

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

ALÉCIA JOSEFA ALVES OLIVEIRA SANTOS

**CONEXÕES ENTEROENDÓCRINAS NA DEFICIÊNCIA ISOLADA DE GH
DEVIDO A UMA MUTAÇÃO NO GENE DO RECEPTOR DO GHRH**

ARACAJU (SE)

2019

ALÉCIA JOSEFA ALVES OLIVEIRA SANTOS

**CONEXÕES ENTEROENDÓCRINAS NA DEFICIÊNCIA ISOLADA DE GH
DEVIDO A UMA MUTAÇÃO NO GENE DO RECEPTOR DO GHRH**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau
de Doutor em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar
Oliveira

ARACAJU (SE)

2019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237c Santos, Alécia Josefa Alves Oliveira
Conexões enteroendócrinas na deficiência isolada de GH
devido a uma mutação no gene do receptor do GHRH /
Alécia Josefa Alves Oliveira Santos ; orientador Manuel
Hermínio de Aguiar Oliveira. – Aracaju, 2019.
87 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Sergipe, 2019.

1. Hormônio do Crescimento 2. Grelina. 3. GLP-1. 4. Ingestão de
Alimentos. I. Oliveira, Manuel Hermínio de Aguiar, orient. II. Título.

CDU 61

CRB-5: SE-001850/O

ALÉCIA JOSEFA ALVES OLIVEIRA SANTOS

**CONEXÕES ENTEROENDÓCRINAS NA DEFICIÊNCIA ISOLADA DE GH
DEVIDO A UMA MUTAÇÃO NO GENE DO RECEPTOR DO GHRH**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe
como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em
Ciências da Saúde

Aprovada em: 07/06/2019

Orientador: Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira-UFS

1º Examinador: Prof. Dra. Carla Raquel Pereira Oliveira-UFS

2º Examinador: Prof. Dra. Elenilde Gomes-Santos-UFS

**3º Examinador: Prof. Dra. Ana Claudia Latronico Xavier-Faculdade de Medicina USP,
São Paulo**

**4º Examinador: Dra. Margaret de Castro-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
USP**

AGRADECIMENTOS

Dedico essa conquista primeiramente a Deus pelo dom da vida, e por me dar forças para enfrentar e nunca desistir dos meus objetivos.

Aos meus pais João e Cristina pelos ensinamentos, apoio e confiança. Por me ajudar a lutar pelos meus sonhos e sempre estar presentes nos momentos mais difíceis da minha vida.

Agradeço a todos os meus familiares. Especialmente a meus irmãos: Aline, Alice e Alex; Sobrinhos: Davi e João Neto.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Manuel Hermínio. Pessoa muito especial para mim. Um anjo da guarda que Deus me concedeu. Exemplo de vida, sabedoria e humildade. Obrigada por confiar em mim e pelos ensinamentos pessoais e profissionais.

A Dra. Mônica Nogueira pela amizade e participação essencial na execução da pesquisa.

A equipe de Ribeirão Preto, especialmente a Dra. Margareth Castro e a Dra. Ana Carolina Bueno pela ajuda nas análises laboratoriais deste trabalho.

A Dr. Roberto Salvatori pela ajuda na elaboração e submissão do artigo.

A todos os participantes do grupo de pesquisa de Itabaianinha, liderado pelo Prof. Dr. Manuel Hermínio, pela colaboração na realização da tese, em especial a Carla, Elenilde, Viviane, Cynthia, Ângela, Cindi, Nayra, Djane, Manuela, Flávia, Enaldo, Jéssica, Paula, Meirielly e Ivina.

Aos Anões de Itabaianinha por serem os principais responsáveis para a realização desta pesquisa. Também, agradeço a todos os controles do nosso trabalho pela participação. Meu muito obrigada.

A todos os meus amigos, de modo especial a: Maria, Luana, Leidiane, Luciene, Igor, Ana Thaísa, Fábio, Daniely, Jonathas; Paraíba; Jacqueline; Adilson.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - UFS, de modo especial a Dra. Elenilde Santos, Dra. Carla Oliveira e Dra. Joselina Oliveira por participar da minha qualificação. Também, agradeço as professoras Dra. Ana Claudia Xavier e Dra. Margaret de Castro por aceitarem o convite para participar da minha defesa.

Agradeço a todos pela ajuda na realização deste trabalho.

RESUMO

Conexões enteroendócrinas na deficiência isolada de GH devido a uma mutação no gene do receptor do GHRH. Alécia Josefa Alves Oliveira Santos. Aracaju, 2019.

INTRODUÇÃO: O GH e IGF-I são cruciais para o estabelecimento do tamanho corpóreo e regulação da ingestão de alimentos, armazenamento de nutrientes e sensibilidade à insulina. Existem conexões enteroendócrinas entre o eixo GH/IGF-I e insulina, grelina e peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1). A ação dessas conexões na deficiência de GH (DGH) é desconhecida.

OBJETIVO: Estudar as conexões enteroendócrinas antes e depois de um teste com refeição padrão em uma população homogênea de adultos com deficiência isolada de GH (DIGH), congênita e não tratada, devido a uma mutação no gene do receptor do GHRH.

CASUÍSTICA E MÉTODOS: Trata-se de um estudo transversal com 20 indivíduos com DIGH e 20 controles. Foram aferidas as concentrações de glicose, insulina, grelina e GLP-1 antes e em 30, 60, 120 e 180 min após a ingestão de uma refeição teste padronizada. Foram calculados HOMA-IR e HOMA- β . Os participantes pontuaram, em escala analógica visual, os sentimentos de fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo. Os principais resultados foram encontrados para: áreas sob as curvas (AUC) de glicose, insulina, grelina, GLP-1, fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo.

RESULTADOS: HOMA-IR e HOMA- β foram menores na DIGH que nos controles ($p=0,002$ e $p=0,023$, respectivamente). As AUC foram maiores para a fome ($p<0,0001$), glicose ($p=0,0157$), grelina ($p<0,0001$) e GLP-1 ($p<0,0001$) e menores para plenitude ($p<0,0001$) na DIGH em comparação aos controles. Não houve diferença na AUC para consumo alimentar prospectivo e concentrações de insulina.

CONCLUSÕES: A DIGH não tratada está associada ao aumento da secreção de GLP-1 e menor supressão da grelina e da fome pós-prandial em resposta a uma refeição mista. Essas conexões enteroendócrinas podem resultar em um resultado favorável em termos de adaptação ambiental, garantindo a ingestão adequada de alimentos e podem conferir benefícios metabólicos.

Descritores: GH. Grelina. GLP-1. Ingestão alimentar.

ABSTRACT

Enteroendocrine connections in isolated GH deficiency due to a GHRH receptor gene mutation. Alécia Josefa Alves Oliveira Santos. Aracaju, 2019.

CONTEXT: GH and IGF-I are crucial for attainment of normal body size and regulation of food intake, nutrients storage, and insulin sensitivity. Enteroendocrine connections exist between the GH/IGF-I axis and insulin, ghrelin, and glucagon-like peptide 1 (GLP-1). The status of these connections in GH deficiency (GHD) is unknown.

OBJECTIVE: To study the enteroendocrine connections before and after a standard meal test in a homogeneous population of adults with congenital untreated isolated GHD (IGHD) due to a mutation in the GHRH receptor gene.

MATERIALS AND METHODS: In a cross-sectional study of 20 IGHD and 20 controls, we measured glucose, insulin, ghrelin, and GLP-1 before and 30, 60, 120 and 180 min after a standardized test meal. HOMA-IR and HOMA- β were calculated. Participants scored on a visual analogue scale the feelings of hunger, fullness, and prospective food consumption. Main outcome measures: areas under the curves (AUC) of glucose, insulin, ghrelin, GLP-1, hunger, fullness and prospective food consumption.

RESULTS: Fasting HOMA-IR and HOMA- β were lower in IGHD than controls ($p=0.002$ and $p=0.023$ respectively). AUC were higher for hunger ($p<0.0001$), glucose ($p=0.0157$), ghrelin ($p<0.0001$) and GLP-1 ($p<0.0001$), and smaller for fullness ($p<0.0001$) in IGHD compared to controls. There was no difference in AUC for prospective food consumption or insulin.

CONCLUSIONS: Untreated IGHD is associated to increased GLP-1 secretion and reduced post-prandial ghrelin and hunger attenuation in response to a mixed meal. These enteroendocrine connections can result into a favourable outcome in terms of environmental adaptation, guaranteeing appropriate food intake, and can confer metabolic benefits.

Descriptors: GH. Ghrelin. GLP-1. Food intake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Níveis de grelina e GLP-1 basais e após um jejum com 490 kcal, 53 g de carboidratos, 17 g de lipídeos e 11 g de proteínas.....	15
Figura 2 Representação esquemática dos mecanismos de controle da secreção de GH, GLP-1 e TSH. HT: hormônios tireoideanos. TRH: hormônio liberador do TSH.....	16
Figura 3 Ilustração do equilíbrio postural em indivíduos com DIGH no centro de pressão (CP) na placa de força, na posição ântero-posterior (AP) e mediolateral (ML).....	18
Figura 4 Esquema representativo da regulação intrínseca do eixo GH-IGF. A secreção de GH pela hipófise é estimulada pelo GHRH hipotalâmico e pela grelina gástrica e inibida pela somatostatina.....	21
Figura 5 Mutação homozigótica (c.57 + 1G → A) no gene do receptor do GHRH, na DIGH de Itabaianinha.....	22
Figura 6 Indivíduos com DIGH de Itabaianinha e o professor Dr. Manuel Hermínio (1995).....	23
Figura 7 Modelo que ilustra dois caminhos distintos para liberação do hormônio do crescimento (GH). A via mediada pela grelina (em amarelo), a qual atua durante a fome prolongada e não é essencial para o crescimento corporal. A via do GHRH (em vermelho), a qual é fundamental para o crescimento corporal e desempenha uma menor função durante a fome prolongada.....	25
Figura 8 Modelo que mostra a resposta metabólica da grelina à períodos de fome prolongada em camundongos.....	27
Figura 9 Principais ações do GLP-1 em tecidos periféricos. A maioria dos efeitos do GLP-1 são mediados pela interação direta com GLP-1Rs em tecidos específicos. Porém há ações do GLP-1 no fígado, gordura e músculo.....	32
Figura 10 Ilustração da produção da dieta teste padrão.....	38
Figura 11 Indivíduo com DIGH e Controle antes da ingestão da dieta.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ações metabólicas do GH e do IGF-I.....	19
Tabela 2 Efeitos fisiológicos da Grelina.	29
Tabela 3 Dados antropométricos e basais de glicose, IGF-I, insulina, grelina, GLP-1, fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo de 20 indivíduos com DIGH e 20 controles. Os dados são expressos em média (desvio padrão), exceto para insulina, IGF-I, HOMA-IR, HOMA- β , grelina e GLP-1 expressos em mediana (distância interquartilica).	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Valores de IMC entre indivíduos do grupo DIGH (n=20) e controle (n=20).....	44
Gráfico 2 Valores de HOMA-IR entre indivíduos do grupo DIGH (n=20) e controle (n=20).....	45
Gráfico 3 Valores de HOMA- β entre indivíduos do grupo DIGH (n=20) e controle (n=20).....	46
Gráfico 4 AUC dos níveis de fome após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média).....	47
Gráfico 5 AUC dos níveis de plenitude após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média).....	47
Gráfico 6 AUC dos níveis de consumo alimentar prospectivo após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média).....	48
Gráfico 7 AUC dos níveis de glicose após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média).....	49
Gráfico 8 AUC dos níveis de insulina após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média).....	49
Gráfico 9 AUC dos níveis de grelina após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média).....	50
Gráfico 10 AUC dos níveis de GLP-1 após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC - Área sob a curva

CCK - Colecistoquinina

DGH - Deficiência do Hormônio de Crescimento

DIGH - Deficiência Isolada do Hormônio de Crescimento

DM2 - Diabetes mellitus tipo 2

EAV - Escala Analógica Visual

FGF-21 - Fator de Crescimento do Fibroblasto-21

GH - Hormônio de Crescimento

GH-N - Gene Normal do Hormônio de Crescimento

GHRH - Hormônio Liberador do GH

GHRHR - Receptor do GHRH

GHRHR - Gene do Receptor do GHRH

GHRHKO - Deleção do Gene do GHRH

GHS - Secretagogos do Hormônio de Crescimento

GHS-R - Receptor do Secretagogos do Hormônio de Crescimento

GH-V - Gene Variante do Hormônio de Crescimento

GIP - Peptídeo Inibitório Gástrico

GLP-1 - Peptídeo semelhante ao glucagon-1

GLP-1R - Receptor do Peptídeo semelhante ao glucagon-1

GLP-2 - Peptídeo semelhante ao glucagon-2

HCFMRP-USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo

HOMA- β - *Homeostasis model assessment β -cell function*

HOMA-IR - *Homeostasis model assessment index of insulin resistance*

IGF-I - Fator de Crescimento semelhante à Insulina- tipo I

IMC - Índice de Massa Corpórea

NPY - Neuropeptídeo Y

OMS - Organização Mundial de Saúde

PYY - Péptido YY

TTGO - Teste de Tolerância Oral à Glicose

TSH - Hormônio Estimulador da Tireoide

VCT - Valor Calórico Total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Deficiência do Hormônio de Crescimento.....	19
2.2 DIGH de Itabaianinha.....	21
2.3 Grelina	24
2.4 GLP-1.....	29
2.5 Sensações de Apetite	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	36
4.1 Tipo do Estudo.....	36
4.2 Delineamento do Estudo.....	36
4.3 Casuística	36
4.4 Variáveis	37
4.5 Métodos.....	37
4.5.1 Medidas Antropométricas.....	37
4.5.2 Dieta Teste Padrão	37
4.5.3 Teste com Refeição	38
4.5.4 Dosagens Bioquímicas	40
4.5.5 Sensibilidade à Insulina e Função das Células β	41
4.6 Análise Estatística.....	42
4.7 Aspectos Éticos	42
5 RESULTADOS	43

5.1 Resultados Basais	43
5.2 Resultados Pós Refeição	46
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	56
8 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
APÊNDICE B - Artigo 1 - Enteroendocrine Connections in Congenital Isolated GH Deficiency due to a GHRH Receptor Gene Mutation (JCEM)	69
APÊNDICE C - Artigo 2 - Walking and Postural Balance in Adults with Severe Short Stature due to Isolated GH Deficiency (<i>Endocrine Connections</i>)	77
ANEXO A - Questionário Validado de Escala Analógica Visual (EAV)	86
ANEXO B - Aprovação do Projeto na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP	87

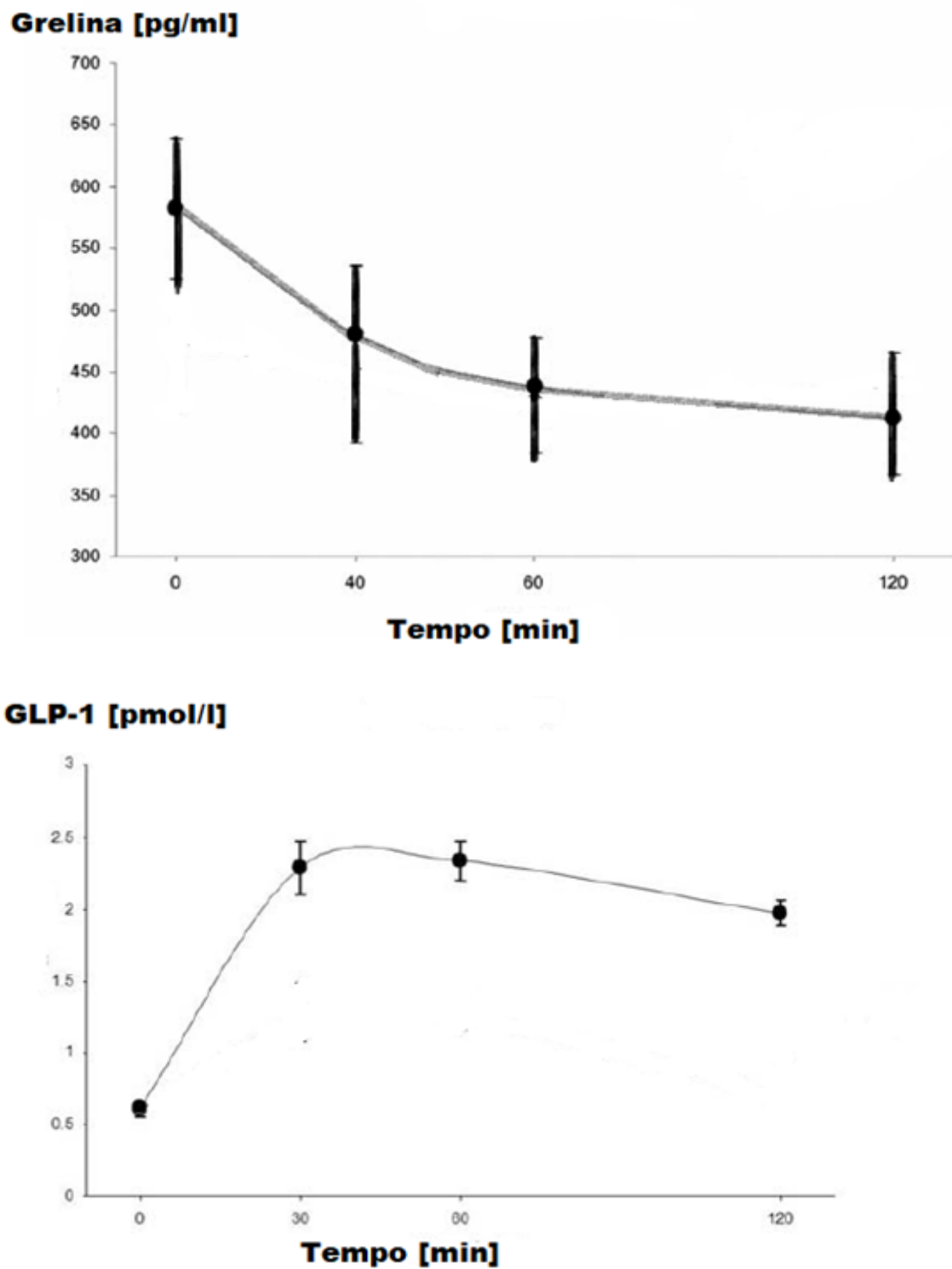
1 INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante a Insulina-tipo I (IGF-I) são fundamentais para a obtenção do tamanho normal do corpo, mas também atuam na regulação de funções corporais importantes, incluindo ingestão de alimentos, armazenamento de nutrientes e sensibilidade à insulina (AGUIAR-OLIVEIRA; BARTKE, 2019). A secreção hipofisária de GH é feita sob controle hipotalâmico, que envolve dois peptídeos estimuladores (o hormônio liberador do GH (GHRH) e a grelina) e um peptídeo inibitório (a somatostatina) e a retroalimentação pelo IGF-I circulante, produzido principalmente no fígado. As conexões enteroendócrinas entre o eixo GH/IGF-I e insulina, grelina e peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) não estão completamente compreendidas, contudo possivelmente devem existir porque o crescimento requer energia adequada e estímulo nutricional. Nesse contexto, a insulina e o GH são essenciais para ajustar a utilização de energia à quantidade de alimentos, promovendo anabolismo ou catabolismo, quando necessário. A insulina é o principal hormônio metabólico pós-alimentar, já o GH assume um papel importante como estimulador da lipólise durante o jejum prolongado (SAKHAROVA; HOROWITZ; SURYA et al., 2008). Além disso, o eixo GH/grelina parece apresentar um papel essencial para sobreviver à fome prolongada (GOLDSTEIN; ZHAO; LI et al., 2011).

A grelina foi descoberta em 1999 (KOJIMA; HOSODA; DATE et al., 1999), apresenta em sua estrutura 28 aminoácidos sendo a n-octanoilação na posição 3 da serina, na molécula necessária para sua bioatividade. Este hormônio é produzido pelas células gastrointestinais, particularmente no fundo do estômago. A grelina estimula a secreção de GH, reduz a secreção de insulina e estimula a fome. O pico da secreção da grelina ocorre antes das refeições, com queda após as mesmas (Figura 1) (BEGLINGER; MEYER-GERSPACH; GRAF et al., 2014; IWAKURA; KANGAWA; NAKAO, 2015; TONG; DAVIS; GASTALDELLI et al., 2016). Em camundongos, a grelina endógena parece não ser um regulador essencial para ingestão de alimentos, contudo apresenta ação importante na regulação do apetite e na determinação da preferência pelo combustível metabólico (WORTLEY; ANDERSON; GARCIA et al., 2004). Embora a grelina seja um potente agente estimulante do apetite em seres humanos (BUSS; HAVEL; EPEL et al., 2014), e um potencializador endógeno do eixo GH-IGF-I (INUI, 2001), seu papel na fisiologia humana ainda é discutido (NASS; GAYLINN; THORNER, 2011).

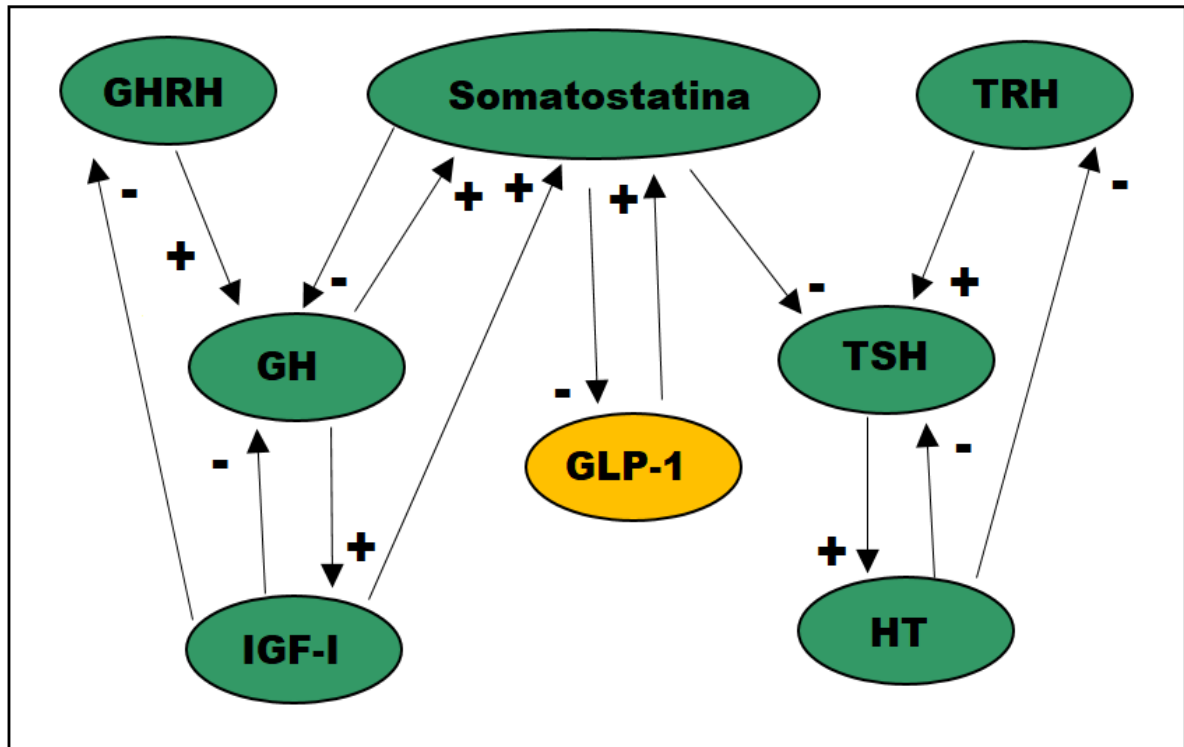
O GLP-1 é um produto tecido-específico do gene do proglucagon. É secretado em resposta à ingestão de nutrientes pelas células enteroendócrinas L. O GLP-1 potencializa a secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon (efeito incretina) e contribui para a saciedade. A secreção do GLP-1 atinge o pico cerca de uma hora após as refeições (Figura 1) (BAGGIO; DRUCKER, 2007; KREYMANN; GHATEI; WILLIAMS et al., 1987; MOJSOV; WEIR; HABENER, 1987). Recentemente, foi descrita uma nova conexão enteroendócrina, através da qual a grelina aumenta a secreção de GLP-1 em camundongos (GAGNON; BAGGIO; DRUCKER et al., 2015; LINDQVIST; SHCHERBINA; FISCHER et al., 2017) e, provavelmente, em humanos (TONG; DAVIS; GASTALDELLI et al., 2016). Deve existir uma realimentação entre o GLP-1 e a somatostatina, na qual o GLP-1 aumenta a liberação de somatostatina e a somatostatina diminui a secreção de GLP-1 (CHISHOLM; GREENBERG, 2002; HEER; RASMUSSEN; COY et al., 2008; ØRGAARD; HOLST, 2017). É conhecido que o IGF-I além de frear a secreção de GHRH, estimula a secreção de somatostatina, um peptídeo inibitório não só da secreção de GH quanto do hormônio estimulador da tireoide (TSH) e do GLP-1. Na DIGH de Itabaianinha, a deficiência grave de IGF-I causa uma redução da somatostatina, testemunhada pelos níveis moderadamente elevados de TSH nestes indivíduos (GONDO; AGUIAR-OLIVEIRA; HAYASHIDA et al., 2001). Especulamos, também por este mecanismo que as concentrações de GLP-1 possam ser elevadas nestes indivíduos (Figura 2). Interessantemente, a grelina que reduz a secreção de insulina, é um potente estimulador da secreção de GLP-1, o qual aumenta a sensibilidade insulínica (GAGNON; BAGGIO; DRUCKER et al., 2015; LINDQVIST; SHCHERBINA; FISCHER et al., 2017; TONG; DAVIS; GASTALDELLI et al., 2016).

Figura 1 Níveis de grelina e GLP-1 basais e após um desjejum, com 490 kcal, 53 g de carboidratos, 17 g de lipídeos e 11 g de proteínas



Adaptação de Beglinger, Meyer-Gerspach, Graf et al. (2014).

Figura 2 Representação esquemática dos mecanismos de controle da secreção de GH, GLP-1 e TSH. HT: hormônios tireoideanos. TRH: hormônio liberador do TSH



Adaptação de Portes (1998).

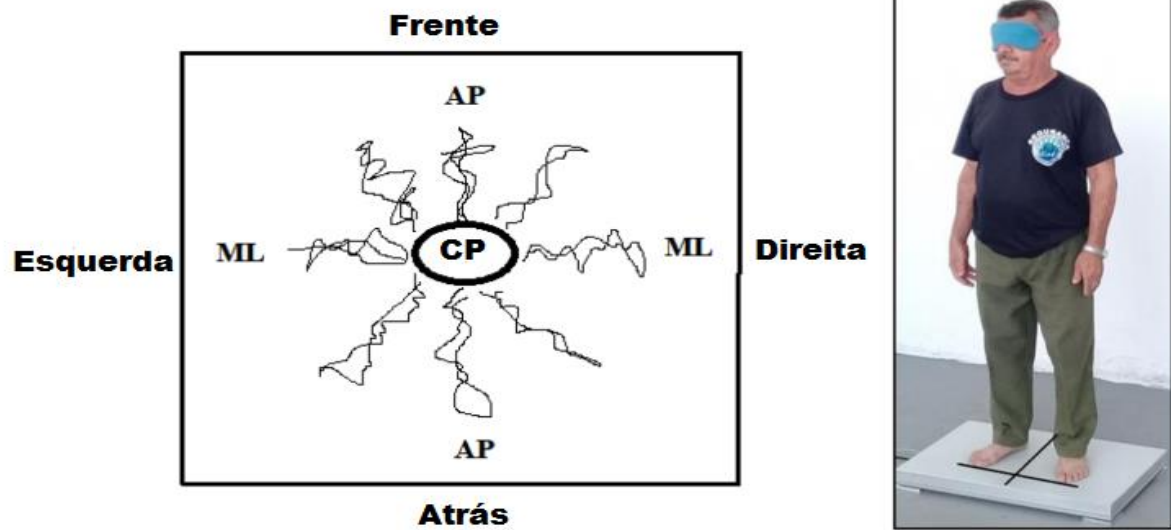
O impacto da deficiência de GH (DGH) nas conexões enteroendócrinas anteriormente citadas em humanos é atualmente desconhecido. A DGH adquirida geralmente consiste de múltiplos déficits hormonais hipofisários, pode ocorrer após uma cirurgia ou irradiação hipofisária. Além disso, pode estar associada a comorbidades como obesidade, resistência à insulina ou dislipidemia. Essa interação de fatores dificulta a análise do claro impacto da DGH nessas conexões. Descrevemos uma grande coorte de indivíduos residentes no município de Itabaianinha, no nordeste do Brasil, que são afetados por nanismo grave devido a deficiência isolada de GH (DIGH) tipo IV, causado pela mutação homozigótica c.57 + 1 G → A no gene do receptor do GHRH (*GHRHR*, OMIM n. 618157), resultando em GH e IGF-I séricos muito baixos ao longo da vida (SALVATORI; HAYASHIDA; AGUIAR-OLIVEIRA et al., 1999). Foi observado que estes indivíduos com DIGH apresentam uma combinação de redução da função das células beta, com melhor sensibilidade à insulina, avaliada não só pelo modelo homeostático de avaliação da insulino-resistência (HOMA-IR), como também pelo índice de insulinosensibilidade (IS) após teste oral de ingestão de glicose em 2 horas (OGIS2) e 3 horas (OGIS3). Estes índices apresentam excelente correlação com *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, o padrão-ouro para avaliar a sensibilidade insulínica (OLIVEIRA;

SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012). Apesar da resistência completa ao GHRH, a secreção de GH desses indivíduos responde, embora de forma mínima, aos agonistas do receptor da grelina (GONDO; AGUIAR-OLIVEIRA; HAYASHIDA et al., 2001).

Camundongos com DIGH devido à ablação do gene GHRH (GHRHKO) comem mais, são mais ativos (RECINELLA; SHOHREH; SALVATORI et al., 2013) e têm níveis mais elevados de grelina sérica em comparação aos que apresentam suficiência de GH, sugerindo que existe um feedback negativo entre o eixo GH/IGF-I e a secreção de grelina, e que a grelina elevada na DIGH poderia contribuir para o aumento da ingestão alimentar (RECINELLA; LEONE; FERRANTE et al., 2017). Estes camundongos apresentam aumento da gordura subcutânea e visceral, acompanhada por menor ganho de peso (RECINELLA; SHOHREH; SALVATORI et al., 2013). Isto pode ser justificado pelo aumento da atividade locomotora e termogênica (LEONE; CHIAVAROLI; SHOHREH et al., 2015).

Observamos que os indivíduos com DIGH de Itabaianinha comem proporcionalmente mais do que os controles (OLIVEIRA-SANTOS; SALVATORI; GOMES-SANTOS et al., 2016), apresentam obesidade visceral (GOMES-SANTOS; SALVATORI; FERRÃO et al., 2014), sendo também bastante ativos (ANDRADE-GUIMARÃES; AGUIAR-OLIVEIRA; SALVATORI et al., 2019) e conforme demonstrado no apêndice C desta tese, apresentam notável capacidade de marcha e equilíbrio postural (Figura 3) (SANTANA-RIBEIRO; MOREIRA-BRASILEIRO; AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2019). Portanto, levantamos a hipótese de que estes indivíduos, à semelhança dos camundongos com GHRHKO, podem ter níveis mais elevados de grelina circulante, resultando na redução da secreção de insulina, parcialmente compensada pelo aumento da sensibilidade insulínica, em parte devido à maior secreção do GLP-1. Para tanto, resolvemos estudar o comportamento destes hormônios e das sensações de apetite, antes e após uma refeição padrão.

Figura 3 Ilustração do equilíbrio postural em indivíduos com DIGH no centro de pressão (CP) na placa de força, na posição ântero-posterior (AP) e mediolateral (ML)



Adaptação de Santana-Ribeiro, Moreira-Brasileiro, Aguiar-Oliveira et al. (2019).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Deficiência do Hormônio de Crescimento

O hormônio de crescimento (GH), ou hormônio somatotrófico, além da ação promotora do crescimento, atua na composição corporal, na regulação do metabolismo proteico, lipídico, glicídico e ósseo (CRUZAT; JÚNIOR; TIRAPEGUI et al., 2008). Dessa forma atua como hormônio anabólico, lipolítico e hiperglicemiante. O GH estimula a lipólise durante o jejum prolongado (SAKHAROVA; HOROWITZ; SURYA et al., 2008). No entanto, o potencial de promover o crescimento do GH é secundário devido a sua capacidade para modular o metabolismo e a homeostase energética (MOLLER; GJEDSTED; GORMSEN et al., 2003; VIJAYAKUMAR; YAKAR; LEROITH, 2011), garantindo o balanço energético e a composição corporal adequados para o estabelecimento da estatura adulta, capacidade reprodutiva e de sobrevivência (ANISIMOV; BARTKE, 2013).

O GH apresenta importantes funções metabólicas nos tecidos de forma sinérgicas ou antagônicas ao IGF-I. Por exemplo, ações sinérgicas ocorrem sobre o anabolismo proteico e remodelação óssea. Enquanto ações antagônicas ocorrem sobre o metabolismo lipídico (sendo o GH lipolítico e o IGF-I lipogênico), e sobre o metabolismo glicídico (o GH reduz a sensibilidade insulínica e é hiperglicemiante e o IGF-I aumenta a sensibilidade insulínica e é hipoglicemiante) (ANDRADE-GUIMARÃES; AGUIAR-OLIVEIRA; SALVATORI et al., 2019; CRUZAT; JÚNIOR; TIRAPEGUI et al., 2008; OLIVEIRA; SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012). A tabela 1 mostra os principais efeitos metabólicos do GH e do IGF-I (AACE, 2003).

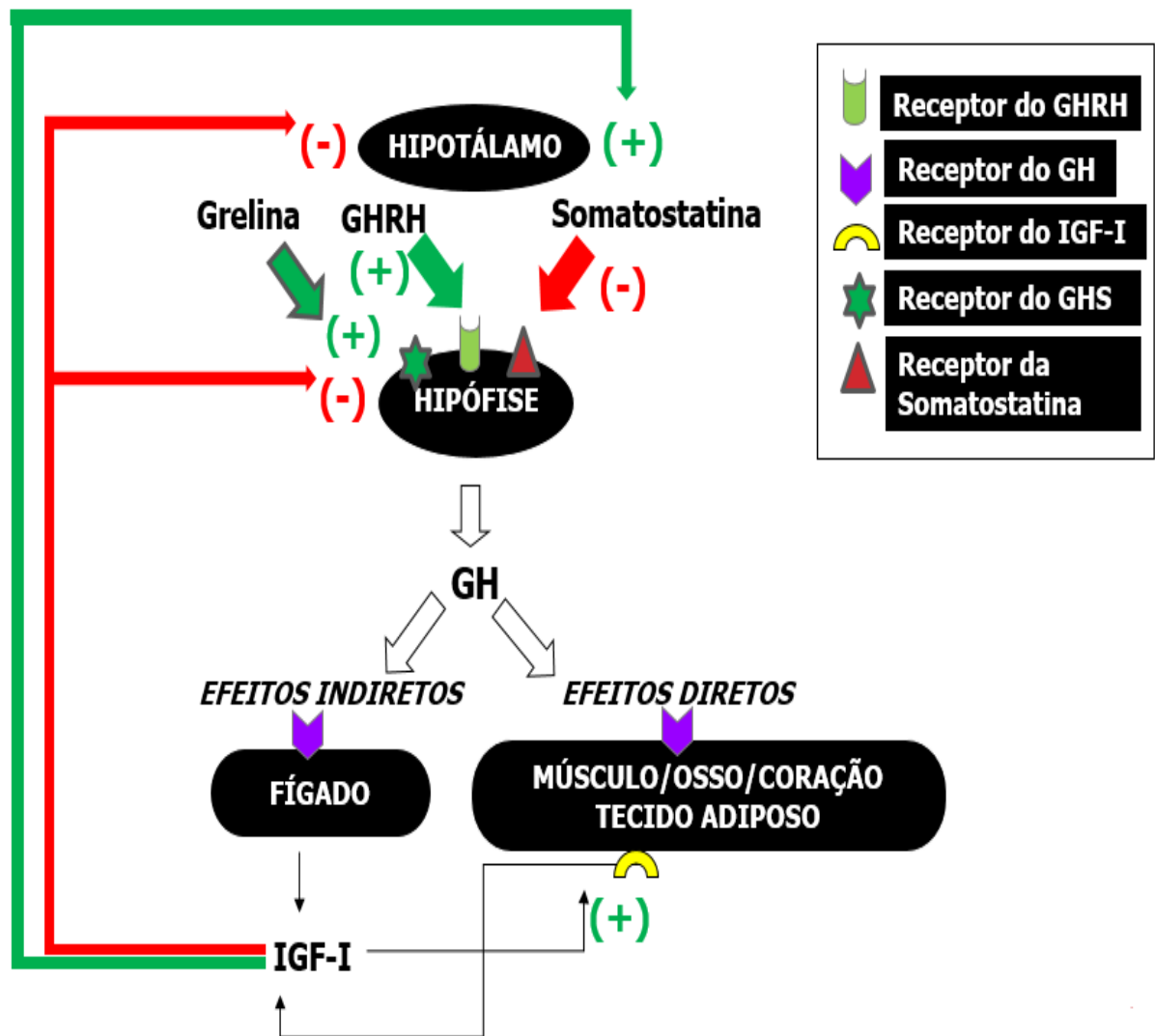
Tabela 1 Ações metabólicas do GH e do IGF-I

Processo	Efeito	
Homeostase insulino - glicídica	GH	Antagoniza efeitos da insulina
	IGF-I	Efeito semelhante à insulina
Lipólise	GH	Lipolítico
	IGF-I	Inibe a lipólise
Remodelação óssea	GH	Ativa a remodelação óssea
	IGF-I	Ativa a remodelação óssea
Síntese de proteína	GH	Aumenta a massa muscular
	IGF-I	Aumenta a massa muscular

Adaptação de AACE (2003).

O GH é secretado pela adenohipófise, segundo a regulação hipotalâmica, a qual envolve dois fatores estimulatórios (GHRH e grelina) e outro inibitório (somatostatina) (Figura 4). O GHRH e a somatostatina atuam em receptores específicos acoplados a proteína G, expressos na superfície das células somatotróficas. A ativação do primeiro receptor aumenta a produção intracelular do AMP cíclico e estimula a proliferação do GH, e a ativação do segundo receptor diminui essa ação (SALVATORI; SERPA; PARMIGIANI et al., 2006). Já a grelina estimula a produção de GH através da ligação ao receptor dos secretagogos do GH (GHS-R) nos somatotrofos (ARVAT; MACCARIO; DI VITO et al., 2001; SOUZA; SALVATORI; MARTINELLI JR et al., 2004; WAJNRAJCH; TEN; GERTNET et al., 2000). Por sua vez, o GH liga-se ao seu receptor (GHR) e via ativação do sistema JAK-STAT, principalmente no fígado, produz o IGF-I (HERRINGTON; CAETER-SU, 2001). A DGH é classificada em adquirida ou genética. A adquirida engloba causas tumorais, inflamatórias, traumas cranianos e idiopáticas. Frequentemente é associada a deficiências de outros hormônios hipofisários. Já a DGH genética consiste na deficiência isolada de GH (DIGH) causada por mutações no gene do receptor do GHRH, ou no gene do GH, e a DGH associada a déficit de vários hormônios hipofisário, provocadas por mutações em genes de transcrição de vários fatores pituitários. (PHILIPS; HJELLE; SEEBURG et al., 1981; SALVATORI; HAYASHIDA; AGUIAR-OLIVEIRA et al., 1999; SALVATORI; FAN; PHILLIPS et al. 2001).

Figura 4 Esquema representativo da regulação intrínseca do eixo GH-IGF. A secreção de GH pela hipófise é estimulada pelo GHRH hipotalâmico e pela grelina gástrica e inibida pela somatostatina



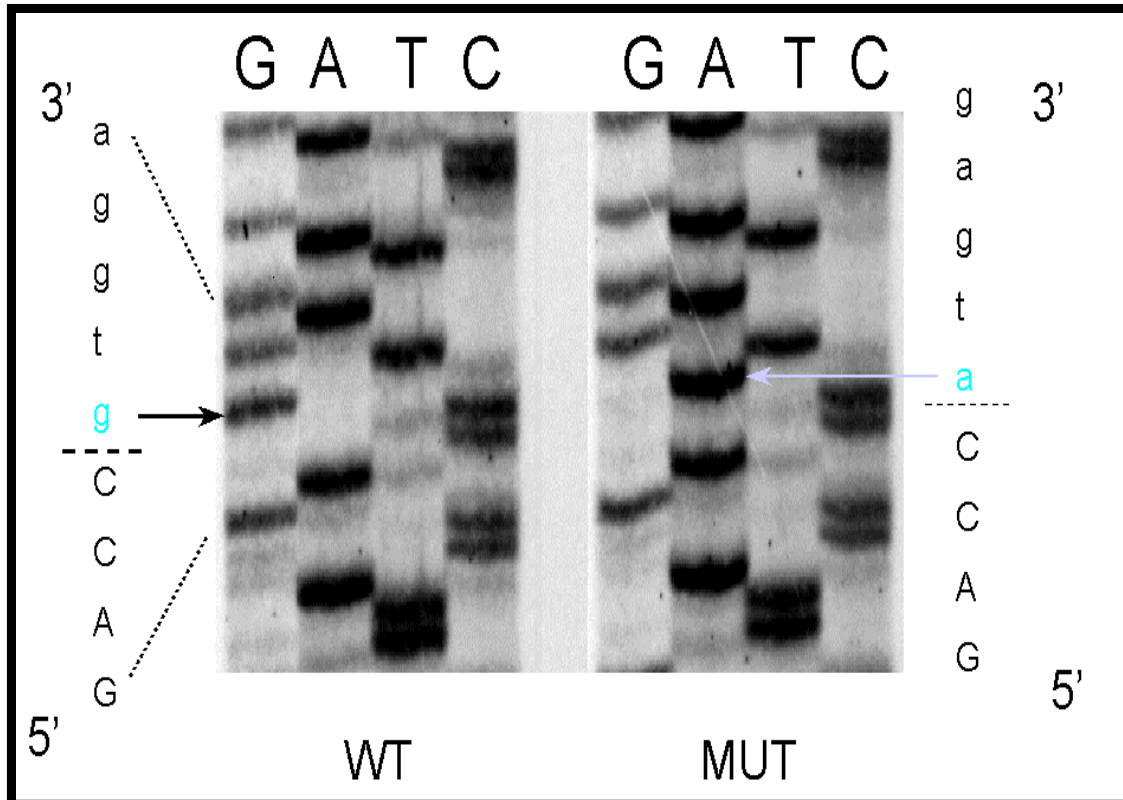
Adaptação de Aguiar-Oliveira, Oliveira, Pereira et al. (2010).

2.2 DIGH de Itabaianinha

Foi identificado no município de Itabaianinha, Sergipe, um grupo familiar de indivíduos com deficiência isolada de GH (DIGH) do tipo IV, em decorrência de mutação homozigótica c.57 + 1G → A no gene do receptor GHRH (*GHRHR*) (Figura 5), a qual foi amplificada em decorrência do isolamento geográfico e das altas taxa de casamentos consanguíneos (Figura 6). Estes pacientes apresentam severa e proporcional baixa estatura (-9,6 a -5,2 desvios-padrão da média para estatura) (AGUIAR-OLIVEIRA; GILL; BARRETTO et al., 1999). Conforme esperado, os indivíduos afetados não respondem ao estímulo agudo ou crônico com GHRH (GOMES-SANTOS; SALVATORI; FERRÃO et al.,

2014; SALVATORI; HAYASHIDA; AGUIAR-OLIVEIRA et al., 1999; SOUZA; SALVATORI; MARTINELLI JR et al., 2004).

Figura 5 Mutação homozigótica (c.57 + 1G → A) no gene do receptor do GHRH, na DIGH de Itabaianinha



Salvatori, Hayashida, Aguiar-Oliveira et al. (1999).

Figura 6 Indivíduos com DIGH de Itabaianinha e o professor Dr. Manuel Hermínio (1995)



A DIGH promove características particulares nos indivíduos afetados. Como por exemplo, redução do perímetro cefálico, o qual é menor que a altura anterior da face, com o desenvolvimento de fâcies de “boneca” ou fâcies de “anjo querubim (OLIVEIRA-NETO; MELO; FRANCO et al., 2011). Voz aguda e forte devido a menor porção inferior da laringe (BARRETO; D'ÁVILA; SALES et al., 2009). Apresentam hipoplasia acentuada da pituitária (OLIVEIRA; SALVATORI; KRAUSS et al., 2003), visto que o GHRH é importante para o desenvolvimento dos somatotrofos hipofisários, conforme relatados nas primeiras descrições de mutações nulas do receptor do GHRH (MURRAY; MAHESHWARI; RUSSEL et al., 2000; NETCHINE; TALON; DASTOT et al., 1998). Além da hipófise, apresentam também tamanho reduzido de alguns órgãos corrigidos pela superfície corpórea (tireoide, coração, útero e baço) (ALCÂNTARA; SALVATORI; SILVA et al., 2006; BARRETO-FILHO; ALCÂNTARA; BARRETO et al., 2002; OLIVEIRA; SALVATORI; KRAUSS et al., 2003; OLIVEIRA; MARQUES-SANTOS; BARRETO-FILHO et al., 2006; OLIVEIRA; SALVATORI; NÓBREGA et al., 2008) e aumentado de outros também corrigidos pela superfície corpórea (pâncreas, rins e fígado) (OLIVEIRA; SALVATORI; NÓBREGA et al., 2008). Exibem aumento do percentual (%) de massa gorda (principalmente na região truncal e visceral), associada a uma diminuição da massa magra (BARRETO; GILL; FREITAS et al.,

1999; BARRETO-FILHO; ALCÂNTARA; SALVATORI et al., 2002; GOMES-SANTOS; SALVATORI; FERRÃO et al., 2014). Contudo, apresentam maior resistência periférica à fadiga, demonstrando função muscular satisfatória (ANDRADE-GUIMARÃES; AGUIAR-OLIVEIRA; SALVATORI et al., 2019), são ativos, tem notável equilíbrio postural e de marcha e sem aumento no risco de quedas (SANTANA-RIBEIRO; MOREIRA-BRASILEIRO; AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2019). Também apresentam aumento nos níveis de colesterol total e LDL-C, aumento da pressão arterial sistólica sem hipertrofia ventricular (BARRETO-FILHO; ALCÂNTARA; SALVATORI et al., 2002), com aumento da sensibilidade insulínica e da adiponectina e níveis normais de leptina (OLIVEIRA; SALVATORI; MENEGUZ-MORENO et al., 2010; OLIVEIRA, SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012). Apesar de alguns indivíduos com DIGH apresentarem diabetes mellitus (VICENTE; ROCHA; SALVATORI et al., 2013), não tem aterosclerose prematura, com longevidade normal (AGUIAR-OLIVEIRA; OLIVEIRA; PEREIRA et al., 2010; BARBOSA; SALVATORI; OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA; MARQUES-SANTOS; BARRETO-FILHO et al., 2006).

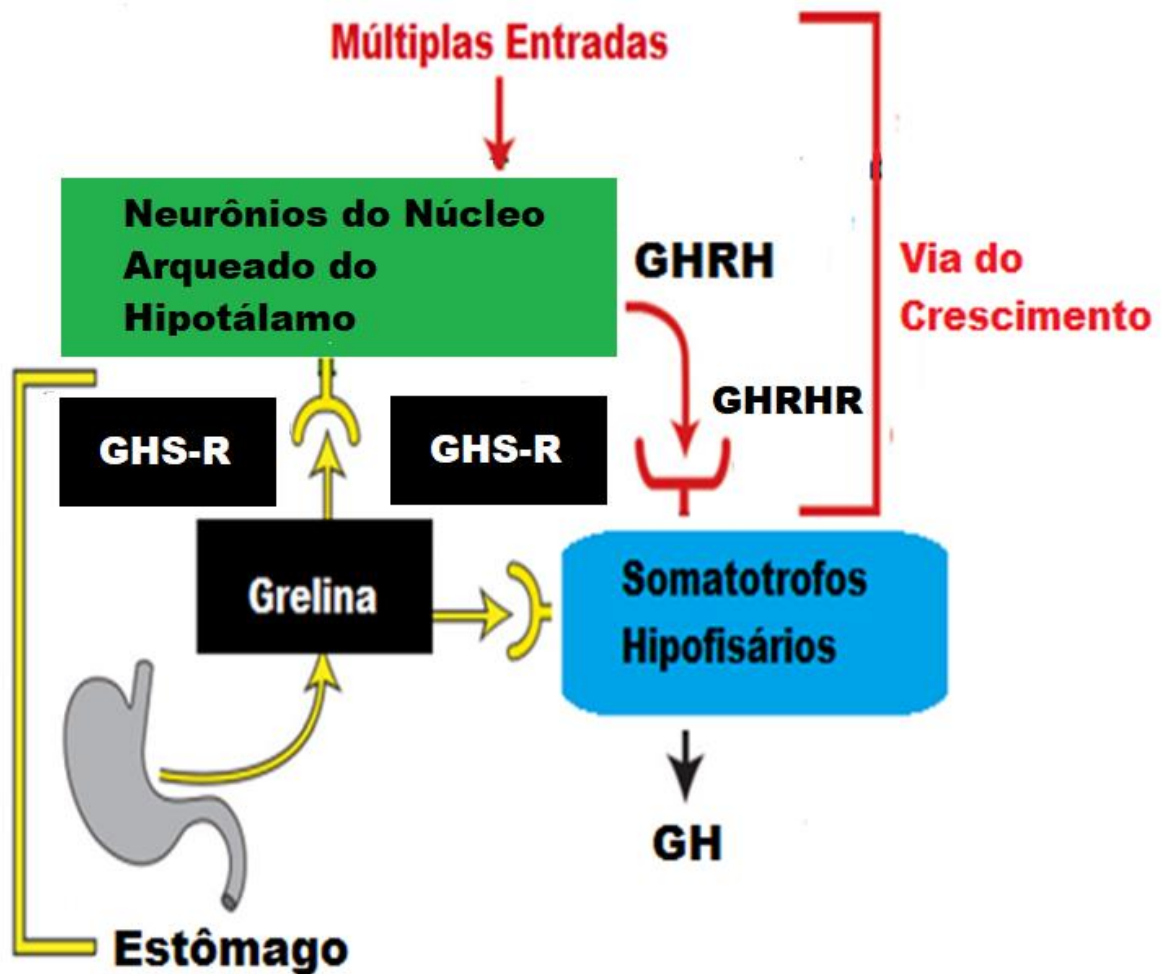
Sendo assim, apesar de apresentarem fatores contribuintes para as doenças cardiovasculares, não parecem exibir suas consequências e tem qualidade de vida normal (AGUIAR-OLIVEIRA; OLIVEIRA; PEREIRA et al., 2010). Dados prévios mostram que indivíduos com DIGH, após a ingestão de um teste com carga oral de glicose apresentam maior área sobre a curva (AUC) de glicose com AUC para insulina similar a controles, traduzindo redução da função das células beta e aumento da sensibilidade à insulina. (OLIVEIRA; SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012). Além disso, o grupo com DIGH apresenta um maior consumo energético que controles normais quando corrigido pelo peso corporal (OLIVEIRA-SANTOS; SALVATORI; GOMES-SANTOS et al., 2016). Este maior consumo pode corresponder a maior secreção de grelina, que será avaliada neste estudo.

2.3 Grelina

A grelina é um peptídeo orexígeno constituído por 28 aminoácidos (TSCHÖP; WAWARTA; RIEPL et al., 2001). É um hormônio produzido principalmente no estômago e que atua em somatotrofos na hipófise para liberar o GH (GOLDSTEIN; ZHAO; LI et al., 2011), sendo o ligante natural para o GHS-R tipo 1 (Figura 7) (PRUDOM; LIU; PATRIE et al., 2010). A grelina também pode ser produzida, em menor quantidade, na porção distal do

trato gastro intestinal (duodeno, jejuno, íleo, ceco), no hipotálamo, pâncreas, tireoide, rim, testículo e placenta, embora as concentrações nestes tecidos sejam baixas e pouco contribui nos níveis de circulação da grelina (IWAKURA; KANGAWA; NAKAO, 2015).

Figura 7 Modelo que ilustra dois caminhos distintos para liberação do hormônio do crescimento (GH). A via mediada pela grelina (em amarelo), a qual atua durante a fome prolongada e não é essencial para o crescimento corporal. A via do GHRH (em vermelho), a qual é fundamental para o crescimento corporal e desempenha uma menor função durante a fome prolongada



Adaptação de Goldstein, Zhao, Li et al. (2011).

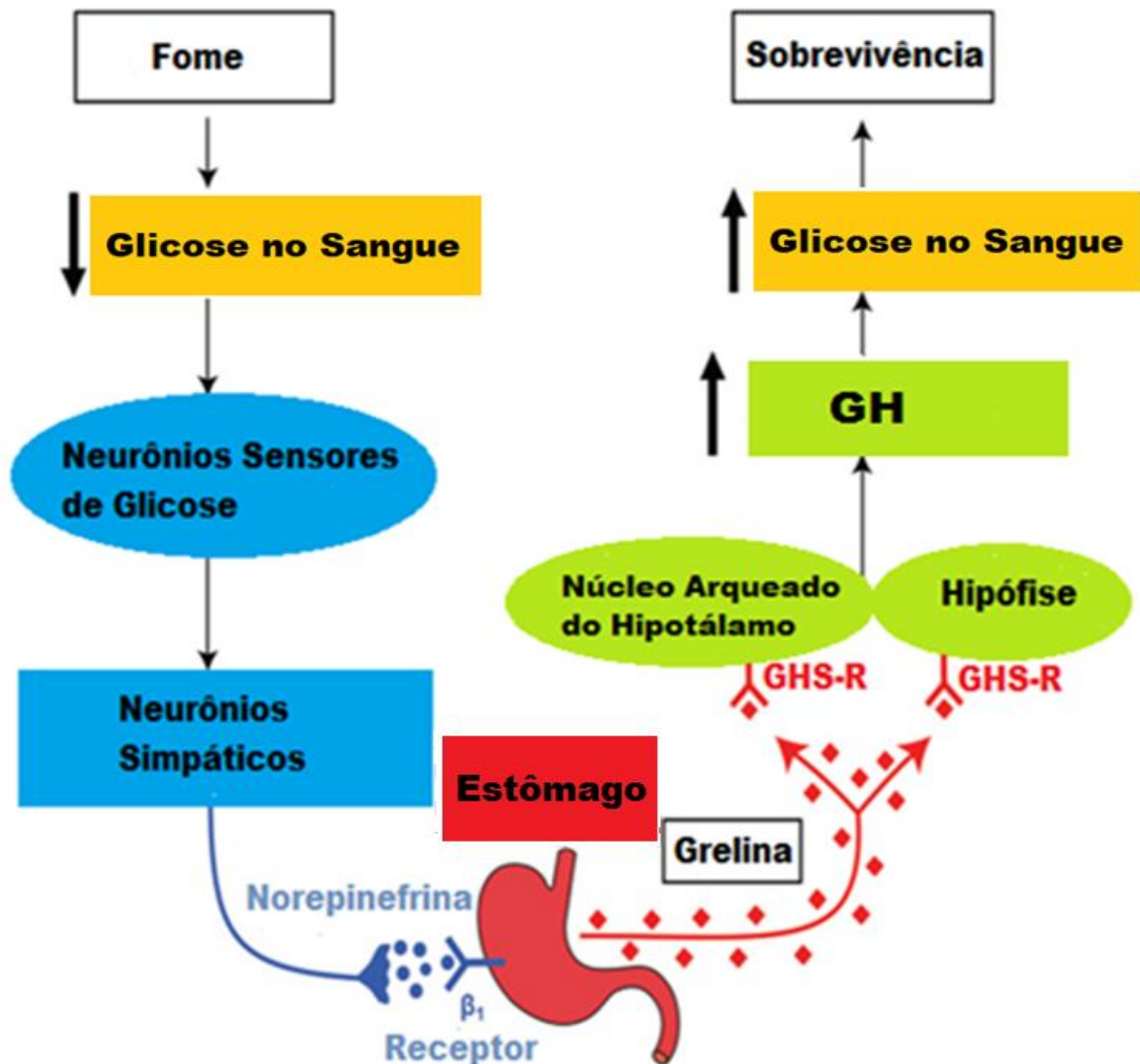
O principal local de produção da grelina é o estômago, estabelecendo um eixo estômago-grelina-hipófise-GH. Dessa forma, pode haver uma interação da secreção da grelina do estômago, com o GHRH e a somatostatina hipotalâmicos. A grelina estimula a secreção de GH, a elevação dos níveis circulantes de GH provoca uma redução na secreção da grelina e sua diminuição (como no envelhecimento) parece aumentar a secreção de grelina (QI; REED; ENGLANDER et al., 2003).

A grelina exerce vários efeitos no organismo dos indivíduos. Dentre estes podemos destacar a estimulação da secreção do GH e da ingestão alimentar, a secreção de ácido gástrico, o esvaziamento gástrico, a oxidação de glicose e a lipogênese, a supressão da utilização de gordura e a diminuição da secreção de insulina (IWAKURA; KANGAWA; NAKAO, 2015). Por outro lado, o GH estimula a lipólise e a produção de glicose. Tanto a grelina quanto o GH são suprimidos pela ingestão de nutrientes, especialmente glicose (ENGSTROM; BURMAN; HOLDSTOCK et al., 2003).

O nível de grelina na circulação apresenta um ritmo circadiano, visto que aumenta antes e diminui após as refeições (principalmente após 1 hora) (Figura 1), sugerindo seu papel no início da alimentação e na saciedade (CUMMINGS; PURNELL; FRAYO et al., 2001; IWAKURA; KANGAWA; NAKAO, 2015). Sendo assim, o jejum eleva os níveis de grelina no plasma e a ingestão alimentar reduz. Estas observações suportam o conceito de que a grelina estimula o apetite e promove a ingestão alimentar em seres humanos. Sabe-se que os níveis de grelina plasmáticos pós-prandiais diminuem em proporção a quantidade de calorias ingeridas e a composição dos nutrientes das refeições. Outros mecanismos atuam indiretamente na secreção da grelina, por exemplo, hormônios gastrintestinais ou pancreáticos. Dentre estes hormônios pode-se destacar o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), peptídeo inibitório gástrico (GIP), péptido YY (PYY), colecistoquinina (CCK) e insulina. Estes hormônios desempenham vários papéis na digestão e absorção de nutrientes, no metabolismo da glicose e na regulação da saciedade (IWAKURA; KANGAWA; NAKAO, 2015).

Por outro lado, a fome prolongada reduz os níveis de glicose sanguínea, ativando o sistema nervoso simpático que libera norepinefrina na parede do estômago, estimulando a secreção de grelina, a qual atua no hipotálamo e na hipófise estimulando a secreção de GH, mantendo os níveis de glicose no sangue, mesmo com a depleção dos estoques de gordura corporal (Figura 8) (GOLDSTEIN; ZHAO; LI et al., 2011).

Figura 8 Modelo que mostra a resposta metabólica da grelina à períodos de fome prolongada em camundongos



Adaptação de Goldstein, Zhao, Li et al. (2011).

A grelina apresenta-se em duas isoformas: a ativa (grelina acilada) e a inativa (grelina desacilada). A grelina acilada é responsável pela sinalização da fome, liberação de GH e apresenta ação metabólica (BEGLINGER; MEYER-GERSPACH; GRAF et al., 2014; PRUDOM; LIU; PATRIE et al., 2010). Esta forma apresenta um tempo de meia-vida curto, ao redor de 30 minutos, após ser liberada. Em seguida é convertida para sua forma inativa, a grelina desacilada (GUTIERREZ; SOLENBERG; PERKINS et al., 2008). Os níveis de grelina ativa e total aumentam durante o jejum e são suprimidos pela ingestão de alimentos, particularmente carboidratos (ERDMANN; TOPSCH; LIPPL et al., 2004). A grelina acilada atua como um ligante endógeno do GHS-R (NAKAZATO; MURAKAMI; DATE et al., 2001; WREN; SMALL; WARD et al., 2000). Há dois subtipos de GHS-R: 1a e 1b, contudo, nos

seres humanos somente o tipo 1a é funcional. Já o tipo 1b é biologicamente inativo. Além das funções citadas, a grelina também tem papel na função cardíaca, eixo gonadal, função imune, metabolismo energético, secreção de insulina, inflamação, apoptose, neurodegeneração e na proliferação celular. (AMITANI; AMITANI; CHENG et al., 2017; GNANAPAVAN; KOLA; BUSTIN et al., 2002).

A grelina regula a ingestão alimentar homeostática, a alimentação hedônica e é um mediador em resposta ao estresse. A grelina e seu receptor (GHS-R) apresentam funções centrais e periféricas, visto que são encontrados extensivamente em todo o corpo (BUSS; PETER; HAVEL et al., 2014). Com o suprimento energético baixo, a grelina é secretada pelo trato gastrointestinal e age centralmente no núcleo arqueado hipotalâmico, através da ativação do peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP) e do neuropeptídeo Y (NPY), e também estimula os nervos aferentes vagais (AMITANI; AMITANI; CHENG et al., 2017; DATE; KANGAWA, 2012), funcionando como um fator fisiológico para iniciar as refeições (CUMMINGS; PURNELL; FRAYO et al., 2001). Há evidências de que, mesmo em condições de saciedade, a grelina aumenta em resposta a ingestão de alimentos saborosos (como doces), sugerindo que a sinalização central da grelina pode conduzir ao consumo alimentar hedônico na ausência de necessidade calórica (MONTELEONE; SCOGNAMIGLIO; MONTELEONE et al., 2013). O estresse também, eleva a grelina via resposta neurológica a estressores (BUSS; PETER; HAVEL et al., 2014).

Além disso, a grelina atua na saúde metabólica e cardiovascular, uma vez que contribui para a diminuição da resistência à insulina, menor pressão arterial e frequência cardíaca. A pressão arterial pode ser reduzida pela grelina por mecanismos centrais e periféricos, com elevação da ação diurética, aumento da produção de óxido nítrico renal, e diminuição da hipertensão induzida pelo sal (BUSS; PETER; HAVEL et al., 2014). Também, melhora a disponibilidade de óxido nítrico pela vasodilatação do endotélio e pela ação antioxidante, através da redução da geração da superóxido intravascular com inibição da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato de hidrogênio (NAD(P)H) oxidase. Atuando dessa forma como efeito anti-inflamatório adicional (VIRDIS; DURANTI; COLUCCI et al., 2015).

Também, apresenta efeitos antienvhecimento através da redução da inflamação e estimulação da secreção do GH e do IGF-I. A grelina está positivamente relacionada ao tamanho dos telômeros, o qual é um marcador para o envelhecimento celular. Quanto maior o tamanho dos telômeros, menor os fatores de risco para diabetes e mortalidade. Contudo, esses efeitos positivos podem ser atenuados na obesidade, visto que a grelina encontra-se reduzida

ou resistente nesses indivíduos (BUSS; PETER; HAVEL et al., 2014). A tabela 2 mostra os principais efeitos fisiológicos da grelina (PERCHARD; CLAYTON, 2017).

Tabela 2 Efeitos Fisiológicos da Grelina.

Sistema	Efeito
Nervoso	↑ Appetite Alterações do olfato e paladar Alteração da aprendizagem Ritmo circadiano Neuroproteção ↓ Atividade do Sistema Nervoso Simpático
Gastrointestinal	↑ Mobilidade gástrica e intestinal ↑ Esvaziamento gástrico e secreção ácida
Pâncreas	↓ Secreção de insulina ↑ Sensibilidade a insulina
Hepático	↑ Secreção de IGF-I
Tecido Adiposo	↓ Oxidação de gordura ↑ Lipogênese ↓ Inflamação
Cardíaco	↑ Contração Cardíaca e vasodilatação

Adaptação de Perchard e Clayton (2017).

Estudos apotam que o aumento endógeno nos níveis de grelina antes das refeições contribui para a secreção antecipada de GLP-1, assim como observado em roedores. O mecanismo que leva a grelina aumentar a secreção de GLP-1, em resposta a ingestão alimentar, pode estar associada a aceleração do esvaziamento gástrico (TONG; DAVIS, GASTALDELLI et al., 2016).

2.4 GLP-1

O anorexígeno GLP-1 é formado por 36 aminoácidos, secretado pelas células enteroendócrinas L do trato gastro intestinal, principalmente no íleo e no cólon (GANGON; BAGGIO; DRUCKER et al., 2015; KREYMAN; GHATEI; WILLIAMS et al., 1987; LINDQVIST; SHCHERBINA; FISCHER et al., 2017). A supressão deste hormônio é regulada em resposta a ingestão de nutrientes, ação do sistema nervoso parassimpático e hormônios metabólicos, como a CCK, GIP, leptina e insulina. A grelina também pode estimular a produção de GLP-1, visto que o pico da grelina ocorre imediatamente antes das

refeições, possibilitando, uma preparação da célula L intestinal para liberação de GLP-1 induzida por nutrientes, principalmente carboidratos e gorduras (GANGON; BAGGIO; DRUCKER et al., 2015).

O GLP-1 atua como um sinal de saciedade e redução do consumo alimentar (GANGON; BAGGIO; DRUCKER et al., 2015). Dessa forma desempenha um papel importante no mecanismo "freio ileal" (promove ajustes no estômago e motilidade intestinal após a ingestão de alimentos) que causa um fluxo moderado e estável (digestível) de nutrientes do estômago para o intestino delgado. Mecanismo pelo qual age controlando o apetite (ZANDER; MADSBAD; MADSEN et al., 2002).

Este peptídeo é liberado rapidamente na circulação após a ingestão de nutrientes orais, sua secreção ocorre em um padrão bifásico com início (10 a 15 min), seguida de um período mais longo (30 a 60 min), figura 1. A meia vida plasmática do GLP-1 intacto é de aproximadamente 2 minutos, já o metabolito dele é de 5 minutos aproximadamente. O GLP-1 é degradado pela enzima dipeptidil peptidase IV e a principal rota de eliminação do GLP-1 é através do rim por mecanismos de filtração glomerular, captação tubular e catabolismo (BAGGIO; DRUCKER, 2007)

A ação do GLP-1 ao estimular a secreção de insulina contribui para aumentar a captação de glicose pelo músculo, fígado e tecido adiposo. Com isso, ocorre a síntese do glicogênio muscular e hepático e a lipogênese. Durante o estado de jejum subsequente, possibilita a liberação de glicose por mobilização do glicogênio e lipólise, associada a supressão da produção de glicose hepática (BAGGIO; DRUCKER, 2007; NADKARNI; CHEPURNY; HOLZ, 2014).

O GLP-1 atua na homeostase energética, inibição da ingestão alimentar, retardo do esvaziamento gástrico e na motilidade intestinal. Também, contribui para a regulação a longo prazo da secreção de insulina, potencializada pela glicose, nas células- β das ilhotas pancreáticas e retarda a apoptose ou promove a regeneração e estimulação da proliferação das mesmas, o que contribui para a manutenção de sua funcionabilidade. Dessa forma, atua como efeito 'incretina', ao controlar a função do pâncreas endócrino, e promover uma maior depuração de glicose, atuando como uma importante ferramenta terapêutica no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (BEGLINGER; MEYER-GERSPACH; GRAF et al., 2014; GANGON; BAGGIO; DRUCKER et al., 2015; NADKARNI; CHEPURNY; HOLZ, 2014; SILVA; BLOOM, 2012).

A ação redutora da glicose mediada pelo GLP-1 é intensificada pela sua forte inibição da secreção de glucagon, tornando-o importante para o tratamento do DM2. Essa ação ocorre

pela estimulação da insulina e da secreção de somatostatina via receptores de GLP-1 expressos em células beta e delta. Visto que, além do GLP-1, a somatostatina também é um potente supressor da liberação de glucagon (HEER; RASMUSSEN; COY et al., 2008). O GLP-1 contribui significativamente para melhor resposta insulínica e controle metabólico após a cirurgia bariátrica em pacientes obesos. Visto que após este procedimento, há um aumento deste hormônio, o qual encontra-se reduzido na obesidade (FALKÉN; HELLSTRÖM; HOLST et al., 2011).

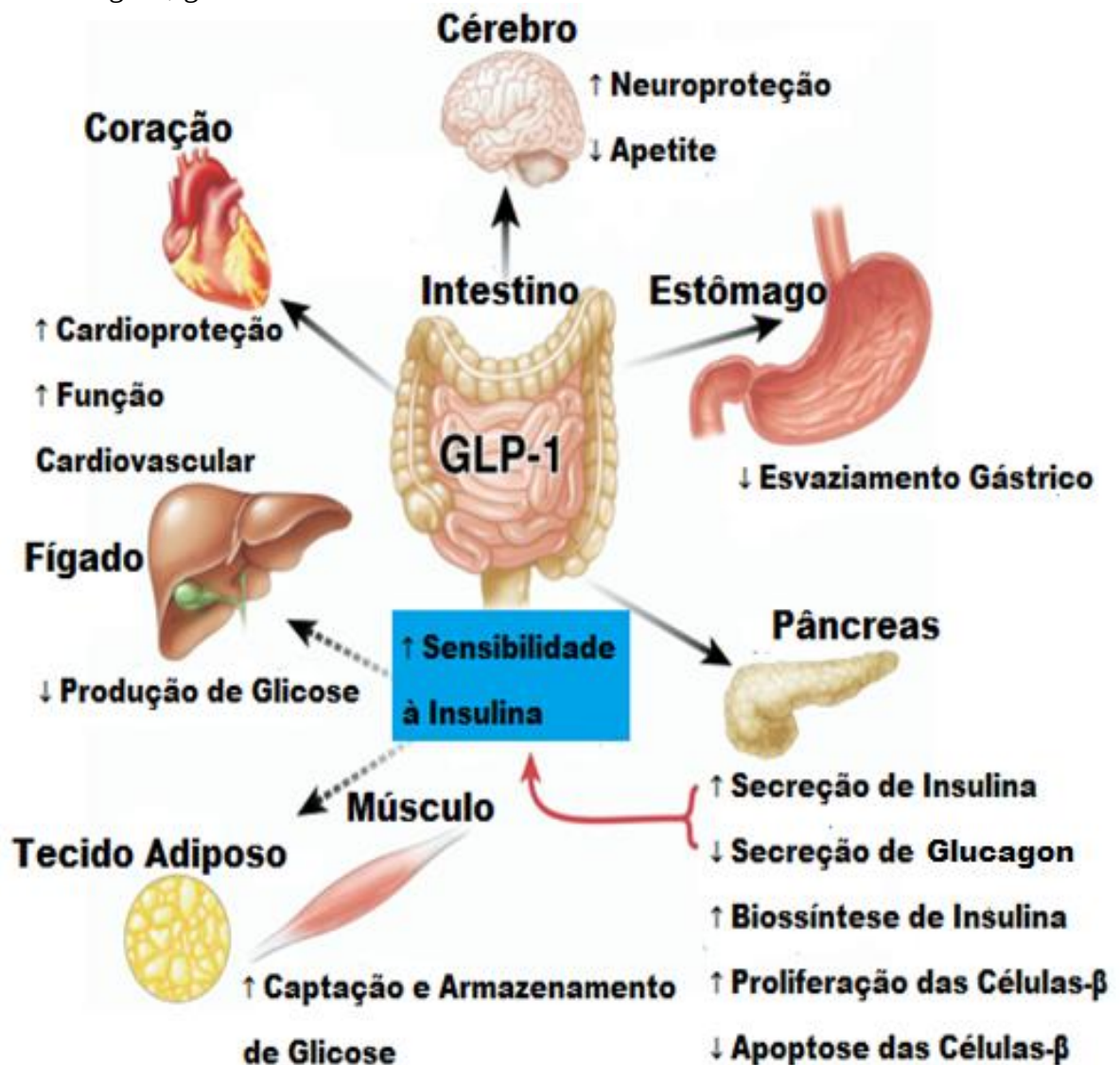
Cada vez mais, análogos do GLP-1 vem sendo usados para tratar ou reverter a síndrome metabólica, com suas consequências cardiovasculares. Os agonistas do GLP-1 melhoram o controle metabólico através da redução dos níveis de glicose sanguínea, via estimulação da secreção de insulina (glicose-dependente), supressão do glucagon, redução da glicemia de jejum e dos níveis de glicose no sangue pós-prandial, da hemoglobina glicada, dos níveis de ácido graxo livres no plasma, além de diminuir o apetite. São eficazes no tratamento do DM2 e da obesidade, pois atuam no controle glicêmico e na perda de peso. Promovem surpreendentes ações neuroprotetoras, melhora do perfil lipídico, redução da inflamação e benefícios cardiovasculares. (BAGGIO; DRUCKER 2007; BAGGIO; USSHER; MCLEAN et al., 2017; KANG; JUNG, 2016; NADKARNI; CHEPURNY; HOLZ, 2014).

O GLP-1 apresenta ações extrapancreáticas por modular o metabolismo e a função miocárdica. Atua positivamente nos parâmetros cardiovasculares, por interação direta no coração ou indiretamente através de melhorias mediadas pelo GLP-1 nos níveis de glicose, insulina e ácidos graxos livres. Este hormônio pode ajudar na vascularização do miocárdio e promover alterações satisfatórias nos marcadores para doença cardiovascular. Particularmente, pode aumentar agudamente a captação de glicose no miocárdio. Sendo assim, contribui para melhorar a função cardíaca e proteger contra isquemias miocárdicas. Apresenta efeitos redutores da pressão arterial, o qual pode ser justificado pela vasodilatação acompanhada pela resistência periférica total, levando a uma taquicardia reflexa e pela ação diurética e natriurética (BAGGIO; DRUCKER, 2007; KANG; JUNG, 2016; MATHER; CONSIDINE; HAMILTON et al., 2018; NADKARNI; CHEPURNY; HOLZ, 2014).

As ações cardiovasculares do GLP-1 têm ganhado respaldo, visto que os agonistas do GLP-1 são usados para tratar indivíduos que possam estar em risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estudos em animais e clínicos apotam que o GLP-1 reduz a inflamação no endotélio vascular, melhorando a função endotelial, promove vasodilatação, que leva a uma melhor estabilidade, fluxo sanguíneo e redução da agregação plaquetária. Sendo assim, o GLP-1 atua na redução do risco para doença vascular

aterosclerótica, o que diminui o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral e a combinação de ambos (SINHA; GHOSAL, 2019). A figura 9 mostra as principais ações do GLP-1.

Figura 9 Principais ações do GLP-1 em tecidos periféricos. A maioria dos efeitos do GLP-1 são mediados pela interação direta com GLP-1Rs em tecidos específicos. Porém há ações do GLP-1 no fígado, gordura e músculo



Adaptação de Baggio e Drucker (2007).

2.5 Sensações de Apetite

As sensações subjetivas de apetite, fome e saciedade apresentam componentes objetivos (incondicionados ou fisiológicos) e subjetivos (condicionados ou aprendidos). Essa ação pode ser influenciada pela interação de diversos fatores. Dentre estes destacamos, eventos fisiológicos, psicológicos e fatores externos, tais como refeições, atividade física,

temperatura, clima, desejos de comer alimentos específicos, redução de tensão, pressão social e tédio, dentre outros fatores (FLINT; RABEN; BLUNDELL et al., 2000; GRAAF; BLOM; SMEETS et al., 2004; STUBBS; HUGHES; JOHNSTONE et al., 2000).

A expressão do apetite é observada na relação entre três níveis operacionais: o nível dos eventos psicológicos e comportamentais, da fisiologia periférica e do sistema nervoso central (BLUNDELL; LAWTON; COTTON et al., 1996). O apetite consiste em uma força motriz interna para a busca, escolha e ingestão de alimentos, o qual pode ser mensurado de duas formas. Primeiro, pode ser medido por avaliações subjetivas, pela capacidade de introspecção, pode-se classificar a força do desejo consciente ou motivação para comer. Podem ser utilizadas as escalas analógicas visuais (EAV) para determinar este apetite. Segundo, pode ser medido pelo consumo atual de alimentos, ou seja, a quantidade de alimentos consumidos em um determinado período. Nessa mensuração os alimentos são pesados e/ou quantificados. Contudo, há diversos fatores que podem influenciar o apetite e ingestão alimentar atual: fatores cognitivos (restrição dietética) e fatores externos (disponibilidade, propriedades hedônicas do alimento e circunstâncias sociais). Ambas medidas conseguem estimar o apetite quando utilizadas de forma padronizada (GRAAF; BLOM; SMEETS et al., 2004).

Em relação a fome podemos considerar o apetite por uma refeição, e o desejo de comer associado a uma sensação agradável desencadeada por um alimento saboroso. A plenitude consiste a uma sensação de estômago satisfeito e/ou cheio, a qual pode estar associada à saciedade que atua como fatores que influenciam a terminação e determinam a iniciação da refeição (consumo alimentar prospectivo). O termo fome pode ser considerado a oposição da saciedade. A terminação de refeição e à saciedade depende de sinais como distensão do estômago, hormônios gastrointestinais (CCK e GLP-1, leptina, insulina e grelina) e a combinação dos nutrientes da refeição. (GRAAF; BLOM; SMEETS et al., 2004).

Sendo assim, as classificações de fome, desejo de comer, apetite por uma refeição ou consumo alimentar prospectivo, antes de uma refeição, relacionam-se com a ingestão subsequente de alimentos. Enquanto as avaliações de saciedade ou plenitude não se relacionam com a próxima refeição (FLINT; RABEN; BLUNDELL et al., 2000).

As sensações subjetivas do apetite podem ser mensuradas, de forma objetiva e quantitativa, com o auxílio da EAV. Uma vez que possibilita prever o comportamento alimentar e atua como mecanismo útil para estimar as medidas de ingestão de alimentos, energia e nutrientes. São sensíveis a manipulações experimentais e tem uma boa reprodutibilidade. As EAV são apresentadas em formato padronizado, na maioria das vezes

são compostas por linhas (de comprimento variável) com perguntas fixadas em cada extremidade, as quais apresentam respostas opostas. As escalas apresentam a vantagem de serem de fácil e rápida aplicação, simples interpretação, não requerem que os entrevistados pensem em seus próprios termos descritivos. Se usadas apropriadamente, tornam-se reprodutíveis, sensíveis às exposições de componentes alimentares e previsíveis do consumo alimentar (FLINT; RABEN; BLUNDELL et al., 2000; STUBBS; HUGHES; JOHNSTONE et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as conexões enteroendócrinas entre glicose, insulina, grelina, GLP-1, e as sensações de apetite, antes e após uma refeição padrão em indivíduos adultos com DIGH.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as concentrações basais de glicose, insulina, grelina e GLP-1 em indivíduos com DIGH.
- Avaliar os escores basais das sensações de fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo em indivíduos com DIGH.
- Avaliar as concentrações de glicose, insulina, grelina e GLP-1 após uma refeição teste padronizada nos indivíduos com DIGH.
- Avaliar as sensações de fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo após a refeição teste padronizada em indivíduos com DIGH.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Tipo do Estudo

Estudo transversal realizado em indivíduos com DIGH, com grupo controle.

4.2 Delineamento do Estudo

Foram avaliadas as dosagens bioquímicas basais de glicose, insulina, grelina e GLP-1, e as sensações de fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo antes e em 30, 60, 120 e 180 minutos após uma refeição teste padronizada. A sensibilidade à insulina foi estimada pelo modelo homeostático de avaliação da insulino-resistência (HOMA-IR), e a função das células β foi estimada através do HOMA- β .

4.3 Casuística

O estudo foi realizado com 20 (11 homens) DIGH e 20 (11 homens) controles pareados por idade e sexo. Os participantes foram recrutados voluntariamente por anúncio colocado na sede da Associação de crescimento físico e humano de Itabaianinha. A coleta de dados foi realizada no Hospital Universitário de Sergipe, em grupos de 5 a 6 indivíduos por dia.

Os critérios de inclusão para o grupo DIGH foram: baixa estatura e genótipo confirmado para mutação homozigótica $c.57 + 1G \rightarrow A$ no gene do receptor GHRH, e para o grupo controle foram: indivíduos com estatura e genótipo homozigótico normais para o alelo do tipo selvagem. Os critérios de exclusão foram: idade inferior a 25 anos e superior a 80 anos, uso de glicocorticoides, GH, levotiroxina ou sedativos ou drogas estimulantes psiquiátricas.

Os participantes deste estudo são residentes na cidade de Itabaianinha e realizaram a genotipagem para a mutação em questão, pela técnica do produto de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a mutação. O respectivo exame foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Dr. Roberto Salvatori na Universidade Johns Hopkins, em Baltimore/EUA, utilizando o sistema *TaqMan® SNP Genotyping Assay C_15757069_10* (Applied Biosystems, Foster City, CA). A PCR e a detecção da fluorescência final foram realizadas no sequenciador *Prism ABI 7900HT*, com protocolos fornecidos pelos fabricantes.

4.4 Variáveis

As variáveis estudadas foram: gênero, idade (anos), peso (kg), altura (m), índice de massa corpórea – IMC (kg/m^2), IGF-I (ng/ml), glicose (mg/dl), insulina ($\mu\text{U/ml}$), grelina (pg/ml), GLP-1 (pg/ml), HOMA-IR e HOMA- β . Também foram avaliadas as variáveis subjetivas de fome, saciedade e consumo alimentar prospectivo.

4.5 Métodos

4.5.1 Medidas Antropométricas

As medidas antropométricas foram aferidas no primeiro momento da pesquisa. A altura dos indivíduos foi medida com o auxílio de um estadiômetro montado na parede (estadiômetro digital de parede modelo HM210D; *Charder Medical Weighing and Measuring Products, Taichung City Taiwan, R.O.C*). Os participantes ficaram de pé, descalços, com os calcanhares juntos, costas retas e braços estendidos ao longo do corpo. O peso corporal foi aferido em balança digital portátil (modelo MS2510, *Charder platform scale, Taichung City, Taiwan*). No momento da pesagem os indivíduos estavam com roupas leves e descalços. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela fórmula: $\text{Peso}/(\text{Altura})^2$, utilizando-se as referências da Organização Mundial de Saúde (OMS).

4.5.2 Dieta Teste Padrão

A dieta teste era composta por 70g de dieta em pó a base de proteína isolada de soja, hipossódica, isenta de sacarose, lactose e glúten (Figura 10). Apresentava uma composição nutricional de 315 Kcal, distribuída em relação ao Valor Calórico Total (VCT) em carboidratos 56% (44,1 g), lipídeos 30% (10,5 g) e proteínas 14% (11 g). A refeição foi preparada com o auxílio de um mixer e diluída em água até volume final de 250 ml.

Figura 10 Ilustração da produção da dieta teste padrão



4.5.3 Teste com Refeição

Foi realizado teste com refeição padronizada no Hospital Universitário de Sergipe. Os participantes estavam em jejum de cerca de 10 horas. Inicialmente um cateter para acesso venoso periférico foi inserido para a coleta do sangue imediatamente antes da ingestão e em intervalos de 30, 60, 120 e 180 minutos após a ingestão da refeição teste padronizada. Esta tinha que ser consumida em até 10 minutos (Figura 11).

Figura 11 Indivíduo com DIGH e Controle antes da ingestão da dieta



Foto Autorizada pelos participantes

Nos tempos especificados para coleta de sangue, os participantes também responderam um questionário validado de EAV sobre as sensações de fome, plenitude e de consumo alimentar prospectivo (Anexo A) (FLINT; RABEN; BLUNDELL et al., 2000). O questionário apresentava linhas horizontais sem graduação, cortadas em pedaços de papel da mesma altura e com 10 centímetros de comprimento. Questões foram colocadas acima de cada linha com respostas opostas em seus extremos. Os indivíduos assinalaram na linha o que mais correspondia a seus sentimentos no momento da pergunta, e a distância entre o extremo esquerdo da linha até a marca assinalada foi quantificada, com pontuações que variavam de 0 a 10 (STUBBS; HUGHES; JOHNSTONE et al., 2000).

O termo fome consiste em uma ideia subjetiva utilizada para expressar a motivação para comer. A primeira questão aplicada foi “Quanta fome você sente?”. As respostas nas extremidades da EAV eram “Eu não estou com fome alguma” e “Eu nunca estive com tanta fome” (STUBBS; HUGHES; JOHNSTONE et al., 2000).

A expressão saciação relaciona-se a fatores que influenciam o término de uma refeição, já o termo saciedade refere-se aos determinantes para o início de uma refeição. A saciação está relacionada a dois fatores principais (CAMILLERI; GRUDELL, 2007; GRAAF; BLOM; SMEETS et al., 2004). Um destes é o sentimento de plenitude após uma refeição, que pode estar correlacionado a sensação de prazer ou satisfação, ou, contrariamente, pode ser desconfortável. O outro fator são os processos sensoriais relacionados ao declínio da satisfação durante a alimentação (CAMILLERI; GRUDELL, 2007; GRAAF; BLOM; SMEETS et al., 2004; TUOMISTO; TUOMISTO; HETHERINGTON et al., 1998). A segunda pergunta do questionário foi “O quanto você se sente satisfeito?”. As respostas nas extremidades da EAV foram “Eu estou completamente vazio” e “Eu estou totalmente cheio” (STUBBS; HUGHES; JOHNSTONE et al., 2000).

O consumo alimentar prospectivo refere-se ao desejo de comer, o qual é considerado mais fácil e concreto do que o questionamento sobre a fome (GRAAF; BLOM; SMEETS et al., 2004). A terceira pergunta do questionário foi “O quanto você acha que pode comer?”. As respostas nas extremidades da EAV foram “Nada” e “Muito” (FLINT; RABEN; BLUNDELL et al., 2000).

4.5.4 Dosagens Bioquímicas

Foram avaliadas as concentrações basais de glicose, insulina, grelina, GLP-1 e IGF-I nos dois grupos, após jejum de cerca de 10 horas. A glicose, a insulina, a grelina e o GLP-1 foram dosados nos seguintes tempos: 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 180 minutos após a ingestão de refeição teste padronizada. Em cada momento, foram coletados 10 ml de sangue.

As amostras sanguíneas foram colocadas em tubos resfriados contendo Na₂-EDTA (1mg/ml). O plasma foi imediatamente separado por centrifugação a 4°C. As amostras plasmáticas para dosagem de grelina total e GLP-1 foram armazenadas a -70°C e transportadas em recipiente lacrado envolvidas com gelo seco para o Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –

Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). As amostras foram descongeladas apenas uma vez, no momento da dosagem.

A glicose foi medida pelo teste colorimétrico enzimático de Trinder no mesmo dia de cada teste. O IGF-I foi medido por um ensaio imunométrico quimioluminescente marcado com enzima em fase sólida (*Immulite 2000; Siemens Health care Diagnostics Products Ltd, Malvern, PA*), com uma sensibilidade de 25 ng/ml. A insulina foi medida por um imunoensaio quimioluminescente de micropartículas (*Architect; Abbott Laboratories Diagnosis Division, Abbott Park IL*) com sensibilidade de 1,0 µU/ml. Essas medidas foram realizadas no laboratório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

As concentrações de grelina total no plasma (ref. EZGRT-89K) e GLP-1 (ref. EZGLP1T-36K) foram determinadas por kits de ensaio ELISA (*EMD Millipore Corporation, St. Charles, MO*), com sensibilidades de 4,1 pg/ml e 159,4 pg/ml, respectivamente. Estes ensaios quantificam a grelina total (intacta e des-octanoilada) e GLP-1 total (isoformas 7-36 e 9-36). A especificidade do ensaio da grelina inclui grelina humana (ativa) a 80%, grelina humana desacilada a 100% e grelina canina a 70%. O par de anticorpos utilizado no ensaio de GLP-1 mede o GLP-1 (isoformas 7-36) e (isoformas 9-26) e não possui uma reatividade cruzada significativa com GLP-2, GIP, glucagon e oxintomodulina. Foi utilizado dois controles de qualidade para cada ensaio. Para a grelina, nossos resultados foram 607,15 pg/mL (faixa esperada de 371 a 771 pg/ml) e 2504 pg/ml (faixa esperada de 1545 a 3209 pg/ml). Para o GLP-1, nossos resultados foram de 41,1 pg/ml (intervalo esperado de 31 a 65 pg/ml) e 304,2 pg/mL (faixa esperada de 172 a 357 pg/ml).

4.5.5 Sensibilidade à Insulina e Função das Células β

A sensibilidade à insulina foi estimada pelo índice de resistência à insulina do modelo de homeostase (HOMA-IR), com a fórmula: insulina sérica em jejum (µU/ml) x glicose plasmática em jejum (mmol/litro)/22,5. Menores valores indicam maior sensibilidade insulínica. A função das células β foi estimada usando os valores basais de glicose e insulina pelo HOMA- β com a fórmula: $[(20 \times \text{insulina de jejum (}\mu\text{U/ml)})/(\text{glicemia de jejum (mmol/litro)} - 3,5)]$. Menores valores indicam menor função das células β .

4.6 Análise Estatística

As variáveis com distribuição normal foram expressas em média (desvio-padrão) e comparadas pelo teste t de Student. As variáveis com distribuição não normal (insulina, HOMA-IR, HOMA- β , grelina e GLP-1) foram expressas em mediana (distância interquartilica) e comparadas pelo teste de Mann Whitney (Software *IBM SPSS Statistics 23*, Estados Unidos, 2015). O software Origin 9.1 (*Origin Lab Corporation One Roundhouse Plaza Northampton, MA 01060 USA, 2013*) foi utilizado para calcular as áreas sob as curvas (AUC) de glicose, insulina, grelina, GLP-1, fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo, com o teste de refeição padrão. A diferença média e o intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculado para estas comparações. A diferença do intervalo de confiança entre os dois grupos que não contém zero implica uma diferença significativa entre os grupos. Também foram realizadas comparações para as variáveis estudadas a cada momento após a refeição pelo teste de Mann Whitney, com significância estatística de $p < 0,05$.

4.7 Aspectos Éticos

Este estudo é um desdobramento do projeto de pesquisa “*Consequências de deficiência isolada e vitalícia do GH*” e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe com o parecer de número 043/204 e registro no CONEP sob o número 10212 (Anexo B). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados Basais

Os resultados antropométricos e basais de glicose, IGF-I, insulina, grelina, GLP-1, fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo estão apresentados na Tabela 3. Como esperado os dados de altura ($p<0,0001$), peso ($p<0,0001$) e IGF-I ($p<0,0001$) foram mais baixos no grupo com DIGH. Confirmando dados anteriores do nosso grupo, mais uma vez encontramos a glicose ($p=0,0157$), insulina ($p=0,002$), HOMA-IR ($p=0,002$) e HOMA- β ($p=0,023$) menores na DIGH que nos controles, não houve diferença para os valores basais das outras variáveis (Tabela 3).

Tabela 3 Dados antropométricos e basais de glicose, IGF-I, insulina, grelina, GLP-1, fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo de 20 indivíduos com DIGH e 20 controles. Os dados são expressos em média (desvio padrão), exceto para insulina, IGF-I, HOMA-IR, HOMA- β , grelina e GLP-1 expressos em mediana (distância interquartilica)

	DIGH	Controles	p
Idade	49,4 (13,4)	48,6 (13,6)	0,889
Homens	11	11	1
Altura (m)	1,3 (0,1)	1,6 (0,1)	<0,0001
Peso (kg)	40,6 (6,4)	77,8 (15,0)	<0,0001
IMC (kg/m²)	25,8 (5,1)	28,4 (3,7)	0,051
Glicose (mg/dl)	102,8 (18,3)	125,4 (22,5)	0,0157
IGF-I (ng/ml)	25,0 (3,4)	165,5 (29,2)	<0,0001
Insulina (μU/ml)	3,9 (5,5)	7,7 (3,7)	0,002
HOMA-IR	0,9 (1,5)	2,2 (1,2)	0,002
HOMA-β	12,3 (13,9)	20,4 (11,9)	0,023
Grelina (pg/ml)	595,7 (507,4)	553,7 (364,9)	0,433
GLP-1 (pg/ml)	32,2 (12,0)	33 (20,4)	0,862
Fome	4,3 (3,0)	3,3 (2,1)	0,219
Plenitude	1,9 (1,7)	2,8 (1,9)	0,155
Consumo alimentar prospectivo	3,8 (1,7)	4,4 (2,0)	0,292

O gráfico 1 avalia os valores de IMC dos indivíduos com DIGH e controles. Os gráficos 2 e 3 mostram a comparação do HOMA-IR e HOMA- β nos dois grupos.

Gráfico 1 Valores de IMC entre indivíduos do grupo DIGH (n=20) e controle (n=20)

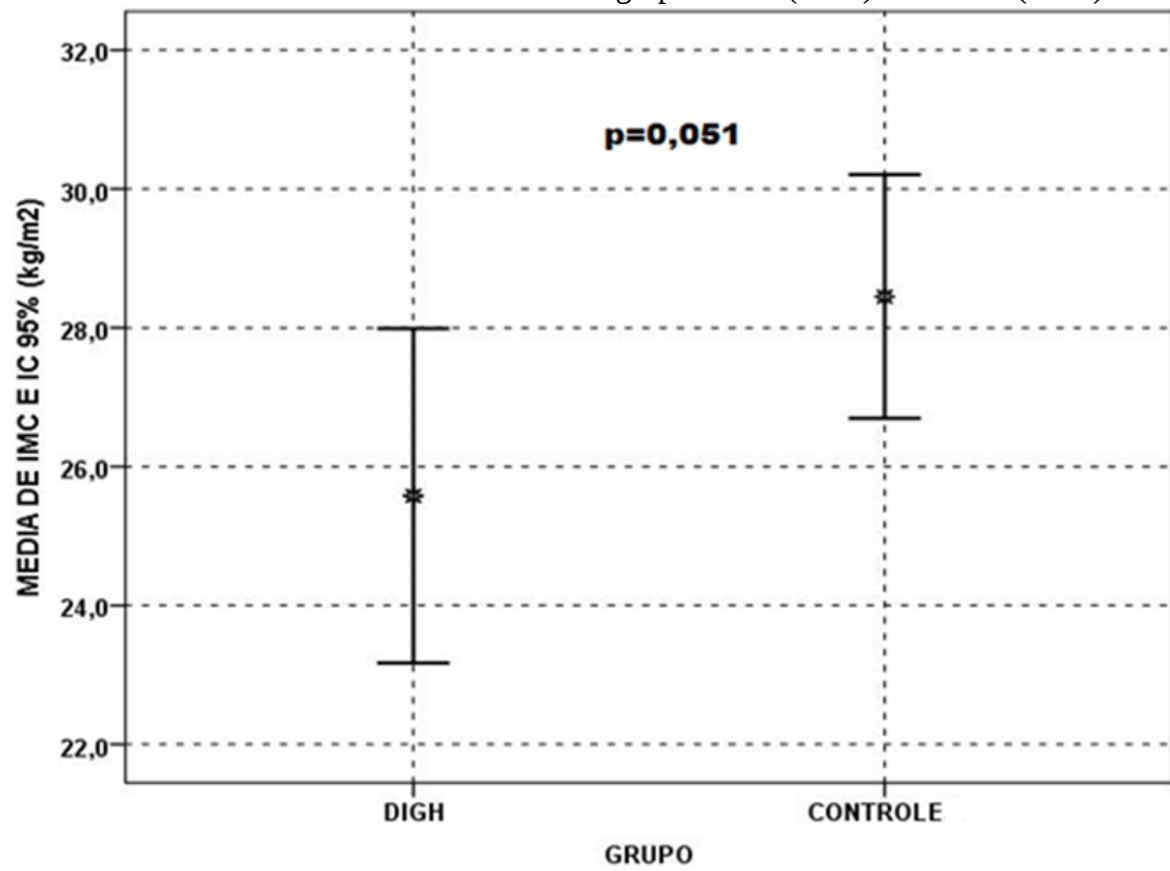


Gráfico 2 Valores de HOMA-IR entre indivíduos do grupo DIGH (n=20) e controle (n=20)

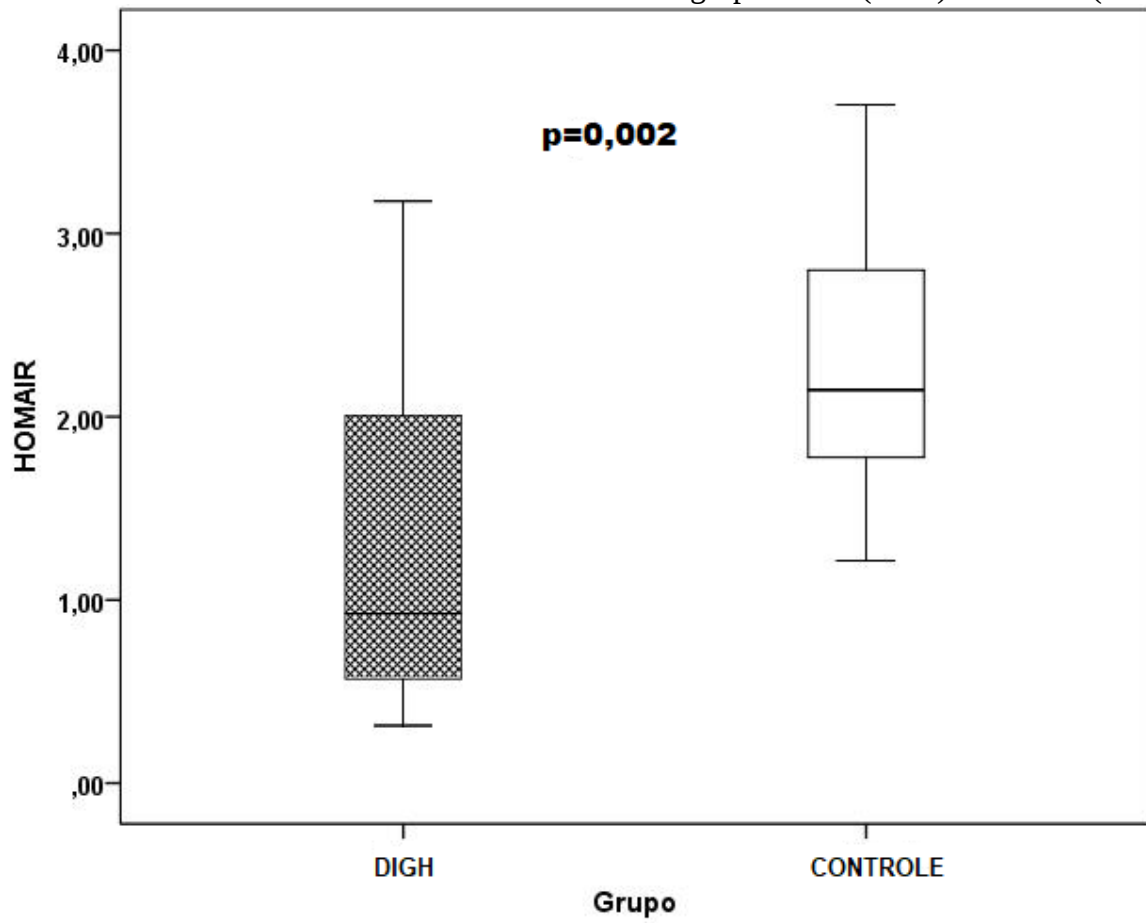
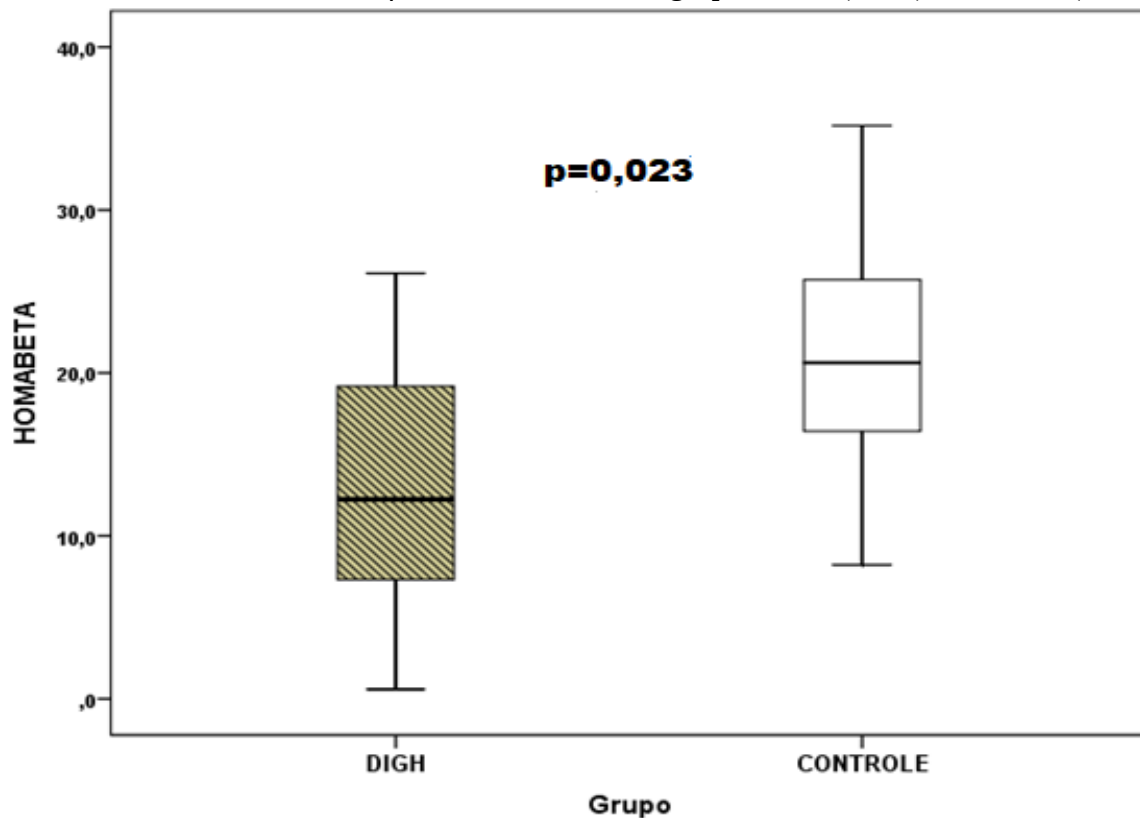


Gráfico 3 Valores de HOMA- β entre indivíduos do grupo DIGH (n=20) e controle (n=20)



5.2 Resultados Pós Refeição

Ao comparar as variáveis estudadas em cada momento após a refeição teste foi observada uma tendência de maior valor para glicose aos 120 minutos ($p=0,06$), e um maior nível de insulina aos 180 min ($p=0,009$), GLP-1 aos 30 min ($p=0,021$) e aos 120 min ($p=0,035$). A AUC para a fome foi maior nos indivíduos com DIGH do que nos controles [773,3 (98,9) vs 578,3 (93,5), diferença média 195,0; IC de 95%, 133,4 a 256,6 ($p<0,0001$)] (Gráfico 4). Espelhando este achado, a plenitude foi menor no grupo com DIGH em comparação com os controles [649,9 (89,9) vs 816,3 (87,6), diferença média 166,4; IC de 95%, 109,6 a 223,2 ($p<0,0001$)] (Gráfico 5). Nenhuma diferença foi observada na AUC para consumo alimentar prospectivo entre os dois grupos [776,1 (86,3) vs. 751,6 (87,8); diferença média de 24,5; IC de 95%, -31,2 a 80,2 ($p=0,3793$)], DIGH vs. controle, respectivamente (Gráfico 6).

Gráfico 4 AUC dos níveis de fome após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média)

Fome

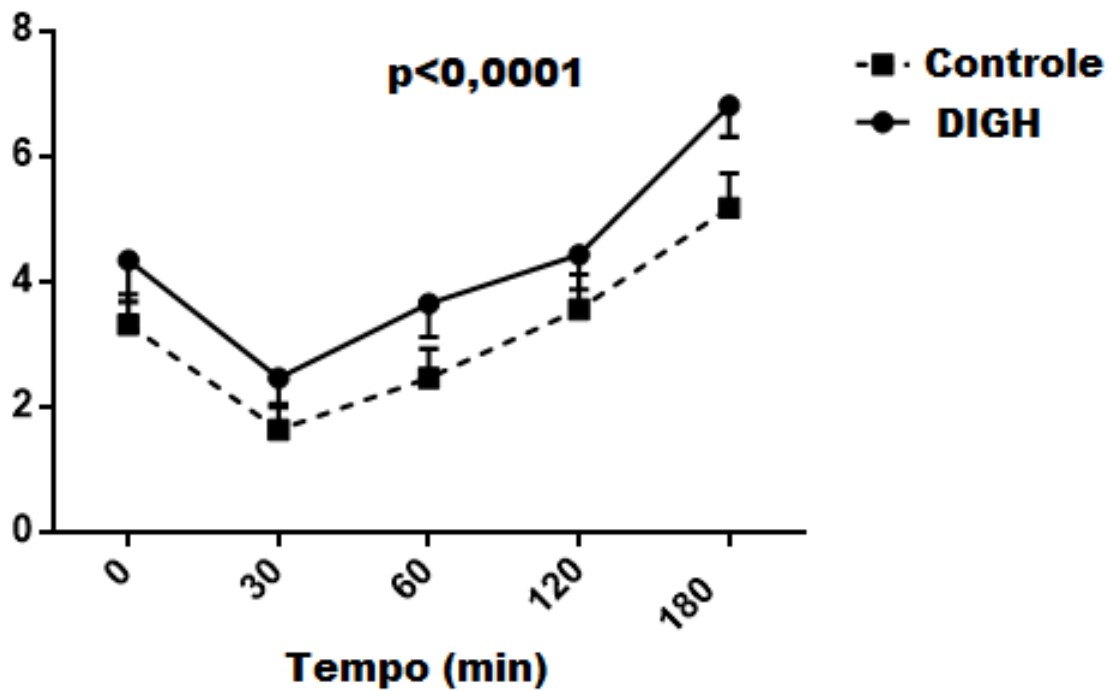


Gráfico 5 AUC dos níveis de plenitude após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média)

Plenitude

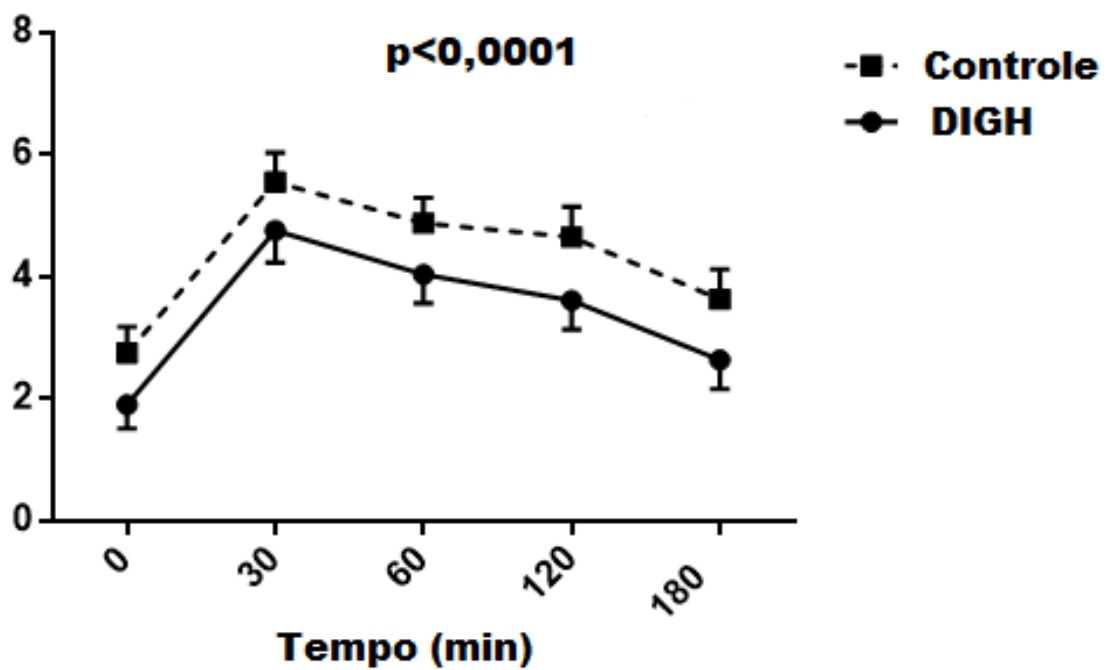
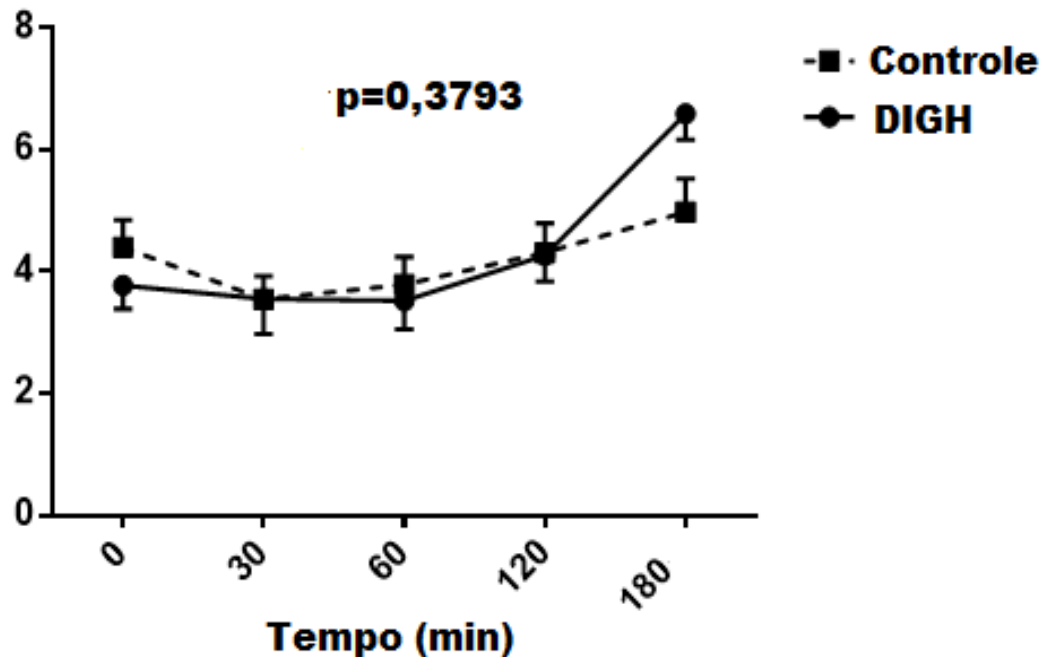


Gráfico 6 AUC dos níveis de consumo alimentar prospectivo após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média)

Consumo Alimentar Prospectivo



Os gráficos 7, 8, 9, 10 mostram a AUC da glicose, insulina, grelina e GLP-1, respectivamente. AUC para glicose foi maior nos indivíduos com DIGH do que nos controles [27608,2 (1647,8) vs. 26149,5 (1983,6) mg/dl, diferença média de 1458,7; IC de 95%, 291,4 a 2, 626 ($p=0,0157$)]. A AUC para insulina foi semelhante nos dois grupos [7457,5 (1151,5) vs. 7255,6 (1079,2) μ U/ml, diferença média 201,9; IC de 95%, -512,5 a 916,3 ($p=0,57$)], respectivamente. A AUC para a grelina também foi maior no grupo com DIGH [131570,2 (21575,4) vs. controles 106205,6 (10141,2) pg/ml, diferença média de 25364,6; IC de 95%, 14573,0 a 36156,2 ($p<0,0001$)]. Similarmente, a AUC para o GLP-1 foi maior nos indivíduos com DIGH [12049,1 (1844,9) vs. 8442,9 (855,0) pg/ml, diferença média 3606,2; IC de 95%, 2685,7 a 4526,7 ($p<0,0001$)].

Gráfico 7 AUC dos níveis de glicose após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média)

Glicose (mg/dl)

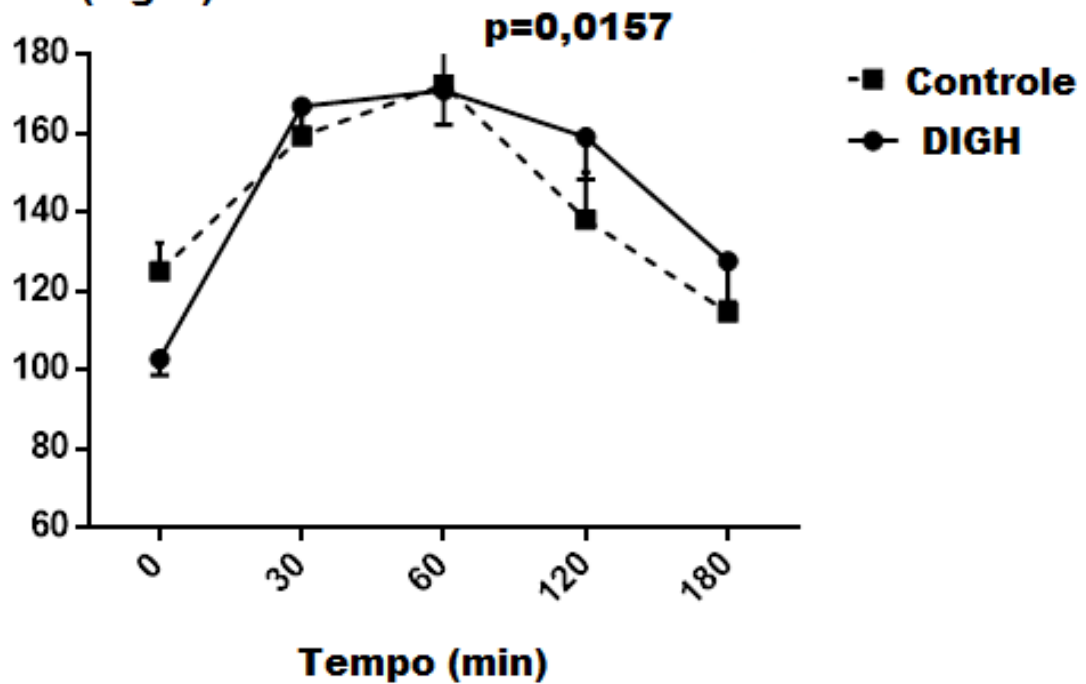


Gráfico 8 AUC dos níveis de insulina após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média)

Insulina (μU/ml)

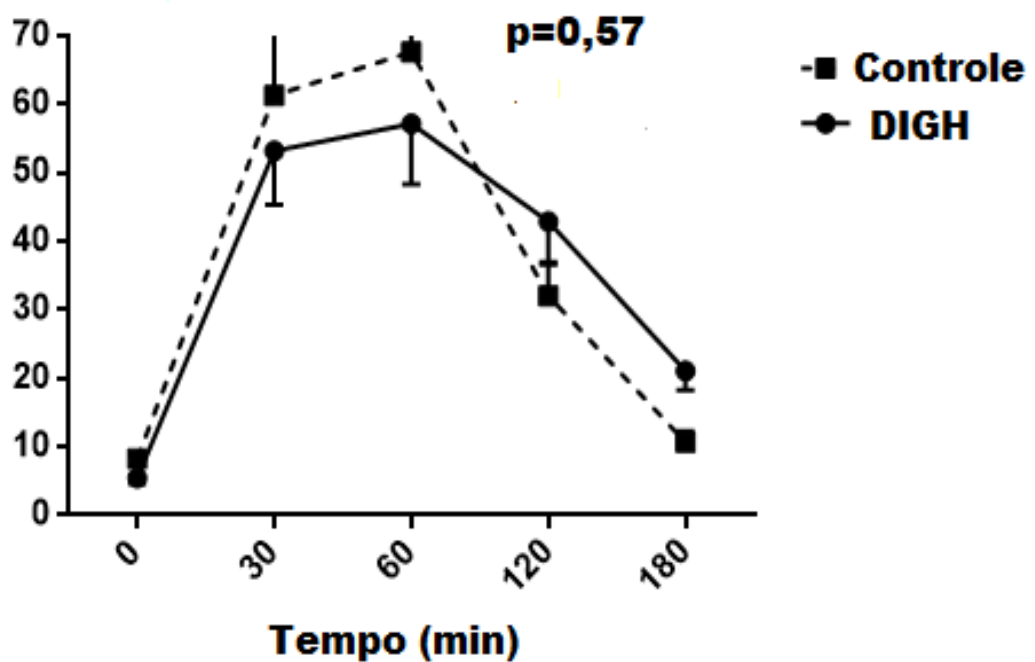


Gráfico 9 AUC dos níveis de grelina após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média)

Grelina (pg/ml)

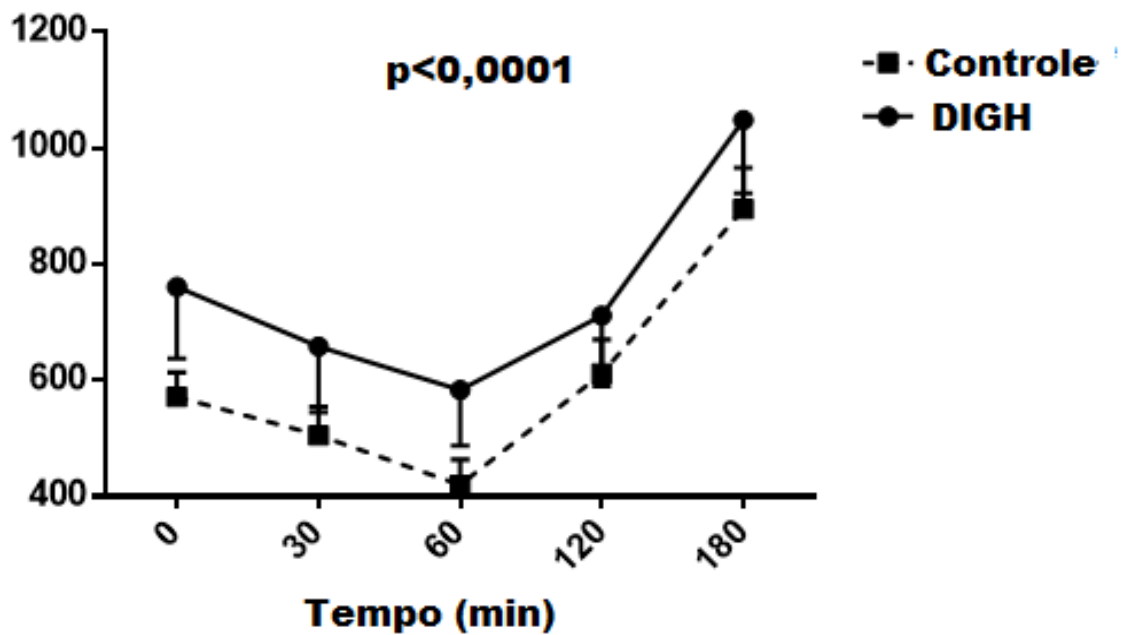
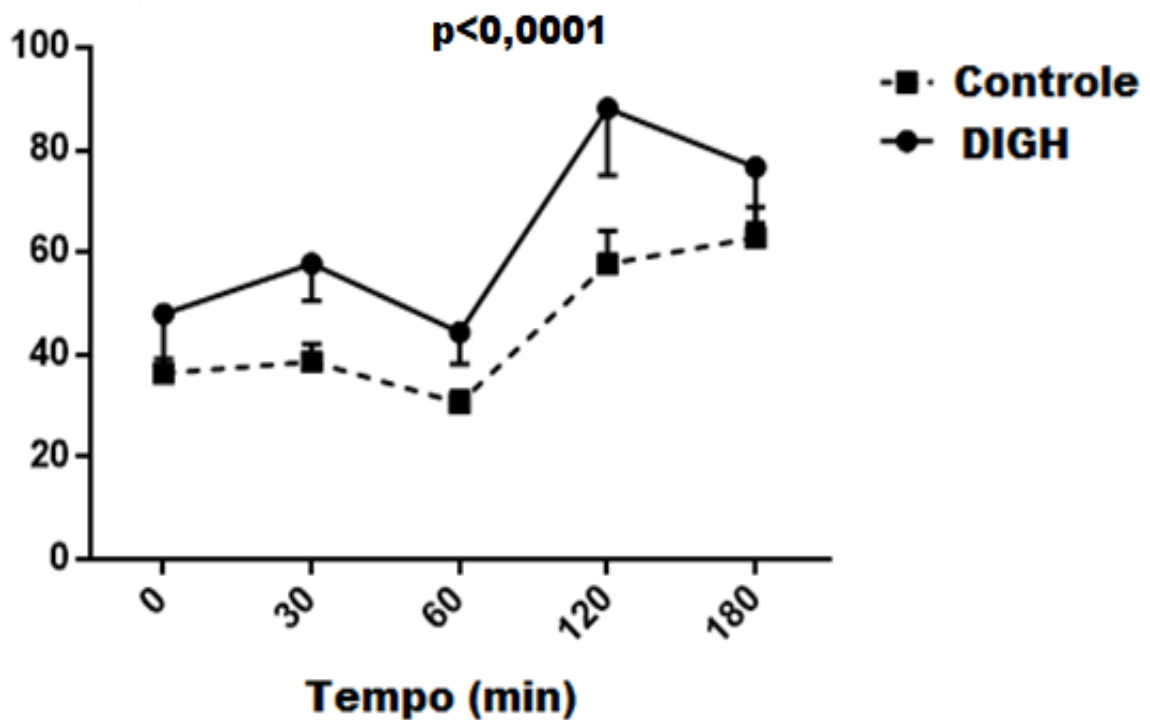


Gráfico 10 AUC dos níveis de GLP-1 após uma refeição teste padrão. Os dados são expressos por média (erro padrão da média)

GLP-1 (pg/ml)



6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar as consequências da DIGH vitalícia na secreção de grelina e GLP-1 induzida pela refeição, e nas sensações de apetite. Para este fim, avaliamos indivíduos homozigotos afetados pela DIGH, todos apresentavam à mesma mutação do GHRHR. Este modelo único permite estudar as consequências da DIGH em pessoas que têm uma função hipofisária normal em relação aos demais hormônios. Indivíduos com DIGH foram comparados com controles normais da mesma região e eram pareados por sexo e idade. Enquanto a altura e o peso, como esperado, foram bastante reduzidos no grupo com DIGH, o IMC foi marginalmente menor (não alcançando significância) no grupo DIGH. O IMC neste modelo não é um bom marcador de adiposidade, visto que reflete ossos e músculos pequenos, embora a porcentagem de massa gorda seja semelhante nos dois grupos, os indivíduos com DIGH têm maior adiposidade visceral (GOMES-SANTOS; SALVATORI; FERRÃO et al., 2014).

Os dados basais mostraram que a glicose, a insulina, o HOMA-IR e o HOMA- β foram menores no grupo DIGH, como relatado por Oliveira, Salvatori, Barreto-Filho et al. (2012). A grelina, o GLP-1 e as sensações de apetite na linha de base não foram diferentes entre os grupos.

Ao comparar as variáveis em cada momento, após refeição mista padrão, observou-se diferenças leves na glicemia e na insulina, sem diferenças para a grelina e maiores valores de GLP-1 aos 30 e aos 120 minutos. No entanto, os indivíduos com DIGH apresentaram maior AUC para fome, glicose, grelina e GLP-1 do que os controles, enquanto nenhuma diferença estava presente na AUC para insulina. Esses dados concordam com os resultados anteriores obtidos com o teste oral de tolerância à glicose (TTGO), mostrando maior AUC para glicose e AUC semelhante para insulina em comparação aos controles (OLIVEIRA; SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012), reforçando que estes indivíduos combinam redução da função das células beta a um aumento da sensibilidade à insulina, semelhante ao descrito na coorte equatoriana de indivíduos com insensibilidade ao GH (GUEVARA-AGUIRRE; BALASUBRAMANIAN; GUEVARA-AGUIRRE et al., 2011), e em camundongos com nocaute do gene do receptor de GH (GHRKO) (ARUM; BOPARAI; SALEH et al., 2014; ARUM; SALEH; BOPARAI et al., 2014). O estímulo com a glicose oral (TTGO) é fundamental para o diagnóstico de diabetes mellitus, ou diminuição da tolerância à glicose, mas o carboidrato simples pode aumentar mais rapidamente a estimulação de células secretoras de grelina no estômago, o que poderia suprimir a grelina de forma mais rápida e

mais forte do que as refeições mistas (PRODAM; MONZANI; RICOTTI et al., 2014). Por essa razão, decidimos usar um novo estudo com estímulo mais fisiológico através de uma refeição padrão mista.

Neste trabalho reproduzimos o padrão bem estabelecido de resposta da grelina e do GLP-1 após um teste de refeição. Os níveis de grelina plasmática atingem o pico antes das refeições e declinam significativamente após uma hora da ingestão da refeição (como mostramos no presente trabalho), com mudanças variando de 2 a 3 vezes ao longo do ciclo da alimentação-jejum em indivíduos saudáveis (IWAKURA; KANGAWA; NAKAO, 2015; CUMMINGS; PURNELL; FRAYO et al., 2001). Por outro lado, o GLP-1 é secretado na circulação após a ingestão de nutrientes orais, em um padrão bifásico começando com uma fase inicial (15 min) que é seguida por uma segunda fase mais longa (BAGGIO; DRUCKER, 2007), como também documentamos. Outro dado importante deste trabalho foi a utilização da AUC, além das comparações a cada momento, após a refeição. Com essa abordagem, obtivemos uma avaliação geral do comportamento de cada metabólito após a refeição, calculando de forma definida a integral concentração sanguínea metabólica versus o tempo, usando concentrações medidas nos cinco momentos no tempo.

No presente trabalho, observamos que os indivíduos com DIGH não tratados sentem mais fome e menos plenitude do que os controles. Esses dados se encaixam com a faísca que acendeu o presente trabalho: em estudo prévio foi observado que esses sujeitos comem proporcionalmente mais do que os controles, corrigido pelo peso corporal (OLIVEIRA-SANTOS; SALVATORI; GOMES-SANTOS et al., 2016). Esses indivíduos com DIGH são ativos, com baixa fadiga e função muscular satisfatória e adequada (ANDRADE-GUIMARÃES; AGUIAR-OLIVEIRA; SALVATORI et al., 2019), apresentam ótimo equilíbrio postural e de marcha e sem elevação no risco de quedas (SANTANA-RIBEIRO; MOREIRA-BRASILEIRO; AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2019). O aumento da fome pode ter contribuído por séculos para a sobrevivência apesar da baixa estatura, em um ambiente hostil com várias temporadas de escassez de alimentos, já que eles precisam trabalhar mais do que vizinhos normais para a sobrevivência e para manter as mesmas culturas. Com isso, a maior ingesta calórica nos indivíduos adultos com DIGH, pode garantir energia extra necessária para este trabalho. Por outro lado, o aumento da fome e a maior ingestão dos indivíduos com DIGH, podem estar relacionados ao aumento do gasto energético na termogênese e ou ao aumento da sua taxa metabólica, dado ainda não avaliado em nossa coorte. Recentemente, verificou-se que camundongos GHRHKO apresentam um aumento na atividade locomotora e

termogênica, fatores que podem contribuir para proteção contra o ganho de peso (LEONE; CHIAVAROLI; SHOHREH et al., 2015).

A explicação para este aumento da fome pode vir da maior AUC para a grelina. Enquanto o papel estimulatório da grelina na secreção de GH é atualmente inquestionável, os efeitos do eixo GH/IGF-I na secreção de grelina ainda são controversos, com alguns relatos de um feedback negativo entre o eixo GH/IGF-I na secreção de grelina (ENGSTRÖM; BURMAN; HOLDSTOCK et al., 2003; PERCHARD; CLAYTON, 2017) e outros mostrando que as concentrações séricas de grelina não são afetadas por mudanças crônicas na ação periférica de GH/IGF-I, como pode ser observado em modelos de camundongos com DIGH (NASS; LIU; HELLMANN et al., 2004). No atual trabalho, comprovamos que esta grave DIGH está associada a menor redução da grelina pós-prandial. Curiosamente, a obesidade visceral na DIGH pode contribuir para (GOMES-SANTOS; SALVATORI; FERRÃO et al., 2014) melhor sensibilidade à insulina (OLIVEIRA; SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012) com maiores níveis de adiponectina (OLIVEIRA; SALVATORI; MENEGUZ-MORENO et al., 2010). Por outro lado, a redução da função das células β (OLIVEIRA; SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012) e a hiperfagia destes indivíduos pode estar associada a menor redução da grelina.

A associação aparentemente paradoxal do aumento da sensibilidade à insulina com o aumento da adiposidade visceral também é encontrada em camundongos resistentes à GH (GHRKO), com alterações na atividade secretora da gordura visceral acompanhada por um aumento significativo nas concentrações de adiponectina (AL-REGAIEY; MASTERNAK; BONKOWSKI et al., 2005; MASTERNAK; BARTKE; WANG et al., 2012). O transplante de gordura visceral desses camundongos melhora a sensibilidade à insulina de camundongos normais, sugerindo um papel metabólico benéfico do tecido adiposo visceral em estados de ação abolida do GH e deficiência grave de IGF-I (BENNIS; SCHNEIDER; VICTORIA et al., 2017).

A redução da função das células β encontrada em nossos indivíduos com DIGH, a qual pode levar ao aparecimento do diabetes (OLIVEIRA; SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012), assemelha-se ao desenvolvimento reduzido e à função secretora das células β encontradas em camundongos anões Ames (BARTKE; BROWN-BORG, 2004) e camundongos GHRKO (LIU; COSCHIGANO; ROBERTSON et al., 2004). Os dados do presente estudo adicionam mais atores neste intrincado quebra-cabeça. Como a grelina parece aumentar a sensibilidade à insulina (PERCHARD; CLAYTON, 2017) e reduzir a função das células β (DEZAKI; HOSODA; KAKEI et al., 2004; PERCHARD; CLAYTON, 2017;

TONG; DAVIS; GASTALDELLI et al., 2016; WIERUP; YANG; MCEVILLY et al., 2004), a menor atenuação da grelina pós-prandial poderia ser um fator contribuinte para a redução da função das células β (OLIVEIRA; SALVATORI; BARRETO-FILHO et al., 2012). Por outro lado, como a grelina é um potente promotor de secreções de GLP-1 (GAGNON; BAGGIO; DRUCKER et al., 2015; LINDQVIST; SHCHERBINA; FISCHER et al., 2017; TONG; DAVIS; GASTALDELLI et al., 2016), especulamos que a alta secreção de grelina causa a maior secreção de GLP-1, contribuindo para o aumento da sensibilidade à insulina desses indivíduos com DIGH. Além disso, a redução da ação da somatostatina também pode contribuir para o aumento do GLP-1 considerando o ciclo da retroalimentação entre o GLP-1 e a somatostatina (HEER; RASMUSSEN; COY et al., 2008; SALVATORI; HAYASHIDA; AGUIAR-OLIVEIRA et al., 1999). Os níveis séricos de TSH discretamente aumentados nesses indivíduos, podem refletir a menor estimulação da somatostatina (GONDO; AGUIAR-OLIVEIRA; HAYASHIDA et al., 2007).

Independentemente do mecanismo, devido ao efeito vascular benéfico do GLP-1 (ALMUTAIRI; BATRAN; USSHER, 2019) e seus análogos (MARSO; DANIELS; BROWN-FRANSEN et al., 2016), essa secreção endógena aumentada de GLP-1 pode contribuir para o retardo do início da aterosclerose nesses indivíduos com DIGH (COSTA; OLIVEIRA; SALVATORI et al., 2016; OLIVEIRA; MARQUES-SANTOS; BARRETO-FILHO et al., 2006), e à expectativa de vida normal (AGUIAR-OLIVEIRA; OLIVEIRA; PEREIRA et al., 2010), apesar da obesidade visceral (GOMES-SANTOS; SALVATORI; FERRÃO et al., 2014), aumento da pressão arterial, colesterol total e LDL e proteína C reativa (BARRETO-FILHO; ALCANTARA; SALVATORI et al., 2002). Também, é possível que a maior secreção de grelina contribua para expectativa de vida normal, visto que a via de sinalização do receptor dos secretagogos da grelina-GH parece desempenhar um papel importante no mecanismo antienvhecimento (AMITANI; AMITANI; CHENG et al., 2017).

Nosso trabalho tem algumas limitações. Em primeiro lugar, os níveis mais elevados de glicose basal no grupo controle poderiam confundir os resultados. No entanto, a AUC para glicose foi menor neste grupo, tornando muito improvável que a maior glicose basal tenha contribuído para uma redução na AUC da glicose. Em segundo lugar, não medimos a acil-grelina ativa e a desacil-grelina inativa (DARDZIŃSKA; MAŁGORZEWICZ; KASKA et al., 2014; PRUDOM; LIU; PATRIE et al., 2010). No entanto, a medição da grelina total tem as vantagens de medir ambas as formas de grelina. A grelina total também é menos propensa à degradação (importante no nosso caso, já que as amostras precisavam ser transportadas a mais de 2.000 km do local de coleta), e é desejável quando níveis mais altos de grelina são

previstos, como no nosso caso. Outra questão preocupante é a possível degradação da grelina total, uma vez que não utilizamos extração de plasma com a adição de inibidores de protease e acidificação. Portanto, não podemos excluir a possível degradação da grelina ativa. No entanto, essa possível degradação provavelmente teria ocorrido tanto na DIGH quanto nos controles, permitindo a comparação entre os grupos. Além disso, a menor atenuação da grelina pós-prandial observada e o aumento do GLP-1 visto em ambos os grupos experimentais e controles sugerem a relevância biológica do nosso experimento. Para o ensaio de GLP-1, a extração e a acidificação não parecem ser críticas, seguindo as instruções do fabricante. Manuseio semelhante das amostras foi utilizado em um estudo recente, mostrando que o GLP-1 parece ser o principal candidato para promover uma resposta aumentada de insulina e controle metabólico após a cirurgia bariátrica em pacientes obesos (FALKÉN; HELLSTRÖM; HOLST et al., 2011).

Em resumo, a DIGH grave, vitalícia e não tratada está associada ao aumento da secreção de GLP-1 e a menor redução da grelina e da fome pós-prandial em resposta a uma refeição mista. Essas alterações enteroendócrinas podem resultar em um resultado favorável em termos de adaptação ambiental, proporcionando ingestão adequada de alimentos (maior quantidade de grelina total) e melhorando a sensibilidade à insulina (maior GLP-1). Essas mudanças podem contribuir para a expectativa de vida normal desses indivíduos, apesar de vários fatores de risco cardiovascular.

7 CONCLUSÕES

- As concentrações basais de glicose e insulina foram menores nos indivíduos com DIGH. Os valores basais de grelina e GLP-1 no grupo DIGH foram similares aos controles.
- Os escores basais das sensações de fome, plenitude e consumo alimentar prospectivo foram similares entre os indivíduos com DIGH e controles.
- A AUC da glicose foi maior nos indivíduos com DIGH e a da insulina foi similar aos controles. A AUC da grelina e a do GLP-1 foram maiores no grupo DIGH.
- A AUC da fome foi maior e a da plenitude menor nos indivíduos com DIGH. Não houve diferença na sensação de consumo alimentar prospectivo entre os grupos.

8 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

Conforme demonstramos, os indivíduos com DIGH apresentam área sobre a curva da secreção de ambos hormônios, grelina e GLP-1, maior que os controles. Este eixo entero-hormonal pode ter influência além dos mecanismos de ingestão alimentar, contribuindo para sua longevidade. Sabe-se que a restrição calórica retarda o envelhecimento, reduz mortalidade e estende a vida. A grelina é aumentada por restrição calórica e pode ter um importante papel na extensão da longevidade mediada pela restrição calórica. Os indivíduos com DIGH de Itabaianinha tem uma longevidade considerável, com alguns sendo centenários. Sabe-se que o GLP-1 além de potencializar a secreção de insulina, inibe a secreção de glucagon e exerce efeitos benéficos sobre o estado vascular, propriedades que despertam muito interesse no tratamento de pacientes diabéticos, reduzindo seu risco cardiovascular. Alternativamente uma hepatocina, o fator de crescimento do fibroblasto 21 (FGF-21) melhora a sensibilidade insulina e estende a duração da vida em camundongos, sendo um regulador imuno-metabólico útil para atrasar a senescência imunológica. Recente estudo mostrou que a ingestão de glicose, via insulina, estimula a secreção do FGF-21 (SAMMS; LEWIS; NORTON et al., 2017). Supomos que a refeição mista aumenta os níveis do FGF-21 no grupo DIGH de forma mais acentuada do que os controles, contribuindo junto com a grelina, para maior insulino-sensibilidade e longevidade. Pretendemos dosar o FGF-21, o co-receptor do FGF-21, o beta klotho, outra proteína moduladora do envelhecimento em todos os tempos, e o glucagon, agonista do FGF-21 nos tempos do atual protocolo. Destas formas avançaremos da questão nutricional e metabólica para a o atual tema da longevidade.

REFERÊNCIAS

AACE. American Association of Clinical Endocrinologists. **Medical guidelines for clinical practice for growth hormone use in adults and children.** Growth Hormone Guidelines, Endocr Pract. v. 9, n. 1, p. 64-76, 2003.

AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; GILL, M. S.; BARRETTO, E. S. A. et al. Effect of severe growth hormone (GH) deficiency, due to a mutation in the GH-releasing hormone receptor, on insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and ternary complex formation throughout life. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 11, p. 4118-4126, nov. 1999.

AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; BARTKE, A. Growth hormone deficiency: health and longevity. **Endocrine Reviews**, Copyright, v. 40, n. 2, p. 575-601, abr. 2019.

AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; OLIVEIRA, F. T.; PEREIRA, R. M. C. et al. Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 2, p. 714-721, fev. 2010.

ALCÂNTARA, M. R. S.; SALVATORI, R.; SILVA, P. R. A. et al. Thyroid Morphology and Function in Adults with Untreated Isolated Growth Hormone Deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 3, p. 860-864, mar. 2006.

ALMUTAIRI, M.; BATRAN, R. AL.; USSHER, J. R. Glucagon-like peptide-1 receptor action in the vasculature. **Peptides**, v. 111, p. 26-32, jan. 2019.

AL-REGAIEY, K. A.; MASTERNAK, M. M.; BONKOWSKI, M. et al. Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor 1/insulin signaling and caloric restriction. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 851-860, fev. 2005.

AMITANI, M.; AMITANI, H.; CHENG, K-C. et al. The Role of Ghrelin and Ghrelin Signaling in Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1511-1528, jul. 2017.

ANDRADE-GUIMARÃES, A. L.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; SALVATORI, R. et al. Adult individuals with congenital, untreated, severe isolated growth hormone deficiency have satisfactory muscular function. **Endocrine**, v. 63, n. 1 p. 112-119, Jan. 2019.

ANISIMOV, V. N.; BARTKE, A. A. The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. **The Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 87, n. 3, p. 201-223, set. 2013.

ARUM, O.; BOPARAI, R. K.; SALEH, J. K. et al. Specific suppression of insulin sensitivity in growth hormone receptor gene-disrupted (GHR-KO) mice attenuates phenotypic features of slow aging. **Aging Cell**, v. 13, p. 981-1000, 2014.

ARUM, O.; SALEH, J. K.; BOPARAI, R. K. et al. Preservation of blood glucose homeostasis in slow-senescing somatotrophism-deficient mice subjected to intermittent fasting begun at middle or old age. **Age**, v. 36, p. 1263-1290, jun. 2014.

ARVAT, E; MACCARIO, M.; DI VITO, L. et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in human: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1169-1174, mar. 2001.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131-2157, mai. 2007.

BAGGIO, L. L.; USSHER, J. R.; MCLEAN, B. A. The autonomic nervous system and cardiac GLP-1 receptors control heart rate in mice. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 11, p. 1339-1349, nov. 2017.

BARBOSA, J. A. R.; SALVATORI, R.; OLIVEIRA, C. R. P. et al. Quality of life in congenital, untreated, lifetime isolated growth hormone deficiency. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 894-900, jul. 2009.

BARRETO, V. M. P.; D'ÁVILA, J. S.; SALES, N. J. et al. Laryngeal and vocal evaluation in untreated growth hormone deficient adults. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, v. 140, n. 1, p. 37-42, 2009.

BARRETO-FILHO, J. A. S.; ALCÂNTARA, M. R. S.; BARRETO, M. A. et al. Familial isolated growth hormone deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 5, p. 2018–2023, mai. 2002.

BARRETTO, E. S. A.; GILL, M. S.; FREITAS, M. E. S. et al. Serum leptin and body composition in children with familial GH deficiency (GHD) due to a mutation in the growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. **Clinical Endocrinology**, v.51, p. 559-564, 1999.

BARTKE, A.; BROWN-BORG, H. Life extension in the dwarf mouse. **Curr Top Dev Biol**, v, 63, p. 189-225, 2004.

BEGLINGER, S.; MEYER-GERSPACH, A. C.; GRAF, S. et al. Effect of a Test Meal on Meal Responses of Satiety Hormones and Their Association to Insulin Resistance in Obese Adolescents. **Obesity**, v. 22, n. 9, p. 2047–2052, jun. 2014.

BENNIS, M. T.; SCHNEIDER, A.; VICTORIA, B. et al. The role of transplanted visceral fat from the long-lived growth hormone receptor knockout mice on insulin signaling. **GeroScience**, v. 39, n. 1, p. 51-59, fev. 2017.

BUSS, J.; HAVEL, P. J.; EPEL, E. et al. Associations of ghrelin with eating behaviors, stress, metabolic factors, and telomere length among overweight and obese women: Preliminary evidence of attenuated ghrelin effects in obesity? **Appetite**, v. 76, p. 84-94, mai. 2014.

CAMILLERI, M.; GRUDELL, A. B. M. Appetite and obesity: a gastroenterologist's perspective. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 19, p. 333-341, mai. 2007.

CHISHOLM, C.; GREENBERG, G. R. Somatostatin-28 regulates GLP-1 secretion via somatostatin receptor subtype 5 in rat intestinal cultures. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 283, n. 2, p. E311–E317, ago. 2002.

COSTA, U. M. M.; OLIVEIRA, C. R. P.; SALVATORI, R. et al. Brazilian adult individuals with untreated isolated GH deficiency do not have accelerated subclinical atherosclerosis. **Endocrine Connections**, v. 5, n.1, p. 41-46, 2016.

CRUZAT, V. F.; JÚNIOR, J. D.; TIRAPEGUI, J. et al. Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações atuais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 549-562, 2008.

CUMMINGS, D. E.; PURNELL, J. Q.; FRAYO, R. S. et al. A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1714–1719, ago. 2001.

DARDZIŃSKA, J. A.; MAŁGORZEWICZ, S.; KASKA, Ł. et al. Fasting and postprandial acyl and desacyl ghrelin levels in obese and non-obese subjects. **Endokrynologia Polska**, v. 65, n. 5, p. 377-381, 2014.

DATE, Y.; KANGAWA, K. Ghrelin as a starvation signal. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 6, n. 4, p. e263–e269, 2012.

DEZAKI, K.; HOSODA, H.; KAKEI, M. et al. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca^{2+} signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. **Diabetes**, v. 53, p. 3142-3151, dez. 2004.

ENGSTRÖM, B. E.; BURMAN, P.; HOLDSTOCK, C. et al. Effects of Growth Hormone (GH) on Ghrelin, Leptin, and Adiponectin in GH-Deficient Patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 11, p. 5193–5198, nov. 2003.

ERDMANN, J.; TOPSCH, R.; LIPPL, F. et al. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin, and glucose. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 3048-3054, jun. 2004.

FALKÉN, Y.; HELLSTRÖM, P. M.; HOLST, J. J. et al. Changes in Glucose Homeostasis after Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery for Obesity at Day Three, Two, Months, and One Year after Surgery: Role of Gut Peptides. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 2227–2235, jul. 2011.

FLINT, A.; RABEN, A.; BLUNDELL, J. E. et al. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. **International Journal of Obesity**, v. 24, p. 38–48, fev. 2000.

GAGNON, J.; BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D.J. et al. Ghrelin Is a Novel Regulator of GLP-1 Secretion. **Diabetes**, v. 64, n. 5, p. 1513–1521, mai. 2015.

GNANAPAVAN, S.; KOLA, B.; BUSTIN, S. A. et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHSR, in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n 6, p. 2988-2991, jun.2002.

GOLDSTEIN, J. L.; ZHAO, T. J.; LI, R. L. et al. Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 76, p. 121-127, 2011.

GOMES-SANTOS, E.; SALVATORI, R.; FERRÃO, T.O. et al. Increased visceral adiposity and cortisol to cortisone ratio in adults with congenital lifetime isolated GH deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 9, p. 3285-3289, set. 2014.

GONDO, R. G.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; HAYASHIDA, C. Y. et al. Growth Hormone-Releasing Peptide-2 Stimulates GH Secretion in GH-Deficient Patients with Mutated GH-Releasing Hormone Receptor. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 7, p. 3279-3283, jul. 2001.

GRAAF, C.; BLOM, W. A. M.; SMEETS, P. A. M. et al. Biomarkers of satiation and satiety. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 6, p. 946–961, June 2004.

GUEVARA-AGUIRRE, J.; BALASUBRAMANIAN, P.; GUEVARA-AGUIRRE, M. et al. Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 70, p. 70ra13, fev. 2011.

GUTIERREZ, J. A.; SOLENBERG, P. J.; PERKINS, D. R. et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n.17, p. 6320-6325, abr. 2008.

HEER, J.; RASMUSSEN, C.; COY, D. H. et al. Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulintropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. **Diabetologia**, v. 51, p. 2263-2270, set. 2008.

HERRINGTON J.; CAETER-SU, C. Signaling pathways activated by the GH receptor. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n 6, p. 252-257, ago. 2001.

INUI, A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 551–560, ago. 2001.

IWAKURA, H.; KANGAWA, K.; NAKAO, K. The regulation of circulating ghrelin – with recent updates from cell-based assays. **Endocrine Journal Adv Public**, v. 62, n. 2, p. 107-122, 2015.

KANG, Y. M.; JUNG, C. H. Cardiovascular Effects of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists. **Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 258-274, jun. 2016.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, p. 656-660, dez. 1999.

KREYMANN, B. GHATEI, M. A.; WILLIAMS, G. et al. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. **Lancet**, v. 330, n. 8571, p. 1300-1304, dez. 1987.

LEONE, S.; CHIAVAROLI, A.; SHOHREH, R. et al. Increased locomotor and thermogenic activity in mice with targeted ablation of GHRH gene. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 25, n. 2, p. 80-84, abr. 2015.

LINDQVIST, A.; SHCHERBINA, L.; FISCHER, A. H. T. et al. Ghrelin Is a Regulator of Glucagon-Like Peptide 1 Secretion and Transcription in Mice. **Frontiers Endocrinology**, v. 8, jun. 2017.

LIU, J. L.; COSCHIGANO, K. T.; ROBERTSON, K. et al. Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. **American Journal of Physiological Endocrinology and Metabolism**, v. 287, n. 3, p. E405-413, mai. 2004.

MARSO, S. P.; DANIELS, G. H.; BROWN-FRANDBSEN, K. et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 4, p.311-322, jul. 2016.

MASTERNAK, M. M.; BARTKE, A.; WANG, F. et al. Metabolic effects of intra-abdominal fat in GHRKO mice. **Aging Cell**, v. 11, n. 1, p. 73-81, fev. 2012.

MATHER, K. J.; CONSIDINE, R. V.; HAMILTON, L. et al. Combination GLP-1 and Insulin Treatment Fails to Alter Myocardial Fuel Selection vs. Insulin Alone in Type 2 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 9, p. 3456–3465, set. 2018.

MOJSOV, S.; WEIR, G. C.; HABENER, J. F. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. **The Journal Clinical Investigation**, v. 79, n. 2, p. 616–619, fev. 1987.

MOLLER, N.; GJEDSTED, J.; GORMSEN, L. et al. Effects of growth hormone on lipid metabolism in humans. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 13, p. S18-S21, 2003.

MONTELEONE, P.; SCOGNAMIGLIO, P.; MONTELEONE, A. M. et al. Gastroenteric hormone responses to hedonic eating in healthy humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 8, p. 1435-1441, ago. 2013.

MURRAY, R. A.; MAHESHWARI, H. G.; RUSSEL, E. J. et al. Pituitary hypoplasia in patients with a mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene. **American Journal of Neuroradiology**, v. 21, n. 4, p. 685-689, abr. 2000.

NADKARNI, P.; CHEPURNY, O. G.; HOLZ, G. G. Regulation of Glucose Homeostasis by GLP-1. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 121; p. 23–65, 2014.

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, p. 194-198, 2001.

NASS, R.; GAYLINN, B. D.; THORNER, M. O. The role of ghrelin in GH secretion and GH disorders. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 340, n. 1, p. 10-14, jun. 2011.

NASS, R.; LIU, J.; HELLMANN, P. et al. Chronic Changes in Peripheral Growth Hormone Levels Do Not Affect Ghrelin Stomach mRNA Expression and Serum Ghrelin Levels in Three Transgenic Mouse Models. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, p. 669-675, 2004.

NETCHINE, I.; TALON, P.; DASTOT, F. et al. Extensive phenotypic analysis of a family with growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 2, p. 432-436, fev. 1998.

OLIVEIRA, C. R. P.; SALVATORI, R.; BARRETO-FILHO, J. A. S. et al. Insulin Sensitivity and β -Cell Function in Adults with Lifetime, Untreated Isolated Growth Hormone Deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 3, p. 1013-1019, mar. 2012.

OLIVEIRA, C. R. P.; SALVATORI, R.; MENEGUZ-MORENO, R. A. et al. Adipokine profile and urinary albumin excretion in isolated GH deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 2, p. 693-698, fev. 2010.

OLIVEIRA, C. R. P.; SALVATORI, R.; NÓBREGA, L. M. A., et al. Sizes of abdominal organs in adults with severe short stature due to severe, untreated, congenital GH deficiency caused by a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. **Clinical Endocrinology**, v. 69, n. 1, p. 153-158, 2008.

OLIVEIRA, H. A.; SALVATORI, R.; KRAUSS, M. P. O. et al. Magnetic resonance imaging study of pituitary morphology in subjects homozygous and heterozygous for a null mutation of the GHRH receptor gene. **European Journal of Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 427-432, 2003.

OLIVEIRA, M. O. J. L.; MARQUES-SANTOS, C.; BARRETO-FILHO, J. A. et al. Lack of evidence of premature atherosclerosis in untreated severe isolated growth hormone (GH) deficiency due to a GH-releasing hormone receptor mutation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 6, p. 2093-2099, jun. 2006.

OLIVEIRA-NETO, L. A.; MELO, M. F. B.; FRANCO, A. A. et al. Cephalometric features in isolated growth hormone deficiency. **Angle Orthodontist**, v.81, n.4, p. 578-583, 2011.

OLIVEIRA-SANTOS, A. A.; SALVATORI, R.; GOMES-SANTOS, E. et al. Subjects with isolated GH deficiency due to a null GHRHR mutation eat proportionally more, but healthier than controls. **Endocrine**, v. 51, n. 2, p. 317-322, fev. 2016.

ØRGAARD, A.; HOLST, J. J. The role of somatostatin in GLP-1-induced inhibition of glucagon secretion in mice. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1731-1739, mai. 2017.

PERCHARD, R.; CLAYTON, P. E. Ghrelin and Growth. **Developmental Biology of Gastrointestinal Hormones**, v. 32, p. 74-86, jun. 2017.

PHILLIPS, J. A.; HJELLE, B. L.; SEEBURG, P. H. et al. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 78, n. 10, p. 6372-6375, jul.1981.

PORTES, E. S. **Alterações do sistema tireoidiano induzidas pelo tratamento com hormônio do crescimento em crianças com hipopituitarismo.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 1998.

PRODAM, F.; MONZANI, A.; RICOTTI, R. et al. Systematic Review of Ghrelin Response to Food Intake in Pediatric Age, From Neonates to Adolescents. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 5, p. 1556-1568, mai. 2014.

PRUDOM, C.; LIU, J.; PATRIE, J. et al. Comparison of Competitive Radioimmunoassays and Two-Site Sandwich Assays for the Measurement and Interpretation of Plasma Ghrelin Levels. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 5, p. 2351-2358, mai. 2010.

QI, X.; REED, J.; ENGLANDER, E. W. et al. Evidence That Growth Hormone Exerts a Feedback Effect on Stomach Ghrelin Production and Secretion. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 9, p. 1028-1032, 2003.

RECINELLA, L.; LEONE, S.; FERRANTE, C. et al. Effects of growth hormone-releasing hormone gene targeted ablation on ghrelin-induced feeding. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 37, p. 40-46, dez. 2017.

RECINELLA, L.; SHOHREH, R.; SALVATORI, R. et al. Effects of isolated GH deficiency on adipose tissue, feeding and adipokines in mice. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 23, n. 6, p. 237-242, dez. 2013.

SAKHAROVA, A. A.; HOROWITZ, J. F.; SURYA, S. et al. Role of growth hormone in regulating lipolysis, proteolysis, and hepatic glucose production during fasting. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 7, p. 2755-2759, jul. 2008.

SALVATORI, R.; FAN, X.; PHILLIPS, J. A. et al. Three new mutations in the gene for the growth hormone (GH) releasing hormone receptor in familial isolated GH deficiency type IB. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 1, p. 273-279, jan. 2001.

SALVATORI, R.; HAYASHIDA, C. S.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. et al. Familial Dwarfism due to a Novel Mutation of the Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor Gene. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 3, p. 917-923, mar. 1999.

SALVATORI, R.; SERPA, M. G.; PARMIGIANI, G. et al. GH response to hypoglycemia and clonidine in the GH-releasing hormone resistance syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 29, n. 9, p. 805-808, out. 2006.

SANTANA-RIBEIRO, A. A.; MOREIRA-BRASILEIRO, G. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. et al. Walking and postural balance in adults with severe short stature due to isolated GH deficiency. **Endocrine Connections**, v. 8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/EC-19-0103>. Acesso em: 26 mar. 2019.

SAMMS, R. J.; LEWIS, J. E.; NORTON L. et al. FGF21 Is an Insulin-Dependent Postprandial Hormone in Adult Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 10, p. 3806-3813, out. 2017.

SILVA, A.; BLOOM, S. R. Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity. **Gut and Liver**. v. 6, n. 1, p. 10-20, jan. 2012.

SINHA, B.; GHOSAL, S. Meta-analyses of the effects of DPP-4 inhibitors, SGLT2 inhibitors and GLP1 receptor analogues on cardiovascular death, myocardial infarction, stroke and hospitalization for heart failure. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 150, p. 8-16, abr. 2019.

SOUZA, A. H. O.; SALVATORI, R.; MARTINELLI JR, C. E. et al. Hormônio do Crescimento ou Somatotrófico: Novas Perspectivas na Deficiência Isolada de GH a Partir da Descrição da Mutação no Gene do Receptor do GHRH nos Indivíduos da Cidade de Itabaianinha, Brasil. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 48, n. 3, p. 406-413, jun. 2004.

STUBBS, R J.; HUGHES, D. A.; JOHNSTONE, A. M. et al. The use of visual analogue scales to assess motivation to eat in human subjects: a review of their reliability and validity with an evaluation of new hand-held computerized systems for temporal tracking of appetite ratings. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 4, p. 405-415, out. 2000.

TONG, J.; DAVIS, H. W.; GASTALDELLI, A. et al. Ghrelin impairs prandial glucose tolerance and insulin secretion in healthy humans despite increasing GLP-1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 6, p. 2405-2414, jun. 2016.

TSCHÖP, M.; WAWARTA, R.; RIEPL, R. L. et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. **J Endocrinol Invest**, v. 24, n. 6, p. RC19-RC21, jun. 2001.

TUOMISTO, T.; TUOMISTO, M. T.; HETHERINGTON, M. et al. Reasons for initiation and cessation of eating in obese men and women and the affective consequences of eating in everyday situations. **Appetite**, v. 30, n. 2, p. 211-222, abr. 1998.

VICENTE, T. A.; ROCHA, Í. E. S.; SALVATORI, R.; et al. Lifetime congenital isolated GH deficiency does not protect from the development of diabetes. **Endocrine Connections**, v. 2, n. 2, p. 112-117, 2013.

VIJAYAKUMAR, A.; YAKAR, S.; LEROITH, D. The intricate role of growth hormone in metabolism. **Frontiers in Endocrinology**, v. 2, n. 32, p. 1-11, set. 2011.

VIRDIS, A.; DURANTI, E.; COLUCCI, R. et al. Ghrelin restores nitric oxide availability in resistance circulation of essential hypertensive patients: role of NAD(P)H oxidase. **European Heart Journal**, v. 36, n. 43, p. 3023-3030, nov. 2015.

WAJNRAJCH, M. P.; TEN, I. S.; GERTNET, J. M. et al. Genomic organization of the human ghrelin gene. **The Journal Endocrine Genetics**, v. 1, n. 4, p. 231-234, 2000.

WIERUP, N.; YANG, S.; MCEVILLY, R. J. et al. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 52, n. 3, p. 301–310, 2004.

WORTLEY, K. E.; ANDERSON, K. D.; GARCIA K. et al. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8227-8232, mai. 2004.

WREN, A. M.; SMALL, C. J.; WARD, H. L. et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4325-4328, nov. 2000.

ZANDER, M.; MADSBAD S.; MADSEN, J. L. et al. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and β -cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. **Lancet**, v. 359, n. 9309 p. 824-830, mar. 2002.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Alécia Josefa Alves Oliveira Santos nutricionista e doutoranda do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe (UFS) - e estou fazendo um estudo chamado **“Conexões enteroendócrinas na deficiência isolada de GH devido a uma mutação no gene do receptor do GHRH”**.

Este é um convite para participação nesta pesquisa que irá avaliar a resposta hormonal após a ingestão de uma refeição teste composta por um copo de um líquido nutricionalmente completo com sabor de leite de soja. Para tanto, você deverá estar em jejum há pelo menos 10 horas e será necessário colher seu sangue basal e em intervalos de 30, 60, 120, 180 minutos após a ingestão da refeição. Na primeira coleta de sangue será implantado um dispositivo que permite as coletas seguintes realizando somente uma punção de sua veia. Em cada tempo da coleta você precisará também responder à 3 questões sobre seu apetite e saciedade.

Durante a coleta destes dados, afirmo que tudo será feito por profissionais especializados de forma que estes procedimentos sejam realizados da maneira mais rápida e com menos desconforto possível.

Sua participação neste estudo será importante para trazer um maior conhecimento dos mecanismos associados às alterações de apetite de pacientes com deficiência isolada do hormônio de crescimento (GH) e os resultados obtidos na pesquisa poderão contribuir para melhorar o tratamento clínico e nutricional destes pacientes.

Caso você autorize a participação neste estudo, você precisa saber que:

- 1) Tem a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos e benefícios, portanto todas as suas dúvidas serão esclarecidas.
- 2) Tem a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento.
- 3) Tem a segurança de que não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à sua privacidade.
- 4) Tem o compromisso de que será prestado a você informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a sua vontade de continuar participando dele.

5) Não terá nenhum tipo de remuneração financeira para participação neste estudo, mas tem direito à indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente da sua participação na pesquisa.

Eu _____, aceito participar do estudo chamado **“Conexões enteroendócrinas na deficiência isolada de GH devido a uma mutação no gene do receptor do GHRH”**, tendo recebido as informações acima e sendo minha participação inteiramente voluntária.

Assinatura do participante ou responsável:

Data: ____/____/____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone: () _____

Assinatura dos pesquisadores responsáveis:

Data: ____/____/____

Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira
herminio@infonet.com.br

Alécia Josefa Alves Oliveira Santos
aleciaalvesnutri@gmail.com
(79) 99912-4718

Comitê de Ética em Pesquisa

APÊNDICE B - Artigo 1 - Enteroendocrine Connections in Congenital Isolated GH Deficiency due to a GHRH Receptor Gene Mutation (JCEM)

Proof Only

CLINICAL RESEARCH ARTICLE

Enteroendocrine Connections in Congenital Isolated GH Deficiency due to a GHRH Receptor Gene Mutation

Q-1,2

Alécia A. Oliveira-Santos,¹ Roberto Salvatori,² Monica C. Nogueira,³ Ana C. Bueno,³ Cynthia S. Barros-Oliveira,¹ Ângela C. G. B. Leal,¹ Cindi G. Marinho,¹ Nayra P. Damascena,¹ Djane A. Oliveira,¹ Manuela A. Melo,¹ Carla R. P. Oliveira,¹ Flavia O. da Costa,¹ Jéssica S. S. dos Santos,¹ Paula F. C. Santos,¹ Viviane C. Campos,¹ Elenilde G. Santos,¹ Enaldo V. Melo,¹ Meirielly L. A. Barbosa,¹ Mina E. S. Rocha,¹ Margaret de Castro,³ and Manuel H. Aguiar-Oliveira¹

¹Division of Endocrinology, Federal University of Sergipe 49060-100 Aracaju, Sergipe, Brazil; ²Division of Endocrinology and Metabolism, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21287; and ³Department of Internal Medicine, The Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ORCID numbers: 0000-0001-6495-2244 (R. Salvatori).

Context: GH and IGF-1 are crucial for attainment of normal body size and regulation of food intake, nutrient storage, and insulin sensitivity. Enteroendocrine connections exist between the GH-IGF-1 axis and insulin, ghrelin, and glucagon-like peptide 1 (GLP-1). The status of these connections in GH deficiency (GHD) is unknown.

Objective: To study the enteroendocrine connections before and after a standard meal test in a homogeneous population of adults with congenital untreated isolated GHD (IGHD) due to a mutation in the GHRH receptor gene.

Design: In a cross-sectional study of 20 individuals with IGHD and 20 control subjects, we measured glucose, insulin, ghrelin, and GLP-1 before and 30, 60, 120, and 180 minutes after a standardized test meal. Homeostasis model assessment index of insulin resistance (HOMA-IR) and homeostasis model assessment (HOMA)- β were calculated. Participants scored feelings of hunger, fullness, and prospective food consumption on a visual analog scale.

Main Outcome Measures: Area under the curve (AUC) values of glucose, insulin, ghrelin, GLP-1, hunger, fullness, and prospective food consumption.

Results: Fasting HOMA-IR and HOMA- β were lower in individuals with IGHD than in control subjects ($P = 0.002$ and $P = 0.023$, respectively). AUC was higher for hunger ($P < 0.0001$), glucose ($P = 0.0157$), ghrelin ($P < 0.0001$), and GLP-1 ($P < 0.0001$) and smaller for fullness ($P < 0.0001$) in individuals with IGHD compared with control subjects. There was no difference in AUC for prospective food consumption or insulin.

Conclusions: Untreated IGHD is associated with increased GLP-1 secretion and reduced postprandial ghrelin and hunger attenuation in response to a mixed meal. These enteroendocrine connections can result in a favorable outcome in terms of environmental adaptation and guaranteeing appropriate food intake and can confer metabolic benefits. (*J Clin Endocrinol Metab* 104: 1–8, 2019)

GH and IGF-1 are crucial for the attainment of normal body size and for the regulation of key bodily functions, including food intake, nutrient storage, and insulin sensitivity (1). Pituitary GH secretion is under a balanced control by two stimulatory (GHRH and ghrelin) and one inhibitory (somatostatin) peptide and the feedback control by circulating (mainly from liver origin) IGF-1. The enteroendocrine connections between the GH-IGF-1 axis, insulin, ghrelin, and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) are not completely understood, but they must exist because growth requires adequate energy and nutritional input. In this sense, insulin and GH are essential to adjust the energy utilization to the amount of food, promoting anabolism or catabolism when necessary. Insulin is the main metabolic hormone in the fed state, whereas GH assumes a key role as a stimulator of lipolysis during prolonged fasting (2). Additionally, the ghrelin-GH axis seems to have an essential role in surviving starvation, at least in mice (3).

Ghrelin, discovered in 1999 (4), has 28 amino acids and the *n*-octanoylation of the serine 3 position in the molecule that is necessary for its bioactivity. It is produced in gastrointestinal cells particularly in the fundus of the stomach. Ghrelin increases GH secretion, reduces insulin secretion, and stimulates hunger, peaking before and falling after meals (5–7). In mice, ghrelin seems not be not an essential regulator of food intake but has a redundant action in the regulation of appetite and an important role in determining metabolic fuel preference (8). Although ghrelin is the only known appetite-stimulating hormone in humans (9) and is a potent endogenous enhancer of the GH-IGF-1 axis (10), its role in human pathophysiology is still debated (11).

GLP-1 is a tissue-specific posttranslational proteolytic product of the proglucagon gene. It is secreted by the enteroendocrine L-cells in response to nutrient ingestion. GLP-1 potentiates insulin secretion and inhibits glucagon secretion (incretin effect) and contributes to satiety, peaking about 1 hour after meals (12–14). A novel enteroendocrine connection has recently been described through which ghrelin enhances GLP-1 secretion in mice (15, 16) and probably in humans (7). Additionally, mice with GH deficiency (GHD) with ablation of the GHRH gene eat more and have higher serum ghrelin levels than GH-sufficient mice, suggesting that a negative feedback exists between the GH-IGF-1 axis and ghrelin secretion and that elevated ghrelin in GHD could lead to increased feeding (17). Finally, a feedback loop seems to exist between GLP-1 and somatostatin, by which GLP-1 increases somatostatin release and somatostatin decreases GLP-1 secretion (18–20).

The impact of GHD in these enteroendocrine connections in humans is presently unknown. Acquired

GHD is often part of multiple pituitary hormones deficits, often after surgery or pituitary irradiation, and sometimes with inadequate substitutions. Additionally, it often occurs with comorbidities such as obesity, insulin resistance, or dyslipidemia. This myriad of confounding factors makes it difficult to analyze the clear impact of GHD on these connections. We have described a large cohort of subjects residing in Itabaianinha County in northeastern Brazil who are affected by severe dwarfism due to isolated GHD (IGHD) caused by the homozygous c.57+1 G→A mutation in the GHRH gene (*GHRHR*, OMIM n. 612781), resulting in very low serum GH and IGF-1 throughout life (21). We have previously shown by oral glucose load that these subjects with IGHD exhibit a combination of reduced β -cell function and increased insulin sensitivity (22). Despite the complete resistance to GHRH, in these subjects GH secretion responds, albeit minimally, to ghrelin receptor agonists (23).

It is possible that severe IGF-1 deficiency causes a reduction of somatostatin tone, which in turn may influence the secretion of GLP-1. In addition, we have reported that these subjects with IGHD eat proportionally more than matched control subjects (24). Therefore, we hypothesized that these subjects may have higher circulating ghrelin levels, resulting in reduced insulin secretion, partially compensated by an increase in GLP-1.

The purpose of this work was to study the enteroendocrine connections between these hormones and the feeding perceptions before and after a standard meal test in adult subjects with lifetime, congenital, untreated IGHD.

Subjects and Methods

In a cross-sectional study, 20 (11 men) subjects with IGHD and 20 (11 men) control subjects matched by age and sex were recruited by ads placed in the local Dwarfs Association building and by word of mouth among the inhabitants of the municipality of Itabaianinha. Inclusion criteria for IGHD were short stature and confirmed genotype for *GHRHR* homozygous c.57+1 A→G mutation; the control group consisted of individuals of normal height and with the homozygous genotype to the wild-type *GHRHR* allele. Exclusion criteria were age <25 years and >80 years and use of glucocorticoids, GH, levothyroxine, or sedative or psychiatric stimulant drugs.

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Study protocol

Anthropometric measurements

Height was measured with a wall-mounted stadiometer (digital wall stadiometer model HM210D; Charder Medical Weighing and Measuring Products, Taichung City, Taiwan). Weight was measured with a portable platform scale (model MS2510; Charder Medical Weighing and Measuring Products). Body mass index (BMI) was calculated by the formula: weight (kilograms)/height (meters)².

Standard meal test

A standard meal test was performed at the University Hospital of Sergipe. After a 10-hour fast, a catheter for peripheral venous access was inserted. Blood collection times were immediately before ingestion and 30, 60, 120, and 180 minutes after standardized test meal intake. The meal was composed of 70 g of powder diet based on soy protein isolate; the powder was hyposodic and without sucrose, lactose, and gluten. It had 315 Kcal [56% from carbohydrates (44.1 g), 30% from lipids (10.5 g), and 14% (11 g) from proteins] and was diluted in water to a final volume of 250 mL to be consumed in up to 10 minutes. At specified times for blood collection, participants scored feelings of hunger, fullness, and prospective food consumption on a visual analog scale (VAS). The questionnaire had horizontal lines without graduation and was cut into pieces of paper of the same height and 10 cm in length. One question was placed above each line and opposite answers at its ends. Individuals scored on the line which most corresponded to their feelings at the time of the question, and the distance between the left end of the line to the marked mark was quantified (25).

The term "hunger" consists of a subjective idea used to express the motivation to eat. It was judged by the question "How much hunger do you feel?" The answers at the end of the VAS were "I'm not hungry at all" and "I've never been so hungry." The feeling of fullness was evaluated by the question "How satisfied are you?" The answers at the end of the VAS were "I am completely empty" and "I am completely full." Prospective consumption was evaluated by the question "How much do you think you can eat?" The answers at the end of the VAS were "nothing" and "too much" (26–28).

At each time point, 10 mL of blood was collected. Blood samples were placed in cooled tubes containing Na₂-EDTA (1 mg/mL). Plasma was immediately separated by centrifugation at 4°C. Plasma for total ghrelin and GLP-1 measurement was stored at -70°C and transported in dry ice to the Endocrinology Laboratory of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, until analysis in a single run. The samples were thawed only once at the time of dosing. The

concentrations of total plasma ghrelin (ref. EZGRT-89K) and GLP-1 (ref. EZGLP1T-36K) were determined by ELISA assay kits (EMD Millipore Corporation, St. Charles, MO), with sensitivities of 4.1 and 159.4 pg/mL, respectively. These assays quantify total ghrelin (intact and des-octanoyl) and total GLP-1 (isoforms 7-36 and 9-36). The specificity of the ghrelin assay includes human ghrelin (active) 80%, des-octanoyl human ghrelin 100%, and canine ghrelin 70%. The antibody pair used in the GLP-1 assay measures GLP-1 (isoform 7-36) and (isoform 9-26) and has no significant cross-reactivity with GLP-2, GIP, glucagon, and oxyntomodulin. We used two quality controls for each assay. For ghrelin, our results were 607.15 pg/mL (expected range, 371 to 771 pg/mL) and 2504 pg/mL (expected range, 1545 to 3209 pg/mL). For GLP-1, our results were 41.1 pg/mL (expected range, 31 to 65 pg/mL) and 304.2 pg/mL (expected range, 172 to 357 pg/mL).

Glucose was measured by the enzymatic Trinder colorimetric test in the same day of each test. IGF-1 was measured by a solid-phase, enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay (Immuline 2000; Siemens Health Care Diagnostics Products Ltd, Malvern, PA), with a sensitivity of 25 ng/mL. Insulin was measured by a chemiluminescent microparticle immunoassay (Architect; Abbott Laboratories Diagnostic Division, Abbott Park, IL), with a sensitivity of 1.0 µU/mL. These measurements were performed in the laboratory of the University Hospital of the Federal University of Sergipe.

Insulin sensitivity and β -cell function

Insulin sensitivity was estimated by the homeostasis model assessment index of insulin resistance (HOMA-IR) with the formula: fasting serum insulin (µU/mL) $\times$ fasting plasma glucose (mmol/L)/22.5. β -Cell function was estimated using the basal glucose and insulin values by the HOMA- β with the formula: [(20 $\times$ fasting insulin (µU/mL)) / (fasting glucose (mmol/L) - 3.5)].

The Federal University of Sergipe Institutional Review Boards approved these studies, and all subjects gave written informed consent.

Statistics

The variables with normal distribution were expressed as mean (SD) and compared by Student *t* test. The variables with non-normal distribution (insulin, HOMA-IR, HOMA- β , ghrelin, and GLP-1) were expressed as median (interquartile range) and compared by the Mann-Whitney test (SPSS Statistics 23; IBM, Armonk, NY). The software Origin 9.1 (Origin Laboratory Corporation, Northampton, MA) was used to calculate the area under the curve (AUC) of glucose, insulin, ghrelin, GLP-1, hunger, fullness, and prospective food consumption,

with the standard meal test. The mean difference and the 95% CI were calculated for these comparisons. A CI of the difference between the two groups that does not contain zero implies a significant difference between the groups. We also performed comparisons for the studied variables at each time after the meal by the Mann-Whitney test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Table 1 shows the anthropometric and baseline data of glucose, insulin, IGF-1, ghrelin, GLP-1, hunger, fullness, and prospective consumption. Height ($P < 0.0001$), weight ($P < 0.0001$), IGF-1 ($P < 0.0001$), glucose ($P = 0.0157$), insulin ($P = 0.002$), HOMA-IR ($P = 0.002$), and HOMA- β ($P = 0.023$) were significantly lower in patients with IGHD than in control subjects, but no difference was found in the baseline values of the other variables. The analysis of the comparisons for the variables studied at each time point after the meal revealed for glucose a tendency of greater value at 120 minutes ($P = 0.06$), for insulin a higher value at 180 minutes ($P = 0.009$), and for GLP-1 higher values at 30 minutes ($P = 0.021$) and at 120 minutes ($P = 0.035$).

The AUC for hunger was higher in subjects with IGHD than in control subjects [773.3 (98.9) vs 578.3 (93.5); mean difference, 195.0; 95% CI, 133.4 to 256.6; $P < 0.0001$]. Mirroring this finding, fullness was lower [649.9 (89.9) vs 816.3 (87.6); mean difference, 166.4; 95% CI, 109.6 to 223.2; $P < 0.0001$] in subjects with IGHD compared with control subjects. No difference was noticed in the AUC for prospective food consumption between the two groups [776.1 (86.3) vs 751.6 (87.8); mean difference, 24.5; 95% CI, -31.2 to 80.2; $P = 0.3793$], respectively.

Figures 1, 2, 3, and 4 show the AUC values of glucose, insulin, ghrelin, and GLP-1, respectively. The AUC for glucose was higher in subjects with IGHD than in control subjects [27,608.2 (1647.8) vs 26,149.5 (1983.6) mg/dL; mean difference, 1458.7; 95% CI, 291.4 to 2626.0; $P = 0.0157$]. In contrast, the AUC for insulin was similar in the two groups [7457.5 (1151.5) vs 7,255.6 (1079.2) μ U/mL; mean difference, 201.9; 95% CI, -512.5 to 916.3; $P = 0.57$], respectively. The AUC for ghrelin was also higher in subjects with IGHD [131,570.2 (21,575.4) vs control subjects 106,205.6 (10,141.2) pg/mL; mean difference, 25,364.6; 95% CI, 14,573.0 to 36,156.2; $P < 0.0001$]. Similarly, the AUC for GLP-1 was larger in subjects with IGHD [12,049.1 (1844.9) vs 8442.9 (855.0) pg/mL; mean difference, 3606.2; 95% CI, 2685.7 to 4526.7; $P < 0.0001$].

Discussion

The goal of this study was to assess the effects of lifetime IGHD on meal-induced secretion of ghrelin and GLP-1 and on feeding perceptions. To this end, we have taken advantage of homogeneous extended kindred of subjects affected by IGHD all due to the same GHRHR mutation. This unique model allows studying the consequences of GH deficiency in subjects who have otherwise normal pituitary function. Subjects with IGHD were compared with normal sex- and age-matched control subjects from the same community. Although height and weight were greatly reduced in the IGHD group, BMI was marginally lower (not reaching significance) in the IGHD group. However, this reduction in BMI reflects their small bones and muscles rather than lower adiposity. In fact, we previously reported that, although the fat mass

Table 1. Anthropometric and Baseline Data of Glucose, Insulin Ghrelin, GLP-1, Hunger, Fullness, and Prospective Consumption Data of 20 Individuals With IGHD and 20 Control Subjects

	IGHD	Control Subjects	P
Age, y	49.4 (13.4)	48.6 (13.6)	0.889
Male, n	11	11	1
Height, m	1.3 (0.1)	1.6 (0.1)	<0.0001
Weight, kg	40.6 (6.4)	77.8 (15.0)	<0.0001
BMI	25.8 (5.1)	28.4 (3.7)	0.051
Glucose, mg/dL	102.8 (18.3)	125.4 (22.5)	0.0157
IGF-1, ng/mL	25.0 (3.4)	165.5 (29.2)	<0.0001
Insulin, μ U/mL	3.9 (5.5)	7.7 (3.7)	0.002
HOMA-IR	0.9 (1.5)	2.2 (1.2)	0.002
HOMA- β	12.3 (13.9)	20.4 (11.9)	0.023
Ghrelin, pg/mL	595.7 (507.4)	553.7 (364.9)	0.433
GLP-1, pg/mL	32.2 (12.0)	33 (20.4)	0.862
Hunger	4.3 (3.0)	3.3 (2.1)	0.219
Fullness	1.9 (1.7)	2.8 (1.9)	0.155
Prospective consumption	3.8 (1.7)	4.4 (2.0)	0.292

Data are expressed as mean (SD), except for insulin, IGF-1, HOMA-IR, HOMA- β , ghrelin, and GLP-1, which are expressed as median (interquartile range).

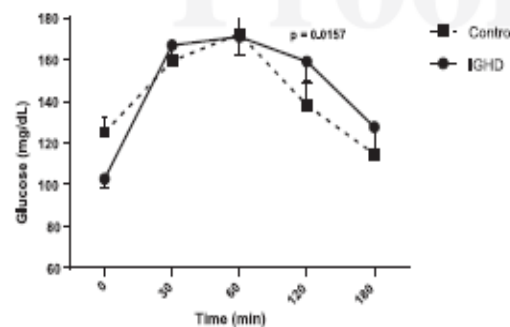


Figure 1. AUC of glucose levels after a standard meal test. Data are expressed as mean (SEM).

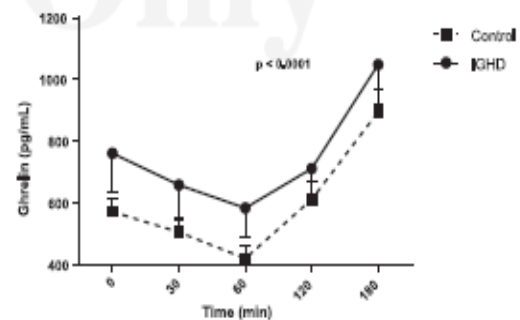


Figure 3. AUC of Ghrelin levels after a standard meal test. Data are expressed as mean (SEM).

percentage in these subjects with IGHD is similar to control subjects, they have higher visceral adiposity (29).

The baseline data showed that glucose, insulin, HOMA-IR, and HOMA- β were significantly lower in IGHD, as we reported before (22). Ghrelin, GLP-1, and the feeding perceptions at the baseline were not different between the groups. Comparison of each time, after the standard mixed meal, showed mild differences in glucose and insulin, no differences in ghrelin, and higher GLP-1 values at 30 and 120 minutes. However, the individuals with IGHD presented higher AUC values for hunger, glucose, ghrelin, and GLP-1 than control subjects, whereas no difference was observed in AUC values for insulin. These data agree with our previous results obtained with an oral glucose tolerance test, showing larger AUC values for glucose and similar AUC values for insulin in comparison with control subjects (22). In that study, we had concluded that these subjects combine reduced β -cell function with increased insulin sensitivity, as also described in the Ecuadorian cohort of subjects with GH insensitivity (30) and in the GH receptor knockout (GHRKO) mice (31, 32). An oral glucose tolerance test stimulus is critical for the diagnosis of diabetes mellitus or decreased glucose tolerance but may expose the ghrelin-secreting cells of the stomach to a faster increase in simple carbohydrates, which could

suppress ghrelin faster and stronger than mixed meals (33). Therefore, we used a physiological approach with a mixed standard meal.

One strength of this work is that we reproduced the well-established pattern of response of ghrelin and GLP-1 after a meal test. Plasma ghrelin levels peak before meals and decline to a nadir during the hour after eating (as we showed in the present study), with changes varying twofold to threefold across the fasting-feeding cycle in healthy subjects (5, 34). On the other hand, GLP-1 is secreted into the circulation after oral nutrient ingestion in a biphasic pattern starting with an early (15-minute) phase that is followed by a longer (60-minute) second phase (14), as we also documented. Another strength of this work was that we used AUC, in addition to using the comparisons at each moment, after the meal. With this approach, we obtained an overall evaluation of the behavior of each metabolite after the meal, calculating the defined integral of the metabolic blood concentration vs time using concentrations measured at the five discrete time points.

In the present study, we found that untreated patients with IGHD have more hunger and less fullness than control subjects. These data fit with the observation that these subjects eat proportionally more than control subjects (24), which inspired the present work. In addition to the subjects with IGHD being active and having

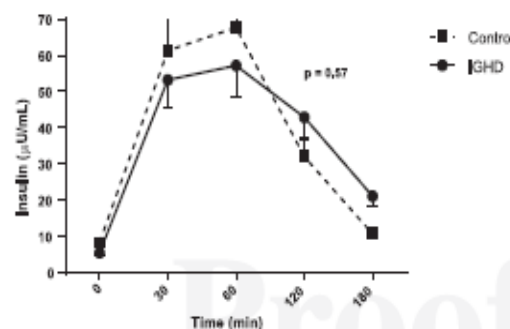


Figure 2. AUC of insulin levels after a standard meal test. Data are expressed as mean (SEM).

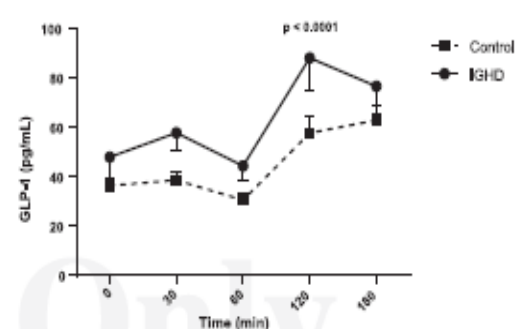


Figure 4. AUC of GLP-1 levels after a standard meal test. Data are expressed as mean (SEM).

low fatigability and adequate muscle function (35), such an increase in hunger may have helped this population to survive and thrive, despite their severe short stature, for centuries in a hostile environment with several seasons of drought and food scarcity.

The explanation for this increased hunger may come from the higher AUC for ghrelin. Although the stimulatory role of ghrelin on GH secretion is unquestionable, the effects of the GH-IGF-1 axis on ghrelin secretion are still controversial, with some reports of negative feedback between the GH-IGF-1 axis on ghrelin secretion (36, 37) and others showing that serum concentrations of ghrelin are not affected by chronic changes in peripheral GH-IGF-1 action, at least in mouse models (38). We found that this severe GHD is associated with less postprandial ghrelin attenuation. Visceral obesity (29), improved insulin sensitivity (22) with high adiponectin levels (39), and reduced β -cell function (22) accompany this hyperphagia. The seemingly paradoxical association of increased insulin sensitivity with increased visceral adiposity is also found in GHRKO mice, with changes in the secretory activity of visceral fat accompanied by a substantial increase in adiponectin concentrations (40, 41). Transplant of visceral fat from these mice improves insulin sensitivity of normal mice, suggesting a beneficial metabolic role of visceral adipose tissue in states of abolished GH action and severe IGF-1 deficiency (42).

The reduced β -cell function found in our subjects with IGHD, which can lead to the onset of diabetes (22), resembles the reduced development and secretory function of β -cells found in Ames dwarf mice (43) and GHRKO mice (44). Data from the current study add more pieces to this intricate puzzle. Because ghrelin seems to increase insulin sensitivity (36) and reduces β -cell function (7, 36, 45, 46), the lower postprandial ghrelin attenuation could contribute to their reduced β -cell function (22). On other hand, because ghrelin is a potent GLP-1 secretion enhancer (7, 15, 16), we speculate that high ghrelin secretion causes higher GLP-1 secretion, thereby contributing to the increased insulin sensitivity of these subjects with IGHD. Additionally, the reduction of the somatostatin tone can contribute to the increase in GLP-1 in view of the feedback loop between GLP-1 and somatostatin (19–21). Accordingly, the levels of serum TSH are mildly increased in these subjects, possibly reflecting lower secretion of somatostatin release (23). Regardless of the mechanism, due to the beneficial vascular effect of GLP-1 (47) and its analogs (48), this increased endogenous secretion of GLP-1 may contribute to the delay of onset of atherosclerosis in these individuals with IGHD (49, 50) and to their normal life expectancy (51) despite visceral obesity (29) and despite increased blood pressure, total and LDL cholesterol, and

C-reactive protein (52). It is also possible that the higher ghrelin secretion contributes to their normal life expectancy because the ghrelin-GH secretagogue receptor-signaling pathway may play an important role in the antiaging mechanism (53).

Our work has some limitations. The higher basal glucose levels in the control group could confound the results. Nevertheless, the AUC for glucose was lower in this group, making it very unlikely that the higher basal glucose contributed to a reduction in AUC for glucose. Furthermore, we did not measure the active acyl-ghrelin and the inactive desacyl-ghrelin (54, 55). However, measurement of total ghrelin has the advantages of measuring both forms of ghrelin. Total ghrelin is also less prone to degradation (important in our case because samples needed to be transported over 2000 km from collection site), and it is desirable when higher levels of ghrelin are predicted, as in our case. Another issue of concern is a possible degradation of total ghrelin because we did not use extraction of plasma with the addition of protease inhibitors and acidification. Therefore, we cannot exclude possible degradation of active ghrelin. However, this possible degradation would have likely occurred in both subjects with IGHD and control subjects, allowing comparison between groups. Furthermore, the observed postprandial ghrelin attenuation and GLP-1 increase seen in both the experimental and control groups suggest the biological relevance of our experiment. For GLP-1 assay, extraction and acidification do not appear to be critical, following the manufacturer's instructions. Similar handling of the samples was used in a recent study, showing that GLP-1 appears to be the main candidate to promote an increased insulin response and metabolic control after gastric bypass surgery in obese patients (56).

In summary, severe, lifetime, untreated IGHD is associated with increased GLP-1 secretion and less postprandial ghrelin and hunger attenuation in response to a mixed meal. These enteroendocrine changes may result in a favorable outcome in terms of environmental adaptation, providing appropriate food intake (higher total ghrelin) and improving insulin sensitivity (higher GLP-1). These changes may contribute to the normal life expectancy of these subjects despite several cardiovascular risk factors.

Q45.6

Acknowledgments

The authors thank the Associação do Crescimento Físico e Humano de Itabaianinha for assistance and Dr. Clare Lee (Johns Hopkins University) for careful review of the manuscript. R.S. wishes to acknowledge the generous support of Newell Coxon, Jr.

Financial Support: This study was supported in part by Sao Paulo Research Foundation Grant 2014/03989-6 (to M.d.C.).

Correspondence and Reprint Requests: Roberto Salvatori, MD, Division of Endocrinology, Johns Hopkins University School of Medicine, 1830 East Monument street suite #333, Baltimore, Maryland 21287. E-mail: salvator@jhmi.edu.

Disclosure Summary: R.S. serves on the advisory board of Novo Nordisk and Pfizer.

References

- Aguiar-Oliveira MH, Bartke A. Growth hormone deficiency: health and longevity. [published ahead of print Dec 20, 2018] *Endocr Rev*. 2018; Epub ahead of print.
- Sakharova AA, Horowitz JE, Surya S, Goldenberg N, Harber MP, Symons K, Barkan A. Role of growth hormone in regulating lipolysis, proteolysis, and hepatic glucose production during fasting. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(7):2755–2759.
- Goldstein JL, Zhao TJ, Li RL, Sherbet DP, Liang G, Brown MS. Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:121–127.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656–660.
- Iwakura H, Kangawa K, Nakao K. The regulation of circulating ghrelin: with recent updates from cell-based assays. *Endocr J*. 2015; 62(2):107–122.
- Beglinger S, Meyer-Gerspach AC, Graf S, Zumsteg U, Drewe J, Beglinger C, Gutzwiller JP. Effect of a test meal on meal responses of satiation hormones and their association to insulin resistance in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(9):2047–2052.
- Tong J, Davis HW, Gastaldello A, D'Alessio D. Ghrelin impairs prandial glucose tolerance and insulin secretion in healthy humans despite increasing GLP-1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(6): 2405–2414.
- Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieff M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(21):8227–8232.
- Buss J, Havel PJ, Epel E, Lin J, Blackburn E, Daubenmier J. Associations of ghrelin with eating behaviors, stress, metabolic factors, and telomere length among overweight and obese women: preliminary evidence of attenuated ghrelin effects in obesity? *Appetite*. 2014;76:84–94.
- Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(8):551–560.
- Nass R, Gaylinn BD, Thomer MO. The role of ghrelin in GH secretion and GH disorders. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;340(1): 10–14.
- Mojsov S, Weir GC, Habener JF. Insulinotropic: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest*. 1987;79(2):616–619.
- Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*. 1987; 2(8571):1300–1304.
- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131–2157.
- Gagnon J, Baggio LL, Drucker DJ, Brubaker PL. Ghrelin is a novel regulator of gip-1 secretion. *Diabetes*. 2015;64(5):1513–1521.
- Lindqvist A, Shcherbina L, Fischer AHT, Wierup N. Ghrelin is a regulator of glucagon-like peptide 1 secretion and transcription in mice [published online ahead of print 19 June 2017]. *Front Endocrinol*.
- Recinella L, Leone S, Ferrante C, Chiavardi A, Shohreh R, Di Nisio C, Vacca M, Orlando G, Salvatori R, Brunetti L. Effects of growth hormone-releasing hormone gene targeted ablation on ghrelin-induced feeding. *Growth Horm IGF Res*. 2017;37:40–46.
- Chisholm C, Greenberg GR. Somatostatin-28 regulates GLP-1 secretion via somatostatin receptor subtype 5 in rat intestinal cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(2):E311–E317.
- de Heer J, Rasmussen C, Coy DH, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia*. 2008;51(12):2263–2270.
- Øgaard A, Holst JJ. The role of somatostatin in GLP-1-induced inhibition of glucagon secretion in mice. *Diabetologia*. 2017;60(9): 1731–1739.
- Salvatori R, Hayashida CY, Aguiar-Oliveira MH, Phillips JA III, Souza AHO, Gondo RG, Toledo SPA, Conceição MM, Prince M, Maheshwari HG, Baumann G, Levine MA. Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):917–923.
- Oliveira CRP, Salvatori R, Barreto-Filho JAS, Rocha IES, Mari A, Pereira RMC, Campos VC, Meneses M, Gomes E, Meneguere-Moreno RA, Araújo VP, Leite NTF, Nascimento-Junior AC, Farias MIT, Vicente TAR, Araújo RDC, Melo EV, Aguiar-Oliveira MH. Insulin sensitivity and β -cell function in adults with lifetime, untreated isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):1013–1019.
- Gondo RG, Aguiar-Oliveira MH, Hayashida CY, Toledo SPA, Abelin N, Levine MA, Bowers CY, Souza AHO, Pereira RM, Santos NL, Salvatori R. Growth hormone-releasing peptide-2 stimulates GH secretion in GH-deficient patients with mutated GH-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(7):3279–3283.
- Oliveira-Santos AA, Salvatori R, Gomes-Santos E, Santana JAM, Leal ACGB, Barbosa RAA, Oliveira CRP, Souza AHO, Valença EHO, Aguiar-Oliveira MH. Subjects with isolated GH deficiency due to a null GHRHR mutation eat proportionally more, but healthier than controls. *Endocrine*. 2016;51(2):317–322.
- Stubbs RJ, Hughes DA, Johnstone AM, Rowley E, Reid C, Elia M, Stratton R, Delany H, King N, Blundell JE. The use of visual analogue scales to assess motivation to eat in human subjects: a review of their reliability and validity with an evaluation of new hand-held computerized systems for temporal tracking of appetite ratings. *Br J Nutr*. 2000;84(4):405–415.
- Tuomisto T, Tuomisto MT, Hetherington M, Lappalainen R. Reasons for initiation and cessation of eating in obese men and women and the affective consequences of eating in everyday situations. *Appetite*. 1998;30(2):211–222.
- Hint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(1):38–48.
- de Graaf C, Blom WAM, Smeets PAM, Stafleu A, Hendriks HFJ. Biomarkers of satiation and satiety. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(6): 946–961.
- Gomes-Santos E, Salvatori R, Ferrão TO, Oliveira CRP, Diniz RDC, Santana JAM, Pereira FA, Barbosa RAA, Souza AHO, Melo EV, Epitácio-Pereira CC, Oliveira-Santos AA, Oliveira IAS, Machado JA, Santana-Junior FJ, Barreto-Filho JAS, Aguiar-Oliveira MH. Increased visceral adiposity and cortisol to cortisone ratio in adults with congenital lifetime isolated GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3285–3289.
- Guevara-Aguirre J, Balasubramanian P, Guevara-Aguirre M, Wei M, Madia F, Cheng CW, Hwang D, Martin-Montalvo A, Saavedra J, Ingles S, de Cabo R, Cohen P, Longo VD. Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. *Sci Transl Med*. 2011;3(70):70ra13.

31. Arum O, Boparai RK, Saleh JK, Wang F, Dirks AL, Turner JG, Kopchick JJ, Liu JL, Khardori RK, Bartke A. Specific suppression of insulin sensitivity in growth hormone receptor gene-disrupted (GHR-KO) mice attenuates phenotypic features of slow aging. *Aging Cell*. 2014;13(6):981-1000.
32. Arum O, Saleh JK, Boparai RK, Kopchick JJ, Khardori RK, Bartke A. Preservation of blood glucose homeostasis in slow-senescent somatotrophism-deficient mice subjected to intermittent fasting begun at middle or old age [published correction appears in *Age*. 2014;36(9695)]. *Age (Dordr)*. 2014;36(3):9651.
33. Prodham F, Morzani A, Ricotti R, Marolda A, Bellone S, Aimaretti G, Roccio M, Bona G. Systematic review of ghrelin response to food intake in pediatric age, from neonates to adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):1556-1568.
34. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001;50(8):1714-1719.
35. Andrade-Guimarães AL, Aguiar-Oliveira MH, Salvatori R, Carvalho VO, Alvim-Pereira F, Daniel CRA, Brasileiro GAM, Santana-Ribeiro AA, Santos-Carvalho HA, Oliveira CRP, Vieira ER, Gois-Junior MB. Adult individuals with congenital, untreated, severe isolated growth hormone deficiency have satisfactory muscular function. *Endocrine*. 2019;63(1):112-119.
36. Perchard R, Clayton PE. Ghrelin and growth. *Endocr Dev*. 2017;32:74-86.
37. Edén Engström B, Burman P, Holdstock C, Karlsson FA. Effects of growth hormone (GH) on ghrelin, leptin, and adiponectin in GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5193-5198.
38. Nass R, Liu J, Hellmann P, Coschigano KT, Gaylinn B, Berryman DE, Kopchick JJ, Thorner MO. Chronic changes in peripheral growth hormone levels do not affect ghrelin stomach mRNA expression and serum ghrelin levels in three transgenic mouse models. *J Neuroendocrinol*. 2004;16(8):669-675.
39. Oliveira CRP, Salvatori R, Meneguz-Moreno RA, Aguiar-Oliveira MH, Pereira RMC, Valença EHA, Araújo VP, Farias NT, Silveira DCR, Vieira JGH, Barreto-Filho JAS. Adipokine profile and urinary albumin excretion in isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(2):693-698.
40. Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski M, Sun L, Bartke A. Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor I signaling and caloric restriction. *Endocrinology*. 2005;146(2):851-860.
41. Masternak MM, Bartke A, Wang F, Spong A, Gesing A, Fang Y, Salmon AB, Hughes LF, Liberati T, Boparai R, Kopchick JJ, Westbrook R. Metabolic effects of intra-abdominal fat in GHRKO mice. *Aging Cell*. 2012;11(1):73-81.
42. Bennis MT, Schneider A, Victoria B, Do A, Wiesenborn DS, Spinel L, Gesing A, Kopchick JJ, Siddiqi SA, Masternak MM. The role of transplanted visceral fat from the long-lived growth hormone receptor knockout mice on insulin signaling. *Geroscience*. 2017;39(1):51-59.
43. Bartke A, Brown-Borg H. Life extension in the dwarf mouse. *Gen Top Dev Biol*. 2004;63:189-225.
44. Liu JL, Coschigano KT, Robertson K, Lipsett M, Guo Y, Kopchick JJ, Kumar U, Liu YL. Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(3):E405-E413.
45. Wienup N, Yang S, McEvilly RJ, Mukler H, Sundler F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(3):301-310.
46. Dezaki K, Hosoda H, Kaked M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes*. 2004;53(12):3142-3151.
47. Almutairi M, Al Batran R, Usher JR. Glucagon-like peptide-1 receptor action in the vasculature. *Peptides*. 2019;111:26-32.
48. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JFE, Nauck MA, Nissen SE, Pocock S, Poulter NR, Ravn LS, Steinberg WM, Stocker M, Zinman B, Bergenstal RM, Buse JB; LEADER Steering Committee on behalf of the LEADER Trial Investigators. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(4):311-322.
49. Menezes Oliveira JL, Marques-Santos C, Barreto-Filho JA, Ximenes Filho R, de Oliveira Britto AV, Oliveira Souza AH, Prado CM, Pereira Oliveira CR, Pereira RMC, Ribeiro Vicente TA, Farias CT, Aguiar-Oliveira MH, Salvatori R. Lack of evidence of premature atherosclerosis in untreated severe isolated growth hormone (GH) deficiency due to a GH-releasing hormone receptor mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2093-2099.
50. Costa UMM, Oliveira CRP, Salvatori R, Barreto-Filho JAS, Campos VC, Oliveira FT, Rocha IE, Oliveira JLM, Silva WA, Aguiar-Oliveira MH. Brazilian adult individuals with untreated isolated GH deficiency do not have accelerated subclinical atherosclerosis. *Endocr Connect*. 2016;5(1):41-46.
51. Aguiar-Oliveira MH, Oliveira FT, Pereira RMC, Oliveira CRP, Blackford A, Valença EHO, Santos EG, Gois-Junior MB, Meneguz-Moreno RA, Araújo VP, Oliveira-Neto LA, Almeida RP, Santos MA, Farias NT, Silveira DCR, Cabral GW, Calazans FR, Seabra JD, Lopes TF, Rodrigues EO, Porto LA, Oliveira IM, Melo EV, Martari M, Salvatori R. Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(2):714-721.
52. Barreto-Filho JA, Alcântara MR, Salvatori R, Barreto MA, Sousa AC, Bastos V, Souza AH, Pereira RM, Clayton PE, Gill MS, Aguiar-Oliveira MH. Familial isolated growth hormone deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(5):2018-2023.
53. Amitani M, Amitani H, Cheng K-C, Kairupan TS, Sameshima N, Shimoshikiryō I, Mizuma K, Rokot NT, Nerome Y, Owaki T, Asakawa A, Inui A. The role of ghrelin and ghrelin signaling in aging. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):1511-1528.
54. Dardzińska JA, Malgorzewicz S, Kaska E, Proczko M, Stefaniak T, Stankiewicz M, Sledziński Z. Fasting and postprandial acyl and desacyl ghrelin levels in obese and non-obese subjects. *Endokrynol Pol*. 2014;65(5):377-381.
55. Prudom C, Liu J, Patrie J, Gaylinn BD, Foster-Schubert KE, Cummings DE, Thorner MO, Geysen HM. Comparison of competitive radioimmunoassays and two-site sandwich assays for the measurement and interpretation of plasma ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2351-2358.
56. Falkén Y, Hellström PM, Holst JJ, Näslund E. Changes in glucose homeostasis after Roux-en-Y gastric bypass surgery for obesity at day three, two months, and one year after surgery: role of gut peptides. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):2227-2235.

APÊNDICE C - Artigo 2 - Walking and Postural Balance in Adults with Severe Short Stature due to Isolated GH Deficiency (*Endocrine Connections*)



A A Santana-Ribeiro,
G A Moreira-Brasileiro et al.

Postural balance in GH
deficiency

8:4

416–424

RESEARCH

Walking and postural balance in adults with severe short stature due to isolated GH deficiency

Ananda A Santana-Ribeiro^{1,*}, Giulliani A Moreira-Brasileiro^{1,2,*}, Manuel H Aguiar-Oliveira³, Roberto Salvatori⁴, Vitor O Carvalho², Claudia K Alvim-Pereira¹, Carlos R Araújo-Daniel⁵, Júlia G Reis-Costa¹, Alana L Andrade-Guimarães^{1,2}, Alécia A Oliveira-Santos³, Edgar R Vieira⁶ and Miburge B Gois-Junior^{1,2,6}

¹Laboratory of Motor Control and Body Balance, Center for Health Science Research, Federal University of Sergipe, Sergipe, Brazil

²Department of Physical Therapy and Post-Graduate Program in Health Science, Federal University of Sergipe, The GREAT Group (Grupo de Estudos em Atividade física), Sergipe, Brazil

³Division of Endocrinology, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil

⁴Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

⁵Department of Statistic and Actuarial Sciences, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil

⁶Department of Physical Therapy and Neuroscience, Wertheims' College of Nursing and Health Science, Florida International University, Miami, Florida, USA

Correspondence should be addressed to M H Aguiar-Oliveira: herminio@infonet.com.br

*A A Santana-Ribeiro and G A Moreira-Brasileiro contributed equally to this work

Abstract

Objectives: Walking and postural balance are extremely important to obtain food and to work. Both are critical for quality of life and ability to survive. While walking reflects musculoskeletal and cardiopulmonary systems, postural balance depends on body size, muscle tone, visual, vestibular and nervous systems. Since GH and IGF-I act on all these systems, we decided to study those parameters in a cohort of individuals with severe short stature due to untreated isolated GH deficiency (IGHD) caused by a mutation in the GHRH receptor gene. These IGHD subjects, despite reduction in muscle mass, are very active and have normal longevity.

Methods: In a cross-sectional study, we assessed walking (by a 6-min walk test), postural balance (by force platform) and fall risk (by the 'Timed Up and Go' test) in 31 IGHD and 40 matched health controls.

Results: The percentage of the walked distance measured in relation to the predicted one was similar in groups, but higher in IGHD, when corrected by the leg length. Absolute postural balance data showed similar velocity of unipodal support in the two groups, and better values, with open and closed eyes and unipodal support, in IGHD, but these differences became non-significant when corrected for height and lower-limb length. The time in 'Timed Up and Go' test was higher in IGHD cohort, but still below the cut-off value for fall risk.

Conclusion: IGHD subjects exhibit satisfactory walking and postural balance, without increase in fall risk.

Key Words

- ▶ GH deficiency
- ▶ balance
- ▶ walking

Endocrine Connections
(2019) 8, 416–424



Introduction

The ability to walk erect on two legs exerted great evolutionary potential for the human species. Walking and postural balance are extremely important to get around, obtain food and work. Both functions are critical for quality of life and ability to survive in hostile environments with limited access to transport and food. While walking reflects musculoskeletal and cardiopulmonary systems, postural balance depends on body size, muscle tone, visual, vestibular, somatosensory and central nervous systems (1, 2, 3, 4). This complex system favors the equilibrium, guaranteeing postural balance and reducing the risk of falls (5, 6). Several factors such as height, leg length and lean and fat mass (7, 8, 9, 10) may affect walking and postural balance.

Mice with reduced GH signaling have better physical capacity than normal animals (11). It is unclear if humans with isolated GH deficiency (IGHD) in combination with reduced body size have adequate walking and postural balance. If so, they may have advantageous features for obtaining food and saving energy throughout life and in the prevention of falls, especially in older age. It is understandable that these features are not critical for mice living permanently in cages and undergoing standardized experimental conditions.

We have described in Itabaianinha county, in northeastern Brazil, a large cohort of individuals with IGHD, due to the c57+1G→A mutation in the GH-releasing hormone receptor gene (*GHRHR*, OMIM n. 612781), resulting in low serum GH and IGF-I throughout their life (12). Although these individuals are severely short, with reduced lean body mass and increased fat percentage, they perform vigorous daily physical activities such as pottery, farming and domestic work (13). Although these subjects report higher prevalence of dizziness (14), they are not prone to fractures even at advanced ages (15). They also have normal quality of life (16) and longevity (17). Recently, we have shown that these untreated IGHD subjects have better muscle strength parameters adjusted for weight and fat free mass than controls, satisfactory muscle function and greater resistance to fatigue (18), contributing to possible benefits of short stature in these individuals, who live in the real world, with dimensions adapted to people of normal height (19). Therefore, we hypothesized that their walking capacity and postural balance would also be satisfactory, contributing to their environmental adaptation, probably reducing their falls' risk. In an attempt of finding out subtle differences between two, *a priori*, healthy groups (the IGHD subjects and their

normal counterparts), we used the gold standard method to assess the balance, the force plate, which measures postural sway by calculating the center of pressure (20, 21). Measures of balance using questionnaires, like the Berg Balance Scale, are limited by subjective interpretation, ceiling effects and low sensitivity (20, 22, 23) and are more useful in neurological diseases, in which sensitivity is less relevant.

The aims of this study were to assess walking, postural balance and fall risk in congenital, untreated, lifetime IGHD subjects.

Methods

Subjects

In a cross-sectional study, adult GH-naïve IGHD subjects and controls with similar socioeconomic conditions and paired by age, sex and BMI were recruited by advertising in the local Dwarfs Association Building and by word of mouth among the inhabitants of Itabaianinha county. Inclusion criteria for IGHD group were age 18 years or above and homozygosity for the c57+1G→A *GHRHR* mutation for the IGHD and for the wild-type allele for controls (13). Exclusion criteria were previous GH replacement therapy, known labyrinth disorders, functional and respiratory limitations and orthopedic diseases.

Thirty-one IGHD and 40 health controls paired by age, sex, blood pressure and BMI were enrolled. Experiments were carried out in a gym in the Itabaianinha municipal seat. The protocol was approved by the Institutional Review Board of Federal University of Sergipe, and all subjects gave their written informed consent.

Anthropometric data and level of physical activity

We used a tetrapolar bioelectrical impedance device with 50KHz (Model 450, Biodynamics, LTDA, and São Paulo, Brazil) to assess fat and fat free mass (18). The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) was used to assess the type and level of physical activity in the last 7 days. The types of activity were walking; activities of moderate intensity (such as carrying light loads, cycling at a regular pace or doubling sneakers) and vigorous intensity activities (such as weight lifting, digging, aerobics or fast cycling). The level of activity was coded at high=3 (at least 1 h of moderate-intensity activity above basal activity level or half an hour of vigorous-intensity activity beyond baseline daily level); moderate=2

(half an hour of moderate intensity on most days); and low=1 (not meeting any of the criteria for any of the previous categories) (24).

Six-minute walk test

This test assesses the global response of all the systems involved during exercise, namely the pulmonary and cardiovascular systems, systemic circulation, peripheral circulation, blood, neuromuscular units and muscle metabolism. It measures the distance that a subject can walk quickly on a flat, hard 100-ft hallway in a period of 6 min. The test was performed according to the current American Thoracic Society (ATS) guidelines (25, 26). Individuals were asked to wear comfortable shoes and avoid high-intensity physical activity 2 h prior to the test. Fasting was not requested. They were instructed to 'walk as far as possible without running for 6 min'. Subjects could slow down and stop if necessary. In case of interruption, they could restart as soon as they felt able, without pausing the countdown. After the first minute, the subject was told 'You are doing well. You have 5 min to go'. When the timer showed 4 min remaining, the subject was told: 'Keep up the good work. You have 4 min to go'. When the timer showed 3 min remaining, the subject was told 'You are doing well. You are halfway done'. When the timer showed 2 min remaining, the subject was told: 'Keep up the good work. You have only 2 min left'. When the timer showed only 1 min remaining, the subject was told: 'You are doing well. You have only 1 min to go'. When the timer was 15 s from completion, the subject was told: 'In a moment I am going to tell you to stop. When I do, just stop right where you are and I will come to you'.

Heart rate (HR) was assessed at rest, at the end of 6 min and at the first and second minutes of recovery.

A self-assessment of the perceived exertion was obtained by the modified Borg Scale (27). In this scale, the ratio properties were graded from 0 (nothing at all), 0.5 (very, very weak), 1 (very weak), 3 (moderate), 4 (somewhat strong), 5 (strong), 7 (very strong) and 10 (very, very strong). The predicted walked distance was calculated by a standardized Brazilian formula: $356.658 - (2.303 \times \text{age}) + (36.648 \times \text{gender}) + (1.704 \times \text{height}) + (1.365 \times \Delta \text{HR})$. Gender was coded 1 for male and zero for females (28). The percentage of the walked distance in relation to the predicted one was calculated.

Postural balance

Postural balance was evaluated by the force platform, which measures the oscillations of the human body in the anteroposterior and mediolateral directions. All tests were performed by a single trained physiotherapist (G A M-B), in a force plate equipment (triaxial digital KINECT P-6000, Porto Alegre, Brazil) with a frequency of 100 Hz, calibrated before each evaluation, following the manufacturer's instructions. Before data collection, individuals were instructed to perform three 30-s tests in the sequence: open and closed eyes, standing with both feet (bipodal support) and with open eyes, standing with one foot (unipodal support). For the correct positioning of the individuals, the force plate was demarcated with adhesive tape at the central point. After individuals climbed barefoot on force plate, no adjustments were made to the feet. The subjects were asked to fix their eyes on a visual marker placed at the mean height of each group. Mediolateral and anteroposterior displacements (mm) and velocity of the center of pressure (mm/s) (29, 30, 31) were measured (Fig. 1). The theoretical assumptions of the postural balance measurement are that individuals with

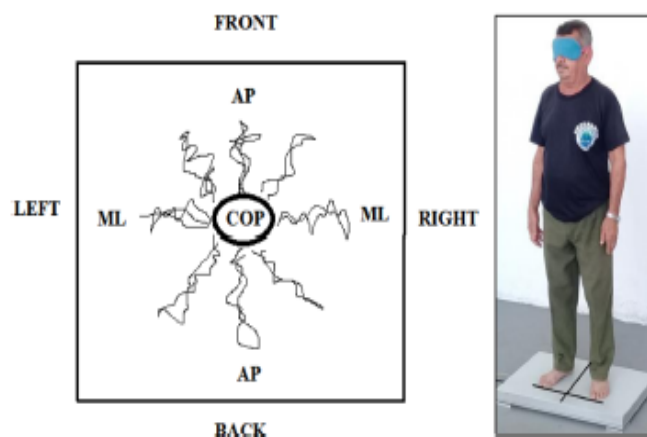


Figure 1

Illustration of the trajectories of the center of pressure (COP) on the force plate during static balance in the anteroposterior (AP), mediolateral (ML) displacement and respective diagonals.

higher amplitudes of oscillation and/or higher oscillation velocity have worse postural balance. Due to the risk of fall, a security technician was available to intervene in cases of large postural oscillations.

Fall risk

Fall risk was assessed by the 'Timed Up and Go' test. Individuals were positioned seated in a chair, with back support, and with their feet in contact with the floor. The IGHD subjects used a smaller chair, according to their size. After verbal command, the individuals got up from the chair, walked a distance of 3 m in a straight line and returned to the initial position. The time is the main outcome of this test. Lower values identify better performance, with 12 s being the usual cut-off point which indicates fall risk (6). The chair used for both individuals with IGHD and for the control group was adjusted to allow the 90° angle of hip and knee flexion when participants took the sitting position (30, 32).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the statistical software SPSS/PC 8.0 (SPSS, Inc.). Values for continuous variables are expressed as the mean $\pm$ standard deviation and frequency for the qualitative variables. Student's *t* test was used for the comparison of the two groups. Significance was established by a *P* value lower than 0.05. We corrected the variables of the force platform and of the time in 'Timed Up and Go' test, by dividing them with the height and the lower-limb length (LLL).

Results

Table 1 shows the anthropometric and blood pressure data. As expected, height, weight and LLL were reduced in the IGHD group. Table 2 shows the data of the 6-min walking test. There was no difference in HR at rest or at the sixth minute of walking nor at 1 or 2 min of recovery, neither in the sensation of dyspnea after exercise. The walked measured and predicted distances were lower in the IGHD group, but the percentage of the walked measured distance in relation to the predicted one was similar between the groups. In addition, the walked distance corrected by the leg length was higher than that in the controls. While both the velocity of the center of pressure with open eye (6.8 ± 1.4 vs 8.0 ± 2.0 mm/s, $P=0.005$) and with closed eye (7.8 ± 2.6 vs 9.9 ± 2.8 , $P=0.002$) were lower in IGHD

Table 1 Anthropometric, physical activity assessed by the international physical activity questionnaire (IPAQ), and blood pressure data in 31 isolated growth hormone deficiency (IGHD) and 40 controls. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

	IGHD	Controls	<i>P</i> value
Sex (Males)	16	20	1.000
Age (years)	46 $\pm$ 12	43 $\pm$ 11	0.992
Weight (kg)	38 $\pm$ 7	67 $\pm$ 11	<0.001
Height (cm)	125 $\pm$ 8	166 $\pm$ 10	<0.001
Standard deviation score for height	-8.6 $\pm$ 1.3	-0.3 $\pm$ 1.5	<0.001
BMI (kg/m ²)	23.4 $\pm$ 3.4	24.1 $\pm$ 2.8	0.354
Fat mass (%)	36.5 $\pm$ 13.2	23.17 $\pm$ 8.5	<0.001
Fat free mass (kg)	25.6 $\pm$ 7.2	53.8 $\pm$ 12.1	<0.001
Lower-limb length (cm)	59.0 $\pm$ 5	81 $\pm$ 7	<0.001
Physical activity level	1.45 $\pm$ 0.5	1.51 $\pm$ 0.5	0.616
Systolic blood pressure (mmHg)	111 $\pm$ 9	115 $\pm$ 10	0.065
Diastolic blood pressure (mmHg)	79 $\pm$ 5	80 $\pm$ 4	0.079

The scoring system and the domains of IPAQ questionnaire were detailed in the 'Methods' section.

than controls, the velocity of the unipodal support of the center of pressure was similar in the groups (30.4 ± 7.1 vs 32.4 ± 6.4 , $P=0.214$). Table 3 shows the displacement of the static postural equilibrium and the 'Timed Up and Go' test in absolute and corrected values for height and LLL. The absolute values were significantly better in the IGHD group in comparison to controls, but when corrected for height and LLL, these differences disappeared. The 'Timed Up and Go' test was higher in IGHD than controls in both absolute value and in value corrected for height or LLL, but was still below 12 s, the cut-off point which indicates fall risk.

Discussion

This work shows that adult individuals with congenital, untreated severe IGHD have similar walking and postural balance to normal controls, paired by sex, age and degree of physical activity. These data expand our previous observation that these IGHD subjects have better muscle strength parameters when adjusted for weight and fat free mass than controls. They also exhibit greater peripheral resistance to fatigue, demonstrating satisfactory muscle function (18), in spite of having marked reduction of fat free mass and increase of fat percentage (33, 34), throughout the life.

Table 2 Six-minute walk test in 31 isolated GH deficiency (IGHD) subjects and 40 controls. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

	IGHD	Controls	P value
Heart rate of rest (bpm)	83 $\pm$ 11	88 $\pm$ 13	0.106
Heart rate at the sixth minute (bpm)	103 $\pm$ 19	100 $\pm$ 16	0.456
Heart rate at 1 min recovery (bpm)	90 $\pm$ 14	83.8 $\pm$ 13	0.065
Heart rate at 2 min recovery (bpm)	85 $\pm$ 13	83 $\pm$ 13	0.483
Dyspnea (Borg)	4.7 $\pm$ 1.3	4.6 $\pm$ 1.2	0.808
Walked distance (m)	348 $\pm$ 64	393 $\pm$ 40	0.001
Predicted distance (m)	508 $\pm$ 54	575 $\pm$ 41	<0.0001
Distance walked based on prediction (%)	68 $\pm$ 12	69 $\pm$ 7	0.978
Distance walked/leg length (meter/cm)	6 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	<0.0001

Our data expand the benefits of lifetime IGHD in terms of health and longevity (19). Walking and postural balance are extremely important for small people who survive in potentially hostile environments, to get around, obtain food, work and reduce falls. To our knowledge, the IGHD people of Itabaianinha are the only available model to evaluate the consequences of lifetime lack of GH.

We had previously studied in these subjects the maximal cardiac stress test, with a treadmill Bruce protocol, performing stress echocardiograms to assess coronary atherosclerosis (35). This and subsequent studies showed no evidence of premature atherosclerosis (despite increase in total and LDL cholesterol) (36). Accordingly, they have normal longevity (17). However, the Bruce protocol produces a stress condition that mirrors major

physical effort, surgery, emotional trauma or accidents, not ordinarily found in daily life. In this paper, we aimed to assess the submaximal level of functional capacity, as most activities of daily living are performed at submaximal levels of exertion. Therefore, we used the 6-min walking test, which better reflects the functional exercise level for daily physical activities (25). Our data show that the walked measured or predicted distances are lower in the IGHD group, but the percentage of the walked measured distance in relation to the predicted one was similar between the groups. In addition, the walked distance corrected by the LLL was indeed higher in IGHD subjects. These data show that when corrected for height, these IGHD subjects walk similar to normal statured controls, and when corrected by the lower member length, they seem to walk better.

Table 3 Displacements (mm) of the static postural equilibrium with open eye (OE), closed eye (CE) and unipodal support (US) and the time (s) of the 'Timed Up and Go' test in absolute and corrected values for height (cm) and lower-limb length (LLL, cm), in 31 isolated GH deficiency (IGHD) and 40 controls. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

	IGHD	Controls	P value
Displacement OE mediolateral	14.6 $\pm$ 4.0	19.2 $\pm$ 5.3	<0.001
Displacement OE mediolateral/height	0.13 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.04	0.382
Displacement OE mediolateral/LLL	0.28 $\pm$ 0.10	0.26 $\pm$ 0.08	0.358
Displacement OE anteroposterior	8.5 $\pm$ 3.2	14.1 $\pm$ 4.5	<0.001
Displacement OE anteroposterior/height	0.06 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.04	0.077
Displacement OE anteroposterior/LLL	0.14 $\pm$ 0.07	0.18 $\pm$ 0.09	0.083
Displacement CE mediolateral	14.9 $\pm$ 3.1	17.2 $\pm$ 2.5	<0.001
Displacement CE mediolateral/height	0.13 $\pm$ 0.10	0.14 $\pm$ 0.05	0.753
Displacement CE mediolateral/LLL	0.29 $\pm$ 0.21	0.30 $\pm$ 0.10	0.771
Displacement CE anteroposterior	7.7 $\pm$ 2.0	12.9 $\pm$ 3.6	<0.001
Displacement CE anteroposterior/height	0.07 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.04	0.519
Displacement CE anteroposterior/LLL	0.15 $\pm$ 0.17	0.17 $\pm$ 0.09	0.502
Displacement US mediolateral	28.4 $\pm$ 6.1	33.5 $\pm$ 5.2	<0.001
Displacement US mediolateral/height	0.29 $\pm$ 0.20	0.28 $\pm$ 0.13	0.694
Displacement US mediolateral/LLL	0.65 $\pm$ 0.45	0.61 $\pm$ 0.30	0.729
Displacement US anteroposterior	25.8 $\pm$ 4.7	31.4 $\pm$ 4.7	<0.001
Displacement US anteroposterior/height	0.28 $\pm$ 0.29	0.21 $\pm$ 0.1	0.211
Displacement US anteroposterior/LLL	0.62 $\pm$ 0.64	0.47 $\pm$ 0.3	0.237
Timed Up and Go test	11.3 $\pm$ 2.1	7.1 $\pm$ 1.4	0.010
Timed Up and Go test/height	0.09 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01	<0.001
Timed Up and Go test/LLL	0.19 $\pm$ 0.7	0.10 $\pm$ 0.02	<0.001

The relationship between height and distance traveled and the length of the lower limb is intuitive. Walking speed is also an objective measure of lower-limb neuromuscular function and physical performance. It relates to functional abilities, morbidity and mortality, being a potent 'vital sign' in older adults (37). We believe that the normal walking of these IGHD subjects, coupled with their better muscle strength parameters (18) contributes to their environmental adaptation, keeping a large number of subjects alive in a rural and potentially hostile environment for more than two centuries.

The 6-min walking test has become a standard tool in clinical practice and research because it is considered a tool that can evaluate the performance, function and response to treatment of individuals with cardiorespiratory disorders (25, 26). For instance, patients with pulmonary hypertension with values less than 332m have shorter survival rate than those walking farther (38). To our knowledge, this is the first report of this test being performed in individuals with severe IGHD and marked short stature. Although we did not intend to establish limits of normality of this test in people with severe short stature, these data can be useful to researchers interested in walking of proportionate short stature of any causes.

Animal data in GH receptor-knockout (GHRKO) (11) and GHRH-knockout (GHRHKO) mice (39) show an increase in locomotor and thermogenic activities. We have shown that our IGHD subjects have a higher caloric intake corrected by body weight (40). We think that their greater peripheral resistance to fatigue (18) coupled to satisfactory walking, may have beneficial consequences, improving cardiopulmonary function and avoiding excessive fat accumulation in individuals with severe impairment of the lipolysis due to GH deficiency.

IGHD subjects showed lower non-corrected oscillation in the postural balance for open eye, close eye and unipodal support variables when compared to the control group. It is important to note that individuals with short stature and consequently LLL may present lower postural oscillation. Biomechanically, these lower values of postural oscillation can be explained by the fact that the human body functions as an inverted pendulum (41). Joint amplitudes of the ankle and proximity of the gravitational center to the base of support promote an increase in the internal torque favorable to the postural balance. The proximity of the gravitational center to the base of support promotes an increase in the internal torque favorable to the postural equilibrium. Accordingly, when we corrected these

measures of postural balance for height and LLL, these differences disappeared, suggesting a role of height or LLL in these measures.

However, two other important factors that seem to directly influence postural balance oscillation are fat mass content and BMI. Studies have shown that overweight individuals present greater postural balance due to hypersensitivity of foot mechanoreceptors (42, 43). This fact is explained by somatosensory stimulation, which causes neuroplasticity in the motor cortex by proprioceptive increase in the area of plantar contact (44). Other studies have shown that increased fat mass promotes greater postural oscillation (45). Conversely, a recent study showed that fat mass and BMI are not able to influence postural oscillation parameters in the unipodal support (8). Although our IGHD subjects present higher fat mass percentage, they exhibit normal or more frequently low BMI values (18, 34) due to the small size of muscles and bones. Therefore, we cannot draw final conclusions on the role of BMI on the body oscillation in these subjects.

The proprioceptive systems are of great relevance for the maintenance of postural balance (2). Previously, we reported that these IGHD individuals had normal visual acuity (46) and mild hearing loss, but complained more of dizziness than controls (14). This subjective complain of mild dizziness contrasts with the lack of hip fracture even in individuals older than 90 years (36). Indeed, going back as far as 1892, there is no death certificate reporting hip fracture as cause of death in any of the IGHD subjects (17). In addition, we have previously shown that the mean number of vertebral fractures in individuals older than 60 years was lower in IGHD than in controls (36). It is well known that one-third of normal people over 65 years of age will suffer falls at least once a year, some resulting in serious injuries, and the majority leading to impaired mobility, loss of function and decreased quality of life (47). Data of the present work show normal postural balance in these IGHD subjects, contributing to their low fall risk, excellent health and high quality of life (16), including in advanced age (19).

The 'Timed Up and Go' test was higher in IGHD cohort than the controls, likely reflecting their shorter limb length, causing longer execution time (44). Nevertheless, this time remains within the predicted normal range for normal statured people and below the threshold of fall risk (9).

One study with 8300 women aged 65–89 years with a wide variation in physical function and lifestyles from four large metropolitan areas in the United States concluded

that lifestyle factors (not smoking, going outdoors frequently, walking at a fast usual-paced walking speed and high physical activity) and shorter body height may reduce the fall risk (48). Our IGHD subjects rarely smoke (49) and have all the other protective factors against the fall risk. The satisfactory walking and postural balance contribute to the good quality of life, overall health and no evidence of falls in this IGHD cohort. Therefore, we do not think that walking and postural balance need to be routinely evaluated in individuals with IGHD. Our data will be useful to compare with other forms of congenital or acquired GH deficiency, GH insensitivity syndromes or other causes of dwarfism.

Our work has one major limitation. We cannot separate the consequences of lack of GH from short stature. To study this aspect, one would need a group of individuals with similar stature and normal GH secretion, as we used in a voice study (50). However, most causes of severe short stature (e.g. achondroplasia and 3-M syndrome) have trunk/limb disproportion and specific orthopedic problems and are therefore not adequate controls for well-proportioned patients with no relevant orthopedic problems.

In conclusion, our data demonstrate that adults with severe short stature due to IGHD show satisfactory walking and postural balance, without increase in fall risk. These data expand previous observations of adequate muscle function in these subjects, despite marked reduction in muscle mass. These data exemplify another dissociation between muscle mass and function and contribute to establish an overall beneficial health profile of these subjects living with markedly reduced GH and IGF-I levels.

Declaration of interest

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

Funding

This work did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sector.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Acknowledgments

The authors thank the Associação do Crescimento Físico e Humano de Itabianinha, for assistance.

References

- 1 Hausen E, Martins VF, Teixeira AR, Zabaleta AD & Gonçalves AK. The relation between muscle strength and balance in elderly individuals enrolled in a balance program. *ConScientiae Saúde* 2013 **12** 580–587.
- 2 Saffari LN & Kwon OS. Ageing vision and falls: a review. *Journal of Physiological Anthropology* 2018 **37** 11. (<https://doi.org/10.1186/s40101-018-0170-1>)
- 3 Inukai Y, Otsuru N, Masaki M, Saito K, Miyaguchi S, Kojima S & Onishi H. Effect of noisy galvanic vestibular stimulation on center of pressure sway of static standing posture. *Brain Stimulation* 2018 **11** 85–93. (<https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.10.007>)
- 4 Azzi NM, Coelho DB & Teixeira LA. Automatic postural responses are generated according to feet orientation and perturbation magnitude. *Gait & Posture* 2017 **57** 172–176. (<https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2017.06.003>)
- 5 Vieira ER, Palmer RC & Chaves PHM. Prevention of falls in older people living in the community. *BMJ* 2016 **353** i1419. (<https://doi.org/10.1136/bmj.i1419>)
- 6 Lusardi MM, Fritz S, Middleton A, Allison L, Wingood M, Phillips E, Criss M, Verma S, Osborne J & Chui KK. Determining risk of falls in community dwelling older adults: a systematic review and meta-analysis using posttest probability. *Journal of Geriatric Physical Therapy* 2017 **40** 1–36. (<https://doi.org/10.1519/JPT.0000000000000099>)
- 7 Pereira C, Silva RA, Oliveira MR, Souza RDN, Borges JR & Vieira ER. Effect of body mass index and fat mass on balance force platform measurements during a one-legged stance in older adults. *Aging: Clinical and Experimental Research* 2017 **30** 441–447.
- 8 Bohrer RCD, Pereira G, Beck JKM, Lodovico A & Rodacki A. Multicomponent training program with high-speed movement execution of ankle muscles reduce risk of falls in older adults. *Rejuvenation Research* 2018 1–23.
- 9 Frames CW, Soangra R, Lockhart TE, Lach J, Ha DS, Roberto KA & Lieberman A. Dynamical properties of postural control in obese community-dwelling older adults. *Sensors* 2018 **18** 1–15. (<https://doi.org/10.3390/s18061692>)
- 10 Carral JM, Ayán C, Sturzing L & Gonzalez G. Relationship between body mass index and static and dynamic balance in active and inactive older adults. *Journal of Geriatric Physical Therapy* 2018 [epub]. (<https://doi.org/10.1519/JPT.0000000000000195>)
- 11 Basu R, Qian Y & Kopchick JJ. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Lessons from growth hormone receptor gene disrupted mice: are there benefits of endocrine defects? *European Journal of Endocrinology* 2018 **178** R155–R181. (<https://doi.org/10.1530/EJE-18-0018>)
- 12 Salvatori R, Hayashida CH, Aguiar-Oliveira MH, Phillips JA, Souza AH, Gondon RG, Toledo SP, Conceição MM, Prince M, Maheshwari HG, et al. Familial dwarfism due to a novel mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 917–923.
- 13 Aguiar-Oliveira MH, Souza AHO, Oliveira CRP, Campos VC, Oliveira-Neto LA & Salvatori R. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: The multiple facets of GHRH/GH/IGF-I axis: lessons from lifetime, untreated, isolated GH deficiency due to a GHRH receptor gene mutation. *European Journal of Endocrinology* 2017 **177** R85–R92. (<https://doi.org/10.1530/EJE-16-1047>)
- 14 Prado-Barreto VM, Salvatori R, Santos Júnior RC, Brandão-Martins MB, Correa EA, Garcez FB, Valença EH, Souza AH, Pereira RM, Nunes MA, et al. Hearing status in adult individuals with lifetime, untreated isolated growth hormone deficiency. *Otolaryngology: Head and Neck Surgery* 2014 **150** 464–471. (<https://doi.org/10.1177/0194599813517987>)
- 15 Souza AH, Farias MI, Salvatori R, Silva GM, Santana JA, Pereira FA, de Paula FJ, Valença EH, Melo EV, Barbosa RA, et al. Lifetime untreated isolated GH deficiency due to a GH-releasing hormone receptor mutation has beneficial consequences on bone status in older individuals, and does not influence their abdominal aorta

- calcification. *Endocrine* 2014 **47** 191–197. (<https://doi.org/10.1007/s12020-013-0118-5>)
- 16 Barbosa JAR, Salvatori R, Oliveira CRP, Pereira RMC, Farias CT, Brito AVO, Farias NT, Blackford A & Aguiar-Oliveira MH. Quality of life in congenital, untreated, lifetime isolated growth hormone deficiency. *Psychoneuroendocrinology* 2009 **34** 894–900. (<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.001>)
 - 17 Aguiar-Oliveira MH, Oliveira FT, Pereira RMC, Oliveira CRP, Blackford A, Valença EHO, Santos EG, Gots-Junior MB, Meneguzzo-Moreno RA, Araújo VP, et al. Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 714–721. (<https://doi.org/10.1210/jc.2009-1879>)
 - 18 Andrade-Guimarães AL, Aguiar-Oliveira MH, Salvatori R, Carvalho VO, Alvim-Pereira F, Daniel CRA, Brasileiro GAM, Santana-Ribeiro AA, Santos-Carvalho HA, Oliveira CRP, et al. Adult individuals with congenital, untreated, severe isolated growth hormone deficiency have satisfactory muscular function. *Endocrine* 2019 **63** 112–119. (<https://doi.org/10.1007/s12020-018-1763-5>)
 - 19 Aguiar-Oliveira MH & Bartke A. Growth hormone deficiency: health and longevity. *Endocrine Reviews* 2018 **40** 575–601. (<https://doi.org/10.1210/er.2018-00216>)
 - 20 Levy SS, Thralls KJ & Kvatskovsky SA. Validity and reliability of a portable balance tracking system, btracks, in older adults. *Journal of Geriatric Physical Therapy* 2018 **41** 102–107. (<https://doi.org/10.1519/JPT.0000000000000111>)
 - 21 Harro CC & Garaschka C. Reliability and validity of computerized force platform measures of balance function in healthy older adults. *Journal of Geriatric Physical Therapy* 2018 [epub]. (<https://doi.org/10.1519/JPT.0000000000000175>)
 - 22 Pardasany PK, Latham NK, Jette AM, Wagenaar RC, Ni P, Slavin MD & Bean JF. Sensitivity to change and responsiveness of four balance measures for community-dwelling older adults. *Physical Therapy* 2012 **92** 388–397. (<https://doi.org/10.2522/ptj.20100398>)
 - 23 Bogle Thorbahn LD & Newton RA. Use of Berg balance test to predict falls in elderly persons. *Physical Therapy* 1996 **76** 576–83; discussion 584. (<https://doi.org/10.1093/ptj/76.6.576>)
 - 24 IPAQ Research Committee. Guidelines for data processing and analysis of the International physical activity questionnaire (IPAQ) short and long forms. *International Physical Activity Questionnaire* 2005. (available at: <https://sites.google.com/site/theipaq/home>)
 - 25 American Thoracic Society. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002 **166** 111–117. (<https://doi.org/10.1164/ajrccm.166.1.1102>)
 - 26 Holland AE, Spruit MA, Troosters T, Puhan MA, Peplin V, Saey D, McCormack MC, Carlin BW, Sciruba PC, Pitta F, et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society technical standard: field walking tests in chronic respiratory disease. *European Respiratory Journal* 2014 **44** 1428–1446. (<https://doi.org/10.1183/09031936.00150314>)
 - 27 Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1982 **14** 377–381. (<https://doi.org/10.1249/00005768-198205000-00012>)
 - 28 Brito RR, Probst VS, Andrade AFD, Samora GAR, Hernandez NA, Marinho PEM, Karsten M, Pitta F & Parreira VE. Reference equations for the six-minute walk distance based on Brazilian multicenter study. *Brazilian Journal of Physical Therapy* 2013 **17** 556–563. (<https://doi.org/10.1590/S1413-35552012005000122>)
 - 29 Patrick J, Sparto AB, Newman EM, Simonick P, Caserotti ES, Strotmeyer SB, Kritchevsky K & Yaffe CR. Contributions to lateral balance control in ambulatory older adults. *Revue Aging Clinique Expérimentale* 2017 **30** 633–641.
 - 30 Ibrahim A, Singh DKA & Shahar S. 'Timed up and go' test: age, gender and cognitive impairment stratified normative values of older adults. *PLoS ONE* 2017 **12** e0185641. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185641>)
 - 31 Silva RA, Vieira ER, Carvalho CE, Oliveira MR, Amorim CF & Neto EM. Age-related differences on low back pain and postural control during one-leg stance: a case-control study. *European Spine Journal* 2015 **25** 1251–1257.
 - 32 Podstadlo D & Richardson S. The timed 'up and go': a test of basic functional 362 mobility for frail elderly persons. *Journal of the American Geriatrics Society* 1991 **39** 142–148. (<https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1991.tb01616.x>)
 - 33 Barreto-Filho JA, Alcântara MR, Salvatori R, Barreto MA, Sousa AC, Bastos V, Souza AH, Pereira RM, Clayton PE, Gill MS, et al. Familial isolated growth hormone deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 2018–2023. (<https://doi.org/10.1210/jcem.87.5.8474>)
 - 34 Gomes-Santos E, Salvatori R, Ferrão TO, Oliveira CRP, Diniz RDCA, Santana JAM, Pereira FA, Barbosa RA, Souza AH, Melo EV, et al. Increased visceral adiposity and cortisol to cortisone ratio in adults with congenital lifetime isolated GH deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014 **99** 3285–3289. (<https://doi.org/10.1210/jc.2014-2132>)
 - 35 Menezes Oliveira JL, Marques-Santos C, Barreto-Filho JA, Ximenes Filho R, de Oliveira Brito AV, Oliveira Souza AH, Prado CM, Pereira Oliveira CR, Pereira RM, Ribeiro Vicente Tde A, et al. Lack of evidence of premature atherosclerosis in untreated severe isolated growth hormone (GH) deficiency due to a GH-releasing hormone receptor mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 2093–2099. (<https://doi.org/10.1210/jc.2005-2571>)
 - 36 Souza AHO, Farias MIT, Salvatori R, Silva GMF, Santana JAM, Pereira FA, de Paula FJ, Valença EH, Melo EV, Barbosa RA, et al. Lifetime, untreated isolated GH deficiency due to a GH-releasing hormone receptor mutation has beneficial consequences on bone status in older individuals, and does not influence their abdominal aorta calcification. *Endocrine* 2014 **47** 191–197. (<https://doi.org/10.1007/s12020-013-0118-5>)
 - 37 Annweiler C, Henin S, Walrand S, Montero-Odasso M, Duque G & Duval GT. Vitamin D and walking speed in older adults: systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 2017 **106** 8–25. (<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.07.012>)
 - 38 Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, Nakantani N & Miyatake K. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000 **161** 487–492. (<https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.9906015>)
 - 39 Leone S, Chlavaroli A, Shohreh R, Ferrante C, Ricciuti A, Manippa F, Recinella L, Di Nisio C, Orlando G, Salvatori R, et al. Increased locomotor and thermogenic activity in mice with targeted ablation of the GHRH gene. *Growth Hormone and IGF Research* 2015 **25** 80–84. (<https://doi.org/10.1016/j.ghir.2014.12.007>)
 - 40 Oliveira-Santos AA, Salvatori R, Gomes-Santos E, Santana JA, Leal AC, Barbosa RA, Oliveira CR, Souza AH, Valença EH & Aguiar-Oliveira MH. Subjects with isolated GH deficiency due to a null GHRHR mutation eat proportionally more, but healthier than controls. *Endocrine* 2016 **51** 317–322. (<https://doi.org/10.1007/s12020-015-0670-2>)
 - 41 Vieira ER, Guerrero G, Holt D, Arreaza M, Veroes V & Brunt D. Limits of stability and adaptation to wearing rocker bottom shoes. *Foot and Ankle International* 2014 **35** 607–611. (<https://doi.org/10.1177/1071100714531227>)
 - 42 Teasdale N, Hue O, Marcotte J, Berrigan F, Simoneau M, Dore J, Marceau P, Marceau S & Tremblay A. Reducing weight increases postural stability in obese and morbid obese men. *International Journal of Obesity* 2007 **31** 153–160. (<https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803360>)

- 43 Hue O, Simoneau M, Marcotte J, Berrigan F, Doré J, Marceau P, Marceau S, Tremblay A & Teasdale N. Body weight is a strong predictor of postural stability. *Gait and Posture* 2007 **26** 32–38. (<https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2006.07.005>)
- 44 Azarpalkan A & Torbati HT. Effect of somatosensory and neurofeedback training on balance in older healthy adults: a preliminary investigation. *Ageing: Clinical and Experimental Research* 2017 **30** 745–753.
- 45 Yoon SW, Park WS & Lee JW. Effects of body mass index on plantar pressure and balance. *Journal of Physical Therapy Science* 2016 **28** 3095–3098. (<https://doi.org/10.1589/jpts.29.3095>)
- 46 Peretra-Gurgel VM, Faro AC, Salvatori R, Chagas TA, Carvalho-Junior JF, Oliveira CRP, Costa UMM, Melo GB, Hellström A & Aguiar-Oliveira MH. Abnormal vascular and neural retinal morphology in congenital lifetime isolated growth hormone deficiency. *Growth Hormone and IGF Research* 2016 **30–31** 11–15. (<https://doi.org/10.1016/j.ghir.2016.07.001>)
- 47 Tinetti ME, Speechley M & Ginter SF. Risk factors for falls among elderly persons living in the community. *New England Journal of Medicine* 1988 **319** 1701–1707. (<https://doi.org/10.1056/NEJM198812293192604>)
- 48 Faulkner KA, Cauley JA, Studenski SA, Landsittel DP, Cummings SR, Ensrud KE, Donaldson MG, Nevitt MC & Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Lifestyle predicts falls independent of physical risk factors. *Osteoporosis International* 2009 **20** 2025–2034. (<https://doi.org/10.1007/s00198-009-0909-y>)
- 49 Costa UMM, Oliveira CRP, Salvatori R, Barreto-Pilho JAS, Campos VC, Oliveira FT, Rocha IE, Oliveira JLM, Silva WA & Aguiar-Oliveira MH. Brazilian adult individuals with untreated isolated GH deficiency do not have accelerated subclinical atherosclerosis. *Endocrine Connections* 2016 **5** 41–46. (<https://doi.org/10.1530/EC-15-0118>)
- 50 Valença EH, Souza AH, Oliveira AH, Valença SL, Salvatori R, Gonçalves MI, Oliveira-Neto LA, Barros AD, Nascimento UN, Oliveira CR, *et al.* Voice quality in short stature with and without GH deficiency. *Journal of Voice* 2012 **98** 300–306.

Received in final form 1 March 2019

Accepted 13 March 2019

Accepted Preprint published online 13 March 2019

ANEXO A - Questionário Validado de Escala Analógica Visual (EAV)**Quanta fome você sente?**

Eu não estou com
fome alguma

Eu nunca estive com
tanta fome

Quanto satisfeito você se sente?

Eu estou completamente
vazio

Eu estou totalmente
cheio

O quanto você acha que pode comer?

Nada

Muito

**ANEXO B - Aprovação do Projeto na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa –
CONEP**

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Conselho Nacional de Saúde

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1361/2004

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

Registro CEP: 043/2004

Processo nº 25000.064789/2004-90

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

Pesquisador Responsável: Dr. Manuel Herminio de Aguiar Oliveira.

Instituição: Universidade Federal de Sergipe/SE

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

Ao se proceder à análise das respostas ao Parecer CONEP nº 112/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a- Foram atendidas as solicitações do referido parecer. 1
- b- O projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

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

Situação: Projeto aprovado
Brasília, 15 de julho de 2004.



WILLIAM SAAD HOSSNE Coordenador da
CONEP/CNS/MS