groups were 10 to 12 y; 13 to 15 y; > 15 y. We considered the significance level of 5%. Linear regression models were used to explain the variation in BMD and BMC in the L1–L4 lumbar spinal region, proximal femur, and whole body with BMI, LM, FM, and body fat percentage BF%, assuming normal distribution after Shapiro-Wilk test.

Results

Among the 377 adolescents who participated in the study, 158 (41.91%) were eutrophic, 48 (12.73%) were overweight, 142 (37.67%) obese, and 29 (7.69%) extremely obese. Of these, 207 (54.91%) were female and 170 (45.09%) were male.

In each sex group, average BA was higher than CA in all nutritional groups (Table 1).

As for Tanner's criteria [36], 88% of all adolescents were in stages III to V. Interestingly, 78.5% of all female adolescents were in the final stage (IV and V) of puberty, whereas only 55% of male adolescents were in the same stage. A total of 5.2% of all females were at the initial stages (I and II) of development, whereas 20% of males were in these stages.

For female adolescents, significant differences were observed for weight and BMI among all nutritional groups, when CA and BA were considered. With respect to height, no significant difference was observed among groups, whether adjusted by CA or by BA (Table 2).

Analyzing the variables according to CA and BA, we observed that the average results increased progressively from eutrophic to extremely obese adolescents, with significant differences between groups ($P < 0.01$). No significant differences were observed between obese and extremely obese adolescents in relation to lean body mass, but differences were observed between all nutritional groups with respect to the amount of fat and the BF% ($P < 0.01$). Similar results were observed when variables related to BMD were analyzed. The average results obtained from eutrophic adolescents were significantly lower than those of overweight, obese, and extremely obese adolescents (Table 2). Conversely, average values of spine, whole-body, and subtotal body BMD, and spine, femur, and whole-body BMC were lower among extremely obese than obese female adolescents, although the differences were not statistically significant.

Table 1
Chronological and bone ages of adolescents evaluated according to BMI

	Eutrophic	Overweight	Obese	Extremely obese	P-value
Female					
n	72	28	92	15	
CA	13.64 $\pm$ 2.76	14.42 $\pm$ 2.41	13.66 $\pm$ 2.44	13.49 $\pm$ 1.65	0.05
BA	14.39 $\pm$ 2.61	14.94 $\pm$ 2.41	14.53 $\pm$ 2.26	14.40 $\pm$ 2.17	0.79
Male					
n	86	20	50	14	
CA	13.48 $\pm$ 2.53	14.05 $\pm$ 2.01	13.76 $\pm$ 1.92	13.73 $\pm$ 1.92	0.75
BA	13.98 $\pm$ 2.68	14.74 $\pm$ 2.51	14.41 $\pm$ 1.87	14.56 $\pm$ 1.26	0.54

ANOVA, analysis of variance; BA, bone age; BMI, body mass index; CA, chronological age; n, number
ANOVA followed by Tukey test

Table 2

Characterization of female adolescents according to nutritional classification, chronological age, and bone age

Variables	Nutritional status (N = 176)				P-value	
	Eutrophic (n = 72)	Overweight (n = 28)	Obese (n = 92)	Extremely obese (n = 15)	CA	BA
Weight (kg)	47.40 ± 9.57 ^{*,†}	59.59 ± 9.61 ^{‡,§}	71.28 ± 13.19 ^{¶,§}	88.89 ± 17.09 ^{¶,***}	0.01	0.01
Height (m)	1.56 ± 0.10 ^{*,†}	1.58 ± 0.08 ^{*,†}	1.58 ± 0.07 ^{*,†}	1.57 ± 0.05 ^{*,†}	0.49	0.52
BMI (kg/m ²)	19.35 ± 2.45 ^{*,†}	23.72 ± 1.71 ^{‡,§}	28.45 ± 3.79 ^{¶,§}	36.00 ± 6.02 ^{¶,***}	0.01	0.01
Lean mass (g)	31820.48 ± 5715.62 ^{‡,§}	37974.13 ± 5482.44 ^{*,†}	43649.20 ± 7428.82 ^{¶,†,§}	49140.79 ± 4824.06 ^{¶,†,§}	0.01	0.01
Fat mass (g)	13732.60 ± 4864.02 ^{*,†}	19962.32 ± 4824.5 ^{‡,§}	26351.65 ± 6613.80 ^{¶,§}	35386.46 ± 6811.09 ^{¶,***}	0.01	0.01
BF%	28.49 ± 5.07 ^{*,†}	32.98 ± 4.31 ^{‡,§}	36.65 ± 4.06 ^{¶,§}	40.86 ± 4.11 ^{¶,***}	0.01	0.01
BMD-spine (g/cm ²)	0.81 ± 0.15 ^{‡,§}	0.89 ± 0.16 ^{*,†}	0.98 ± 0.19 ^{*,†}	0.96 ± 0.14 ^{*,†}	0.01	0.01
BMD-femur (g/cm ²)	0.85 ± 0.13 ^{‡,§}	0.91 ± 0.13 ^{*,†}	0.98 ± 0.14 ^{*,†}	1.02 ± 0.17 ^{†,‡}	0.01	0.01
BMD-subtotal (g/cm ²)	-----	0.84 ± 0.09 ^{‡,§}	0.88 ± 0.09 ^{*,†}	0.88 ± 0.07 ^{*,†,‡,§}	0.01	0.04
BMD-whole body (g/cm ²)	0.93 ± 0.12 ^{‡,§}	0.95 ± 0.11 ^{*,†,‡,§}	0.99 ± 0.10 ^{*,†}	0.97 ± 0.07 ^{*,†,‡,§}	0.04	0.06
BMC-spine (g/cm ²)	41.14 ± 13.26 ^{*,§}	46.09 ± 13.15 ^{*,†,‡,§}	51.07 ± 14.29 ^{†,‡}	49.54 ± 8.22 ^{*,†,‡,§}	0.01	0.01
BMC-femur (g/cm ²)	29.46 ± 10.16 ^{*,§}	30.45 ± 6.85 ^{*,†,‡,§}	34.46 ± 7.98 ^{†,‡}	34.13 ± 6.05 ^{*,†,‡,§}	0.02	0.01
BMC-subtotal (g/cm ²)	-----	1330.81 ± 304.59 ^{‡,§}	1474.89 ± 310.49 ^{*,†}	1495.38 ± 180.49 ^{*,†,‡,§}	0.01	0.09
BMC-whole body (g/cm ²)	1584.99 ± 391.67 ^{‡,‡,‡}	1702.38 ± 365.02 ^{*,‡,§}	1857.45 ± 377.54 ^{*,†}	1842.07 ± 189.81 ^{*,†,‡,§}	0.01	0.01

ANOVA, analysis of variance; BA, bone age; BF%, body fat percentage; BMC, bone mineral content; BMD, bone mineral density; BMI, body mass index; CA, chronological age

ANOVA followed by Tukey test

*,†,‡,§ indicates no significant differences among groups (eutrophics, overweight, obese, and extremely obese) adjusted by CA.

‡,§,¶,*** indicate no significant differences among groups (eutrophics, overweight, obese, and extremely obese) adjusted by BA.

The anthropometric variables of male adolescents adjusted for CA and BA (Table 3) showed results similar to those of females. Statistical differences were found for weight and BMI among the nutritional groups, whereas height showed no significant difference among groups.

No significant differences were found among groups for BMD of spine, whole body, and subtotal body, as detected by DXA. In all groups, increased average values were observed for femur BMD, whole-body BMC, and the amount of LM. However, no statistical differences were found between overweight, obese, and extremely obese adolescents.

Average values of spine BMC were higher among overweight and extremely obese adolescents; average values of femur BMC increased progressively from eutrophic to extremely obese adolescents, but statistical differences were observed only between eutrophic and extremely obese adolescents. In contrast, subtotal body BMC was similar in all nutritional groups.

FM values, as expressed in g, were significantly different among groups. The BF% increased from eutrophic to extremely obese adolescents, however, when adjusted for BA, the values

presented by obese and extremely obese groups were not statistically different (Table 3).

In overweight females, BMD significantly correlated with the variables BMI, LM, and FM (in g) whereas correlations between BMC and the same variables were positive and moderate to strong, in all three sites evaluated. Only spine BMD and femur BMD negatively correlated with BF% (Table 4).

For overweight males, both spine and femur BMD values significantly correlated with both BMI and LM. BMC values of each of the sites evaluated correlated with BMI and LM. Negative, moderate, and significant correlations were found between BMD and the BF% and between BMC and the BF% in the three sites analyzed (Table 4).

Discussion

In this study, we investigated the effects of excess body fat on BMC and BMD in adolescents. In both male and female adolescents, the anthropometric variables such as weight and BMI showed increasing values from eutrophic to extremely obese

Table 3

Characterization of male adolescents according to nutritional classification, chronological age, and bone age

Variables	Nutritional Status (N = 170)				P-value	
	Eutrophic (n = 86)	Overweight (n = 20)	Obese (n = 50)	Extremely Obese (n = 14)	CA	BA
Weight (kg)	50.62 ± 12.22 ^{aA}	62.91 ± 13.26 ^{bB}	75.53 ± 13.25 ^{cC}	87.04 ± 7.95 ^{dD}	0.01	0.01
Height (m)	1.63 ± 0.12 ^{aA}	1.64 ± 0.12 ^{aA}	1.64 ± 0.10 ^{aA}	1.63 ± 0.06 ^{aA}	0.97	0.07
BMI (kg/m ²)	18.73 ± 2.55 ^{aA}	23.11 ± 1.72 ^{bB}	27.76 ± 2.78 ^{cC}	33.48 ± 2.73 ^{dD}	0.01	0.01
Lean mass (g)	38161.72 ± 10413.12 ^{bB}	45614.87 ± 11804.59 ^{aA}	50284.30 ± 10102.04 ^{aC}	52679.58 ± 657.62 ^{aA}	0.01	0.01
Fat mass (g)	8535.58 ± 2668.21 ^{bB}	16211.66 ± 4590.15 ^{dD}	23778.60 ± 4915.22 ^{cC}	31822.86 ± 6459.29 ^{aA}	0.01	0.01
BF%	18.56 ± 4.77 ^{aB}	26.41 ± 6.61 ^{bC}	31.55 ± 5.18 ^{cA}	36.18 ± 6.05 ^{dA}	0.01	0.01
BMD-spine (g/cm ²)	0.76 ± 0.15 ^{bA}	0.82 ± 0.18 ^{ab}	0.82 ± 0.15 ^{abA}	0.86 ± 0.11 ^{aA}	0.01	0.01
BMD-femur (g/cm ²)	0.87 ± 0.10 ^{bB}	0.97 ± 0.19 ^{abA}	0.98 ± 0.14 ^{bA}	1.04 ± 0.16 ^{aA}	0.01	0.01
BMD-subtotal (g/cm ²)	-----	0.87 ± 0.13 ^{aA}	0.86 ± 0.10 ^{aA}	0.87 ± 0.07 ^{aA}	0.53	0.64
BMD-total (g/cm ²)	0.92 ± 0.09 ^{aA}	0.96 ± 0.13 ^{aA}	0.94 ± 0.11 ^{aA}	0.95 ± 0.07 ^{aA}	0.23	0.12
BMC-spine (g/cm ²)	39.78 ± 12.55 ^{ab}	45.01 ± 18.21 ^{aA}	43.31 ± 14.37 ^{aAB}	46.70 ± 11.85 ^{aA}	0.11	0.09
BMC-femur (g/cm ²)	36.86 ± 10.34 ^{ab}	38.01 ± 14.45 ^{aAB}	39.33 ± 11.75 ^{aAB}	43.87 ± 17.22 ^{aA}	0.12	0.03
BMC-subtotal (g/cm ²)	-----	1502.17 ± 507.94 ^{aA}	1546.10 ± 368.77 ^{aA}	1608.97 ± 263.14 ^{ba}	0.40	0.64
BMC-total (g/cm ²)	1579.30 ± 432.72 ^{bB}	1869.06 ± 575.39 ^{baA}	1853.96 ± 478.36 ^{baA}	1964.57 ± 308.73 ^{aA}	0.05	0.01

ANOVA, analysis of variance; BA, bone age; BF%, body fat percentage; BMC, bone mineral content; BMD, bone mineral density; BMI, body mass index; CA, chronological age

ANOVA followed by Tukey test

Same lower letters indicate no significant differences among groups (eutrophics, overweight, obese, and extremely obese) adjusted by CA age

Same capital letters indicate no significant differences among groups (eutrophics, overweight, obese, and extremely obese) adjusted by BA age

Table 4

Pearson correlation between variables related to bone mass and BMI, lean mass, fat mass, and fat percentage for overweight adolescents, according to sex

	Spine BMD	Femur BMD	Whole-body BMD	Spine BMD	Femur BMD	Whole-body BMC
Female (n = 135)						
BMI (kg/m ²)	0.572 (<0.01)	0.591 (<0.01)	0.512 (<0.01)	0.524 (<0.01)	0.512 (<0.01)	0.546 (<0.01)
LM (g)	0.730 (<0.01)	0.691 (<0.01)	0.692 (<0.01)	0.782 (<0.01)	0.730 (<0.01)	0.813 (<0.01)
FM (g)	0.582 (<0.01)	0.535 (<0.01)	0.496 (<0.01)	0.545 (<0.01)	0.510 (<0.01)	0.593 (<0.01)
BF%	−0.400 (0.05)	−0.438 (0.03)	0.131 (0.13)	0.146 (0.10)	0.116 (0.19)	0.186 (0.03)
Male (n = 84)						
BMI (kg/m ²)	0.314 (0.03)	0.338 (0.01)	0.173 (0.11)	0.321 (0.03)	0.361 (0.08)	0.265 (0.01)
LM (g)	0.781 (<0.01)	0.758 (<0.01)	0.751 (<0.01)	0.840 (<0.01)	0.841 (<0.01)	0.768 (<0.01)
FM (g)	0.084 (0.45)	0.022 (0.84)	−0.128 (0.25)	−0.009 (0.93)	0.065 (0.55)	−0.011 (0.91)
BF%	−0.400 (0.01)	−0.438 (<0.01)	−0.580 (<0.01)	−0.513 (<0.01)	−0.405 (0.01)	−0.468 (<0.01)

BF%, body fat percentage; BMC, bone mineral content; BMD, bone mineral density; BMI, body mass index; FM, fat mass; LM, lean mass

groups, according to BA and CA. The average values of BMD and BMC of all bone sites analyzed were lower in extremely obese compared with obese female adolescents, whereas these variables did not differ among male adolescents. Values of fat content and BF%, obtained by densitometry of whole body, also increased from eutrophic to extremely obese adolescents, according to BA and CA. These results demonstrate that for both sexes, bone mass gain differed from the other anthropometric variables, as well as from the variables related to body composition, which progressively increased from eutrophic to extremely groups.

This study indicates that significant positive correlations exist between BMD, as well as BMC, and LM and FM in females. In males, the correlations of BMD and BMC are observed with LM only. For female and male adolescents, negative correlations were observed between BF% and femur and lumbar spine BMDs in females, and between BF% and BMD, as well as BMC, in all bone sites analyzed in males. These findings indicate that the higher the BF% in male adolescents with excess weight, the lower the BMD and BMC. Thus, we can infer that the bone mass of overweight, obese, and extremely obese adolescents is influenced by the BF%, highlighting the importance of evaluating BMC and BMD according to body composition. Similarly to our findings, it has been previously shown [37] that, although the bone mass of prepubertal obese children was higher than that of normal children, BMD and BMC tended to be lower in obese children, suggesting that obesity does not exert a protective effect on bone mass.

In a study that investigated the influence of body composition on bone mass, it was demonstrated that in boys, as age increases, weight, height, LM, waist circumference, and waist-to-hip ratio also increases, whereas in girls increasing values in LM, FM index, BF%, and hip circumference are observed [38]. These results agree with those of our study regarding the correlations of the variables related to both bone mass and anthropometric variables and DXA-derived body compartments.

Corroborating our results, a previous study showed a positive correlation between body weight, BMI, LM, and FM with BMC, bone mineral area, and BMD values in lumbar spine (L2–L4), hip, femur, and whole body. However, when the results were adjusted for body weight, LM, and FM, no significant differences were found between overweight and eutrophic female adolescents, except for the apparent BMD of the spine, which remained higher in overweight adolescents [39]. Results of another study [40] also demonstrated that the BMC and bone mineral area of whole body, BMD of the lumbar spine (L2–L4), hip, femur, and forearm were higher in overweight compared with eutrophic male adolescents, with the exception of BMD of whole body [40]. After adjustments, the researchers also found no statistical differences between the two groups for the variables related to bone mass.

Another study evaluated the BMC obtained by DXA, and also analyzed the bone mass of radio and tibia by peripheral computed tomography in women ages 18 to 22 y [41]. The authors concluded that fat had no mechanical effect on the bone that could lead to increased bone mass, unlike the force exerted by the muscle mass. The authors found that LM, FM, and weight have positive correlation with bone parameters obtained for the radio and tibia. Although the authors evaluated sites different than those evaluated in our study, their findings support our results.

A recent survey based on the results of the HELENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) study, a multi-centric trial conducted in 10 European cities, demonstrated that overweight male adolescents had higher whole-body BMC than their non-obese counterparts, and that female adolescents had higher BMC and BMD in most regions analyzed compared with eutrophic girls. The authors suggested that excess FM could indirectly increase bone mass by increasing LM. However, once the LM values were adjusted, the associations between bone mass and FM became negative, indicating that FM itself had no beneficial effect on bone mass [42].

Various mechanisms have been proposed to explain the complex relationship between adipose tissue and bone. The physiopathological role of adipose tissue in bone homeostasis is probably related to the participation of adipokines in bone remodeling. These molecules are released from fat cells and some of them interfere with both bone formation and resorption. Because bone cells express specific hormone receptors, bone tissue has been suggested to be an endocrine organ [43,44].

Adipose tissues also secrete inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α [45]. Alterations in the production of these proinflammatory markers can have adverse metabolic effects and cardiovascular repercussions. IL-6 and TNF- α also promote bone resorption by stimulating the differentiation of osteoclasts. All of these molecules, including resistin, adiponectin, leptin, and IL-6, affect energy homeostasis in humans and might be involved differently in bone metabolism, thus contributing to the complex relationship between adipose tissue and bone [16,46]. The relationship between adipose tissue and bone probably results in a homeostatic feedback system in which adipokines and molecules secreted by osteoblasts and osteoclasts are part of an active bone–adipose axis. However, the mechanisms involved in these events remain unclear [47].

Whole-body densitometry does not permit to differentiate the distribution or type of fat and its possible metabolic consequences. However, a literature review showed that practically 100% of extremely obese adolescents become obese adults with a large waist circumference, a consequence of the deposition of visceral fat, which is a risk factor for metabolic syndrome. It has

been demonstrated that 96% of extremely obese adolescents have an increased waist circumference [8]. In this group, 41.7% of extremely obese adolescent girls had metabolic syndrome (MetS) and presented three or more cardiovascular risk factors. For adolescent boys, the prevalence was 30.6%. These results suggest that extremely obese adolescents are at high risk for developing MetS, indicating different metabolic consequences including negative repercussions on bone mass. Using DXA to evaluate total bone mass and FM and magnetic resonance imaging to quantify visceral fat, one study suggested that numerous factors are involved in the reduction of bone mass in adolescents with MetS, including insulin resistance, increased excretion of calcium, alterations in the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, hyperleptinemia, and especially factors related to inflammatory cytokines [41].

Conclusion

The results of this study support the hypothesis that FM or LM influence BMC and BMD, but the underlying mechanisms remain to be clarified. Prospective longitudinal studies, sophisticated methods that complement the assessment of body composition and distribution of fat, LM, and bone mass by body segments may contribute to unraveling such mechanisms.

Despite being a transversal study and having limitations for studying causal relationships, we found important results, such as the moderate to strong correlations between anthropometric variables (BMI), those obtained by DXA (LM), and the variables related to bone mass, as well as the negative relationship of BF% with BMD and BMC variables in males, and for femur BMD and spine BMD in females. Based on the observation that the higher the BF%, the lower the BMD and BMC, our results indicate that excess FM is detrimental to the development of bone mass in male adolescents, whereas in females the femur and spine BMDs are the most affected.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)–Process nos. 07/07731-0 and 2011/05991-0, Pro-Rector for Research of UNESP, and FUNDUNESP.

References

- [1] Center of Disease Control and Prevention [CDC]. Defining overweight and obesity. United States; 2012. Available at: <http://www.cdc.gov/obesity/adult/defining.html>. Accessed 2013 June 19.
- [2] He J, Muntner P, Chen J, Roccella EJ, Streiff RH, Whelton PK. Factors associated with hypertension control in the general population of the United States. *Arch Intern Med* 2002;162:1051–8.
- [3] Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). I Diretriz Brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:1–28.
- [4] Lopes HF, Egan BM. Desequilíbrio autonômico e síndrome metabólica: parceiros patológicos em uma pandemia global emergente. *Arq Bras Cardiol* 2006;87:538–47.
- [5] Kannel WB. Risk stratification in hypertension: new insights from the Framingham Study. *Am J Hypertens* 2007;13:3–10.
- [6] Franco GPP, Scala LCN, Alves CJA, França GVA, Cassanelli T, Jardim PCB. Síndrome metabólica em hipertensos de Cuiabá - MT: Prevalência e fatores associados. *Arq Bras Cardiol* 2009;92:472–8.
- [7] Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents—an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007;8:299–306.
- [8] Rizzo ACB, Goldberg TBL, Silva CC, Kurokawa CS, Nunes HRC, Corrente JE. Metabolic syndrome risk factors in overweight, obese, and extremely obese Brazilian adolescents. *Nutrit J* 2013;12:19.
- [9] Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. Bone mineralization in Brazilian adolescents: the years of maximum bone mass incorporation. *Arch Latin-am Nutr* 2007;57:118–24.
- [10] Silva CC, Goldberg TBL, Nga HS, Kurokawa CS, Capela RC, Teixeira AS, et al. Impact of skeletal maturation on bone metabolism biomarkers and bone mineral density in healthy Brazilian male adolescents. *J Pediatr* 2011;87:450–60.
- [11] Moretto MR, Silva CC, Kurokawa CS, Fortes CM, Capela RC, Teixeira AS, et al. Bone mineral density in healthy female adolescents according to age, bone age and pubertal breast stage. *Open Orthop J* 2011;5:324–30.
- [12] Silva CC, Kurokawa CS, Nag HS, Moretto MR, Dalmas JC, Goldberg TB. Bone metabolism biomarkers, body weight, and bone age in healthy Brazilian male adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25:479–84.
- [13] Goldberg TBL, Fortes CMT, Kurokawa CS, Silva CC, Moretto MR, Nunes HRDC. Relationship between bone age and pubertal breast stage to bone biomarkers and bone mineral density in healthy Brazilian female adolescents. *Arch Dis Child* 2012;97:126.
- [14] Crawford PB, Wang MC, Sabry ZI, Hudes M, Van LM, Bachrach LK. Adolescent diet is predictive of peak bone mass. *Am J Clin Nutr* 2002;75:356–9.
- [15] Walsh IAP, Oishi J, Coury HJCG. Clinical and functional aspects of work-related musculoskeletal disorders among active workers. *Rev Saúde Pública* 2008;42:108–16.
- [16] Mosca LN, Silva VN, Goldberg TBL. Does excess weight interfere with bone mass accumulation during adolescence? *Nutrients* 2013;5:2047–61.
- [17] Santos L, Cintra IP, Fisberg M, Castro ML, Martini LA. Associação entre a perda de peso, a massa óssea, a composição corporal e o consumo alimentar de adolescentes obesos pós-púberes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52:1001–8.
- [18] Goulding A, Taylor RW, Jones IE, McAuley KA, Manning PJ, Williams SM. Overweight and obese children have low bone mass and area for their weight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:627–32.
- [19] Goulding A, Taylor RW, Jones IE, Manning PJ, Williams SM. Spinal overload: a concern for obese children and adolescents? *Osteoporos Int* 2002;13:835–40.
- [20] Taylor ED, Theim KR, Mirch MC. Orthopedic complications of overweight in children and adolescents. *Pediatrics* 2006;117:2167–74.
- [21] Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1640–6.
- [22] Afghani A, Goran MI. The interrelationships between abdominal adiposity, leptin and bone mineral content in overweight Latino children. *Horm Res* 2009;72:82–7.
- [23] Prado WL, Piano A, Castro ML, Mello MT, Stella SG, Tufik S, et al. Relationship between bone mineral density, leptin and insulin concentration in Brazilian obese adolescents. *J Bone Miner Metab* 2009;27:613–9.
- [24] Leonard MB, Shults J, Wilson B, Tershakovec AM, Zemel BS. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. *Am J Clin Nutr* 2004;80:514–23.
- [25] Petit MA, Beck TJ, Shults J, Zemel BS, Foster BJ, Leonard MB. Proximal femur bone geometry is appropriately adapted to lean mass in overweight children and adolescents. *Bone* 2005;36:568–76.
- [26] Stettler N, Zomorodi A, Posner JC. Predictive value of weight-for-age to identify overweight children. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:3106–12.
- [27] Frisancho AR. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Ann Arbor, MI: The University of Michigan Press; 1990.
- [28] Center of Disease Control and Prevention [CDC]. National Center for health statistics CDC Growth Charts. United States; 2000. Available at: http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens_bmi/about_childrensbmi.html#What%20is%20BMI. Accessed 2012 July 14.
- [29] Freedman DS, Mei Z, Srinivasan SS, Brenson GS, Dietz WH. Cardiovascular risk factors and excess adiposity among overweight children and adolescents: The Bogalusa Heart Study. *J Pediatr* 2007;150:12–7.
- [30] Fitzpatrick L, Heaney RP. Got soda? *J Bone Miner Res* 2003;18:1570–2.
- [31] McGartland C, Robson PJ, Murray L, Cran G, Savage MJ, Watkins D, et al. Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: The Northern Ireland Young Hearts Project. *J Bone Mineral Res* 2003;18:1563–9.
- [32] Greulich W, Pyle SL. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. Palo Alto, CA: Stanford University Press; 1959.
- [33] Lima F, Falco V, Baima J, Carazzato JG, Pereira RMR. Effect of impact load and active load on bone metabolism and body composition of adolescent athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:18–23.
- [34] Vicente-Rodriguez G. How does exercise affect bone development during growth? *Sports Med* 2006;36:561–9.
- [35] Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, Leonard MB, Bishop NJ, Bianchi ML, et al. International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions (ISCD). *Bone* 2008;43:1115–21.
- [36] Tanner JM. Growth at adolescence. Oxford: Blackwell; 1962.