

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

RENATA MACHADO DE SOUZA

PERFIL HEPÁTICO NOS INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DE GH

ARACAJU-SE

2014

RENATA MACHADO DE SOUZA

PERFIL HEPÁTICO NOS INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DE GH

Monografia apresentada à Universidade Federal de Sergipe como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Graduado no curso de Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira

ARACAJU-SE

2014

RENATA MACHADO DE SOUZA

PERFIL HEPÁTICO NOS INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DE GH

Monografia apresentada ao colegiado do curso de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Medicina.

Autor: _____

Renata Machado de Souza

Orientador: _____

Prof. Dr. Manuel Hermínio Aguiar Oliveira

Examinador: _____

Prof. Dra. Carla Raquel Pereira Oliveira

ARACAJU-SE

2014

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Rivalda e João, por ter acreditado e investido nos meus estudos. Sem o apoio e dedicação de vocês nada disso seria possível. Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e interceder em todos os momentos da minha vida, sempre me conduzindo para o melhor caminho.

Aos meus pais, Rivalda e João, meus grandes exemplos e referência de amor maior, por toda dedicação, compreensão e auxílio. Sou eternamente grata a vocês.

A minha irmã Helena, sempre disponível e pronta para me ajudar em todos os momentos.

Ao meu namorado Allysson, pela companhia diária e por compartilhar comigo todos os momentos dessa conquista, sempre me incentivando, auxiliando e instruindo com todo seu amor e carinho.

Aos meus amigos do curso, em especial Anne, Mirna, Nyanne, Renata, Marina, Loren e Jonielly por tornar meus dias mais felizes e a caminhada mais fácil.

Ao meu grande professor e orientador Dr. Manuel Hermínio, serei eternamente grata pela oportunidade que me ofereceu. Obrigada pela paciência com que me acolheu e pela constante disposição em me orientar na elaboração deste trabalho. Aprendido muito com o senhor sobre a humildade, ética profissional e comprometimento que se deve ter com a pesquisa médica.

A todos os colaboradores da pesquisa em Itabaianinha, em especial ao Dr. Roberto Salvatori e Dra. Elenilde, pelo incentivo e ajuda ao meu progresso científico.

Aos anões de Itabaianinha, pela grande contribuição à ciência médica e por toda receptividade nesse trabalho.

***“Somos o que repetidamente
fazemos. A excelência portanto, não
é um feito, mas um hábito.”***

Aristóteles

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é conhecida por ser associada à resistência insulínica, aterosclerose e baixos níveis de IGF-I. Descrevemos uma coorte com deficiência isolada de GH (DIGH) devido à mutação c.57+1G→A no gene do receptor do hormônio liberador do GHRH com obesidade visceral, sensibilidade à insulina (SI), aumentada mas com aterosclerose tardia e longevidade normal. Formulamos a hipótese de que apesar da obesidade visceral, a DHGNA seria ausente ou leve, devido o aumento da SI. O objetivo do presente trabalho é avaliar a frequência e severidade da DHGNA na DIGH. Estudamos 22 adultos com DIGH e 25 controles (CO), pareados por idade e gênero. A DHGNA foi avaliada por um painel abrangente da função hepática e um padrão ultrassonográfico hiperecogênico (HP), codificado como 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderada; e 3 = grave. Em comparação com CO, indivíduos com DHGNA apresentaram concentrações menores de IGF - I ($p < 0,0001$), maior colesterol total ($p = 0,027$), reduzido tempo de protrombina ($p = 0,017$), e valores semelhantes de tempo de tromboplastina parcial ativado e do fibrinogênio. Os valores da ALT foram semelhantes em ambos os grupos, mas os da AST foram maiores nos indivíduos com DIGH ($p = 0,013$). No entanto, o número de indivíduos com ALT acima do limite superior da normalidade foi maior no grupo DIGH (7 / 22) de que no CO (3/23), ($p = 0,044$). HP foi superior em DIGH do que nos CO ($p = 0,041$), mas não foi observada DHGNA grave em qualquer indivíduo com DIGH (ou CO). Em conclusão, o escore do HP é maior nos indivíduos com DIGH não tratada. No entanto, o aumento de transaminases é suave, sugerindo ausência de formas avançadas de DHGNA na DIGH.

Palavras Chave: GH, IGF-I, DHGNA, Deficiência isolada de GH.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is known to be associated with insulin resistance, atherosclerosis, and low serum IGF-I levels. We have described a cohort with isolated GH deficiency (IGHD) due to the c.57+1G→A mutation in the GHRH receptor gene with visceral obesity, but increased insulin sensitivity (IS), delayed atherosclerosis and normal longevity. We hypothesized that despite visceral obesity, NAFLD would be absent or mild due to the increased IS. The objective is to assess the prevalence and severity of NAFLD in IGHD. We studied 22 IGHD adults and 25 controls (CO) matched for age and gender. NAFLD was assessed by a comprehensive liver function panel and a hyper echogenic ultrasonographic pattern (HP) coded as 0=absent; 1=mild; 2=moderate; and 3=severe. Compared to CO, IGHD individual had lower IGF- I ($p < 0.0001$), higher total cholesterol ($p=0.027$), lower prothrombin time ($p= 0.017$), similar activated partial thromboplastin time and fibrinogen values. ALT values were similar in both groups, but AST was higher in IGHD subjects ($p=0.013$). However, more IGHD subjects (7/ 22) than CO (3/23) had ALT above the upper limit of normal ($p=0.044$). The HP score was higher in IGHD than CO ($p=0.041$), but severe NAFLD was not observed in any IGHD (or CO) individual. In conclusion, liver HP score is increased in lifetime untreated IGHD, but the increase in transaminases is mild, suggesting lack of advanced forms of NAFLD.

Key Words: GH, IGF-I, NAFLD, Isolated GH deficiency.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS – Subunidade proteica ácido lábil
ALT-Alanine transaminase
APTT- Activated partial thromboplastin time
AST- Aspartate transaminase
AOGHD - Adult-onset GH deficient
BMI- Body mass index
CO- Controls
DGH – Deficiência do Hormônio do crescimento
DIGH – Deficiência Isolada do Hormônio do crescimento
GGT- Gamma-glutamyl transpeptidase
GH - Hormônio do crescimento
GHD- GH deficient
GH-R – Gene do receptor do Hormônio do crescimento
GH-R – Receptor do hormônio do crescimento
GHRH - Hormônio liberador do GH
GHRH-R – Gene do receptor do GHRH
GHRH-R – Receptor do hormônio liberador do GH
IGFBP-3 – Proteína carreadora de IGF, tipo 3
IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-II - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IGHD- Untreated congenital isolated GHD
INR- International normalized ratio
NAFLD- Non-alcoholic fatty liver disease
NASH- Nonalcoholic steatohepatitis
PA- Prothrombin activity
PT- Prothrombin time
SDS - Standard deviation scores

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica:

Figura 1. Esquema da regulação intrínseca do eixo GH-IGF-I.....	16
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Artigo:

TABLE.1: Demographic and anthropometric measurements in isolated GH deficiency IGHD (n=22) and control group, CO (n=25).....	70
TABLE. 2: Laboratorial data in isolated GH deficiency IGHD (n=22) and control group, CO (n=25)	71

SUMÁRIO

I.	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.	HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)	15
2.	CONTROLE DA SECREÇÃO DO GH	15
3.	FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA.....	17
4.	AÇÕES DO GH/IGF-I.....	18
5.	DEFICIÊNCIA DO GH.....	19
6.	DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)	22
7.	RELAÇÃO ENTRE DGH E DHGNA.....	24
II.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
III.	ARTIGO CIENTÍFICO	33
	TITLE	Erro! Indicador não definido.
	ABSTRACT	36
	INTRODUCTION	37
	SUBJECTS AND METHODS	39
	RESULTS.....	42
	DISCUSSION	43
	DECLARATION OF INTEREST	45
	FUNDING	45
	ACKNOWLEDGMENTS	45
	REFERENCES	46

I. REVISÃO DA LITERATURA

1. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio polipeptídico de 198 aminoácidos com duas ligações internas, peso molecular de 22 Kda, sintetizado e secretado pela hipófise anterior, representando metade das células desta glândula. É também conhecido como somatotropina ou hormônio somatotrópico. Através das células somatotróficas, ele promove o crescimento das cartilagens epifisárias de ossos longos e da massa muscular. Sua produção começa na vida fetal e continua por toda a vida, diminuindo no processo de envelhecimento. Ele desempenha também funções metabólicas específicas: aumento da velocidade da síntese proteica (balanço nitrogenado positivo), maior metabolização e utilização de ácidos graxos do tecido adiposo e aumento da utilização dos carboidratos, possuindo assim efeito anabólico, lipolítico e antagonista da insulina. (CUNEO *et al.*, 1992; UNDERWOOD *et al.*, 1992 ; ROSENFELD & COHEN, 2002).

2. CONTROLE DA SECREÇÃO DO GH

A secreção hipofisária de GH tem controle hipotalâmico, exercido fundamentalmente pelo hormônio liberador de GH (GHRH), em menor intensidade pela grelina e de forma inibitória pela somatostatina. Outros fatores como a tiroxina, o glucagon, os esteróides sexuais, a dopamina, a hipoglicemia e alguns hexapeptídeos sintéticos (GH releasing peptides) também estimulam a secreção de GH, através de atuação no hipotálamo e/ou na hipófise. (MARTINELLI *et al.*, 2005; ROSICKA *et al.*, 2002).

A secreção do GH ocorre em pulsos, principalmente no início das fases III e IV do sono, com meia-vida de aproximadamente 20 minutos. Normalmente ocorrem de 6 a 10 pulsos secretórios por dia, principalmente à noite, com concentrações entre os pulsos tão baixas quanto 0,04 µg/L. A amplitude dos pulsos e a massa de GH secretada variam com a idade, aumentando durante a puberdade, período em que ocorrer a maior secreção desse hormônio, e decaindo na vida adulta para concentrações semelhantes àsquelas observadas em indivíduos pré-púberes, diminuindo progressivamente com o envelhecimento (UNDERWOOD *et al.*, 1992; MARTINELLI *et al.*, 2005).

Além da idade, outros fatores estão profundamente relacionados com a secreção de GH. Dentre esses, pode-se citar os fatores nutricionais. A maior frequência dos pulsos de GH e as amplitudes máximas ocorrem com a desnutrição crônica ou o jejum prolongado. O GH é estimulado pela administração intravenosa de L-arginina, dopamina e apomorfina (um agonista receptor de dopamina), assim como pelas vias alfa-adrenérgicas. A administração de grelina estimula ingestão de comida e aumenta as concentrações de GH plasmático e, com menor intensidade, de hormônio adrenocorticotrófico. Esses dados sugerem que a grelina é um importante estímulo para a alocação de nutrientes para o crescimento e metabolismo e uma componente central do sistema de regulação de GH. (KRONENBERG et al, 2010)

Uma vez secretado, o GH age através do seu receptor (GH-R), sofre alterações conformacionais após sua ligação com o GH, tornando possível a transfosforilação de hemireceptores e, por consequência, das proteínas responsáveis pela sinalização intracelular. (BROWN JR et al, 2005). O GH também estimula a produção hepática e tecidual do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), um polipeptídeo de 79 aminoácidos, semelhante à insulina e o maior responsável pelos seus efeitos biológicos (LARON, 1982; UNDERWOOD, 1992; SOUZA et al., 2004; CORREA-SILVA, 2008; LENGYEL, 2008).

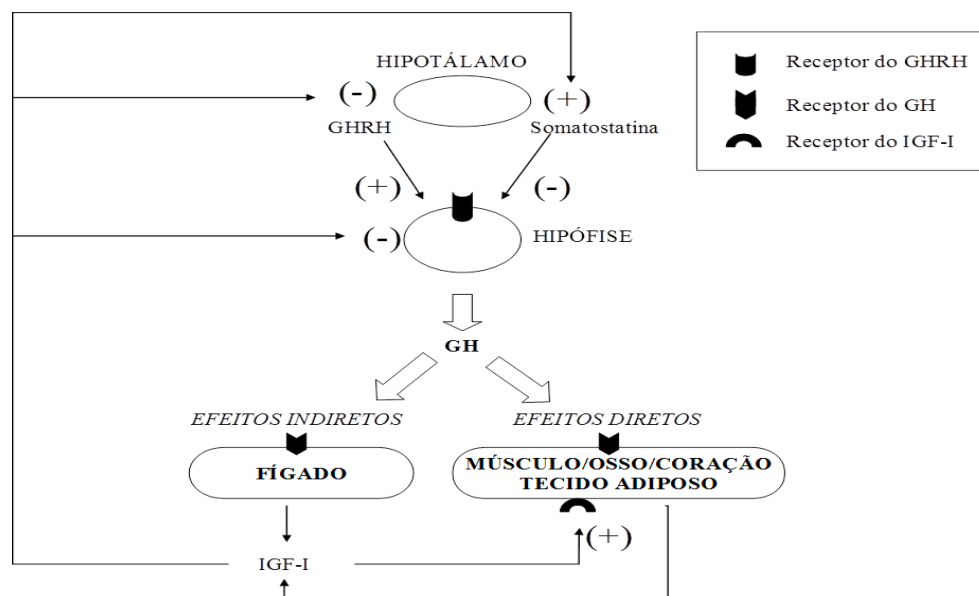


Figura 1. Esquema da regulação intrínseca do eixo GH-IGF-I. **Fonte:** AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2010.

3. FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA

Os IGFs (IGF-I e IGF-II) são fatores de crescimento peptídicos que apresentam elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina e têm atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular. O IGF-I e o IGF-II são moléculas de cadeia única com pesos moleculares de 7.649 e 7.471 dáltons, respectivamente, e compartilham resíduos idênticos em 45 posições e 62% de homologia entre si (JONE et al., 1995). Os genes codificadores dos IGFs localizam-se no braço longo do cromossomo 12 (*IGF1*) e no braço curto do cromossomo 11 (*IGF-II*), em regiões próximas a proto-oncogenes (MARTINELLI et al, 2005).

O IGF-I é encontrado na circulação como integrante de um complexo ternário de 150 Kda, formado pela proteína transportadora de IGF, tipo 3 (IGFBP-3) e pela subunidade protéica ácido-lábil (ALS). Por causa do seu peso molecular, este complexo não transpõe a barreira endotelial e funciona como reservatório circulante, aumentando a vida média dos IGFs de 10 minutos, em sua forma livre, para 15 horas (JONES; CLEMMONS, 1995). Embora o fígado seja o principal produtor de IGF-I circulante, é possível que a contribuição óssea para o IGF-I circulante seja maior que acreditamos, e que, na osteoporose idiopática, a menor massa óssea pode causar os baixos níveis de IGF-I (MCQUILLAN et al., 1986).

A síntese dos IGFs é regulada por diversos fatores. O GH assume papel principal na vida pós-natal. Mas outros fatores como o estado nutricional e o aporte protéico-calórico também são importantes, sobretudo nos primeiros anos de vida. Durante o crescimento intrauterino, os IGFs apresentam menor dependência do GH, tanto é que crianças com deficiência congênita de GH apresentam discretas ou nenhuma redução do crescimento ao nascer. Após o nascimento, no entanto, o GH assume gradualmente posição de principal regulador do crescimento (MARTINELLI JR et al, 2005; MARTINELLI JR et al, 2008). Ele é um dos principais promotores da produção de IGF-I, diferentemente do IGF-II, que apesar de ser preponderante na circulação, tem sua concentração pouco influenciada pelo GH (GOLDMAN L et al, 2005). O IGF-I é o hormônio que funciona como o principal mediador do crescimento somático exercido pelo GH, assim como é mediador de respostas anabólicas independentes de GH em várias células e tecidos. Existem dois mecanismos principais

responsáveis pela sua regulação: (1) o IGF-I produzido no fígado é secretado na corrente sanguínea sob estímulo do GH; e (2) o IGF-I é sintetizado em tecidos periféricos autócrinos/parácrinos, como, por exemplo, o tecido ósseo. No sangue periférico, ele se associa a proteínas transportadoras, as IGFBPs (*Insulin Growth Factors Binding Proteins*), que constituem uma família de seis proteínas de alta afinidade e especificidade, com maior afinidade pelo IGF-I e II do que o receptor do IGF-I (FIRTH SM, 2002).

Cada uma destas proteínas transportadoras apresenta reguladores distintos que envolvem GH, insulina, cortisol, citocinas, nutrição, os próprios IGFs, PTH, etc. O GH é o principal estimulador da síntese da IGFBP-3 e da IGFBP-5, e também estimula a secreção de uma proteína ácido-lábil (ALS), que juntamente com os IGFs e IGFBP-3, principalmente, mas também com IGFs e IGFBP-5, forma um complexo ternário que não atravessa a barreira endotelial e assim se constitui em um verdadeiro reservatório circulante de IGFs. Este complexo, dependente de GH, liga aproximadamente 85-90% dos IGFs circulantes (TWIGG, 1998; JONES, 1995).

4. AÇÕES DO GH/IGF-I

O hormônio de crescimento exerce um papel de destaque no crescimento ósseo e dos tecidos moles, particularmente no período pós-natal. Estes efeitos biológicos do GH são em grande parte mediados pela produção de IGF-I no fígado e em tecidos periféricos. O GH, sobretudo no período pós-natal, além de regular o crescimento somático (ósseo e dos tecidos moles), e também participa do controle de processos fisiológicos, como o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, manutenção da força e massa muscular e composição corporal. O GH também está envolvido na diferenciação específica de células do crescimento ósseo (estimulando o crescimento de cartilagens epifisárias e de ossos longos) e de células musculares, e exerce efeitos metabólicos específicos: aumento da velocidade da síntese protéica (balanço nitrogenado positivo), maior metabolização e utilização de ácidos graxos do tecido adiposo e aumento da utilização dos carboidratos, possuindo então efeito anabólico, lipolítico e antagonista da insulina. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram ainda sua ação antinatriurética e que, apesar da presença de receptores para IGF-I em células linfocitárias, não há imunodepressão na deficiência isolada do GH (UNDEROOD et al, 1992; ANDREASEN T et al, 1996; CUNEO R et al, 1992).

O GH tem importantes ações metabólicas em diferentes tecidos, sinérgicas ou até antagônicas às do IGF-I, liberado em parte pela ação do GH. Além disso, tanto o GH como o IGF-I participam da regulação fisiológica de vários mecanismos implicados direta ou indiretamente no risco cardiovascular tais como controle da pressão arterial, reatividade vascular, modulação da expressão da massa ventricular, distribuição da massa gorda/ massa magra, sensibilidade à insulina, perfil lipídico, expressão de receptores de LDL no fígado e lipólise dentre outros (SALVATORI, 2004; GOLA et al., 2005). Enquanto as ações sobre o crescimento são tempo limitado, as ações metabólicas e cardiovasculares do eixo GH/IGF-I perduram durante toda a vida (OLIVEIRA, 2011).

O GH tem um papel importante na homeostase da glicose, visto que ele atua de forma antagônica à insulina. O GH aumenta a gliconeogênese hepática e a glicogenólise e diminui a utilização periférica da glicose. Esses efeitos do GH antagônicos à insulina são diretos ou mediados pela lipólise, como sugerido pela observação de que a resistência à insulina pode ser evitada por uma droga anti-lipolítica (SEGERLANTZ *et al.*, 2003). Por outro lado, a sua ação lipolítica pode aumentar indiretamente a sensibilidade à insulina, ao reduzir o acúmulo de gordura abdominal.

5. DEFICIÊNCIA DO GH

A deficiência do GH (DGH) pode ser classificada nos seguintes tipos: esporádica ou familiar. No primeiro tipo, encontramos as causas congênitas (deficiência ou ausência do gene para o GH, defeitos da linha média, síndromes de Prader Willi e Laurence-Moon Biedl, síndrome da sela vazia, agenesia, hipoplasia ou ectopia da hipófise), adquiridas (tumores intracranianos, doenças hematológicas, auto-imunes e granulomatosas, infecções pré-natais e do sistema nervoso central, radioterapia craniana), variantes (síndrome de Laron, GH biologicamente inativo) e idiopáticas (associação com trauma intra-uterino ou perinatal) (SALVATORI *et al.*, 1999, SALVATORI *et al.*, 2001).

A DGH pode ocorrer de forma isolada (DIGH) ou associada a déficits de múltiplos hormônios hipofisários. A incidência de DIGH é estimada em 1: 3.480 a 1: 10.000 nascidos vivos. A DIGH genética compreende 4 formas de acordo com o grau de deficiência

de GH e modo de herança (SALVATORI, 1999; PHILLIPS *et al.*, 1981; SOUZA, 1997, BOGUSZEWSKI, 2001):

- Tipo IA: herança autossômica recessiva, com níveis séricos ausentes de GH. É a forma mais grave de DIGH e os afetados apresentam uma baixa estatura ao nascer, hipoglicemia na infância, mas uniformemente desenvolve severo nanismo até os seis meses de idade. As crianças afetadas respondem bem, inicialmente, ao tratamento com GH exógeno, mas muitas delas desenvolvem anticorpos anti-GH que irão bloquear a ação do hormônio recombinante e a boa resposta terapêutica inicial. É causada por uma mutação “*nonsense*” no gene de GH-1 localizado no cromossoma 17 (17q23), que leva à ausência total da produção hipofisária de GH. (PHILLIPS, 1981, WAJNRAJCH, 1996, COGAN, 1998, CARAKUSHANSKI, 2003).

- Tipo IB: Essa é a forma mais frequente da DIGH. É uma herança autossômica recessiva com níveis diminuídos de GH. Pacientes com esta forma de DIGH têm baixa estatura e apresentam estatura menos que 2 desvios-padrão para o sexo e idade, além de resposta positiva ao tratamento com GH exógeno, níveis plasmáticos baixos, porém detectáveis de GH, e uma boa resposta ao tratamento com GH exógeno, sem desenvolver anticorpos anti-GH. Essa diferença quanto à tolerância imunológica ao tratamento com GH, provavelmente, deve-se ao fato de os efeitos genéticos no tipo IB resultarem na produção de moléculas mutantes de GH com uma sequência de aminoácidos distintas do GH normal. Apenas 1,7% dos casos de DIGH tipo IB se devem a mutações no gene do GH-1, sendo que a maioria das causas é por mutações em outros genes, destacando-se as mutações no GHRH-R.

Tipo II: É herança autossômica dominante, com níveis séricos de GH severamente diminuídos. Respondem bem à terapia com GH exógeno e há uma variada severidade clínica entre as famílias afetadas, geralmente com boa resposta ao tratamento com GH exógeno, mas sem desenvolver anticorpos anti-GH. Os indivíduos afetados são heterozigotos e as mutações são dominantes negativas, isto é, o alelo mutante prevalece sobre o alelo não afetado e consegue interferir na síntese e/ou liberação da molécula normal de GH, apresentando níveis séricos de GH reduzidos, porém detectáveis. Todas as mutações são descritas no gene GH1 e localizam-se no íntron 3 e afetam a transcrição do éxon 3, responsável pela sequência de aminoácidos 32-17 da molécula do GH. •

- Tipo III: forma mais rara de DIGH, herança ligada ao cromossomo X, com manifestações clínicas distintas nas diferentes famílias. Alguns indivíduos afetados apresentam agamaglobulinemia associada, o que sugere que pode haver defeitos em genes contíguos ou mutações em múltiplos loci. Não há alteração do gene GH-1.

A primeira mutação no gene do GHRH-R ocasionando a DIGH tipo IB foi descrita em três famílias do sub-continente indiano, sendo uma delas conhecida como os “anões de Sindh”. Na população de Sindh encontrou-se a mutação GAG → TAG no códon 72, correspondente ao aminoácido residual 50 na proteína madura do GHRH-R. O “nanismo de Sindh” representa o modelo humano homólogo ao “little mouse” descrito em 1976, em que a mutação no GHRH-R abole o sítio de ligação para o GHRH, causando resistência ao mesmo, hipoplasia pituitária e DIGH (BAUMANN, 1997; MAHESHWARI, 1998).

A segunda mutação foi descrita por nosso grupo em indivíduos da região de Carretéis, povoado de Itabaianinha, município de Sergipe. Os indivíduos homozigóticos afetados apresentam uma mutação tipo “splice” no início do íntron 1 do gene do receptor do GHRH, onde a G foi substituída pela A (c.57+1G>A), abolindo completamente sua expressão e a ligação do GHRH na superfície da célula somatotrófica, a ativação da adenilciclase, a proliferação celular e a secreção do GH. Como o GHRH é importante para o desenvolvimento dos somatotrofos hipofisários, os indivíduos homozigóticos para essa mutação apresentam uma hipoplasia pituitária anterior pela acentuada redução dos mesmos. Os indivíduos homozigotos normais são wt/wt, os heterozigotos são wt/mut e os afetados são mut/mut. (SALVATORI et al., 1999, HAYASHIDA et al., 2000, SALVATORI et al., 2001, SALVATORI et al., 2002, SOUZA et al., 2004, AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2004).

A deficiência do GH de Itabaianinha provoca importantes modificações metabólicas e na composição corporal. As crianças apresentam uma redução da massa magra, que persiste na puberdade e na fase adulta. O percentual da massa gorda é a imagem em espelho da redução da massa magra, sendo maior em todas as idades. Os níveis de Leptina são mais elevados nos pacientes que nos controles, seja em concentração ou quando estes foram divididos pela quantidade de massa gorda, indicando uma relação inversa entre a secreção de GH e Leptina nestes indivíduos (BARRETTO, 1999). Os níveis de colesterol total e LDL são mais elevados que nos controles em crianças e adultos (BARRETTO-FILHO, 2002; GLEESON, 2002; BARRETTO-FILHO, 2002). Já em crianças, há comprovação de obesidade central que se acentua nos adultos (BARRETTO, 1999;). Nestes, a pressão sistólica é mais

elevada que nos controles, porém sem sinais de remodelamento cardíaco à ecocardiografia (BARRETTO-FILHO, 2002). Estes dados sugerem a existência de fatores de risco cardiovascular nestes indivíduos, porém a ocorrência maior de doença vascular ateromatosa nesta população não foi ainda demonstrada até o momento. A inter-relação DIGH e doença vascular coronariana ou cerebral estão sendo alvo de protocolos em curso. Estes dados demonstram que o GH, além do efeito sobre o crescimento linear, tem importantes ações metabólicas que sugerem conservar, ao menos, seu primeiro nome, hormônio somatotrófico. A longevidade dos indivíduos com DIGH e suas causas de morte não parecem ser distintas do restante dessa população rural, com acesso exato a alimentos naturais ou com pouca manipulação. A maior atividade física e o menor consumo de alimentos industrializados podem ter exercido um efeito benéfico sobre aqueles aspectos na população estudada, que se encontra hoje em processo de urbanização haja vista que a maior parte dos indivíduos com DIGH vive hoje na sede municipal de Itabaianinha. Implicações importantes com a Síndrome Metabólica podem advir do modelo de DIGH por mutação no GHRH-R de Itabaianinha.

6. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

O termo DHGNA é usado para descrever uma condição de acúmulo de gordura no fígado, na ausência de consumo excessivo de álcool (menos de 20 g por dia) e quaisquer outras causas específicas de esteatose hepática. (LUDWIG et als.,1980; BACON et als.,1994)

A DHGNA é uma condição clínico-patológica que abrange a esteatose, a esteato-hepatite e formas mais graves da doença hepática como cirrose e carcinoma hepatocelular (ANGULO, 2002; MATTEONI et als.,1999). A esteatose hepática ou “fígado gorduroso” consiste apenas no acúmulo de gordura no fígado; e a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é quando a presença de esteatose está associada a uma inflamação no fígado (hepatite). A esteatose pode evoluir para uma esteato-hepatite através do desenvolvimento de resistência insulínica, por conjugação e acúmulo de gordura no tecido visceral, e aumento do estresse oxidativo, com consequente desenvolvimento de um quadro inflamatório (hepatite). (BELLENTANI et als.,2005).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA são obesidade, diabetes mellitus e dislipidemia. A resistência à insulina parece desempenhar um papel

fundamental na patogênese destas condições, e por isso tem sido sugerido que a DHGNA (esteatose e esteato-hepatite) seja considerada como mais um critério no diagnóstico da síndrome metabólica (MARCHESINI, 2001).

A maioria dos pacientes com DHGNA são assintomáticos (LEE, 1989; MATTEONI et al, 1999; CONTOS & SANYAL, 2002; ZAFRANI, 2004). Eles geralmente procuram o atendimento médico por outros motivos e acabam descobrindo enzimas hepáticas um pouco elevadas e/ou hepatomegalia (CONTOS & SANYAL, 2002). Fadiga e mal-estar podem ser atribuídos à doença hepática (BACON et al, 1994). Esse quadro clínico é muito semelhante às doenças do fígado relacionada ao álcool e não existe nenhum exame que consiga distinguir essas duas patologias, por isso é necessário garantir que não há antecedente de uso crônico de álcool. Dessa forma, em algumas situações, o diagnóstico diferencial entre EHNA e doença hepática alcoólica pode ser difícil, pois muitos pacientes não revelam de forma adequada o consumo de álcool (POWELL et als., 1990).

Muitas vezes alterações laboratoriais são os únicos sinais do aparecimento da DHGNA. A alteração laboratorial mais comum é o aumento de duas a quatro vezes das aminotransferases hepáticas: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (BACON et al, 1994; TELI et al, 1995), mas vale ressaltar que níveis normais das enzimas não excluem o diagnóstico. No estudo de SORRENTINO (2004), de um total de 80 pacientes com Síndrome metabólica e enzimas hepáticas normais, 72,5% apresentavam quadro histológico compatível com EHNA. A relação AST/ALT é geralmente menor que 1 na DHGNA, o que ajuda a distingui-la da doença hepática alcoólica. Quando essa relação é maior que 1, sugere estágio avançado da doença (DIEHL et al, 1998; MATTEONI et al, 1999; Angulo et al, 1999). Os níveis da fosfatase alcalina (FA) e glutamiltransferase (GGT) também podem estar elevados. Bilirrubina e albumina são geralmente normais, a não ser que a doença tenha avançado para cirrose (CONTOS & SANYAL, 2002; ADAMS & TALWALKAR, 2006).

Nos pacientes que apresentam elevação das enzimas hepáticas, o diagnóstico da esteatose pode ser confirmado pela ultrassonografia abdominal ou pela hepatomegalia. Considerando a possibilidade de imprecisão no diagnóstico, os métodos por imagem são os mais utilizados no diagnóstico da patologia. Os diagnósticos por ultrassonografia, ressonância

magnética e tomografia computadorizada são amplamente recomendados, pois auxiliam no diagnóstico da DHGNA, através da identificação de infiltrado gorduroso no fígado. A ultrassonografia do fígado é o método de imagem mais utilizado no diagnóstico da DHGNA por apresentar uma sensibilidade de 82 a 89% , uma especificidade de 93% para identificar o infiltrado e o menor custo relativo (JOSEPH et als.,1991; HULTCRANTZ et als.,1993, SAADEH et als. 2002).

No entanto, os exames por imagem não estabelecem o grau de severidade hepático e da fibrose hepática existente, sendo indicado em casos em que são necessárias essas informações, a biópsia hepática (JOY et als.,2003). A biópsia hepática é, portanto, considerada o exame padrão-ouro, devendo o diagnóstico de a doença ser efetivado através da correlação anátomo-clínica (YOUNOSSI et al, 2002, ADAMS & TALWALKAR, 2006). Os principais fatores limitantes à biópsia hepática é que é um exame invasivo e o fato da doença não se distribuir necessariamente de forma homogênea no fígado, sendo possível colher material que não seja representativo do fígado como um todo.

7. RELAÇÃO ENTRE DGH E DHGNA

Impressionantes semelhanças existem entre a síndrome metabólica e a deficiência de GH não tratada (GHD) em adultos, e os baixos níveis de GH podem ser de importância para explicar as aberrações metabólicas observadas em ambas as condições (JOHANNSSON, 1999; THOMAS, 2009).Observamos também a presença de aterosclerose, obesidade visceral, hipertensão arterial, dislipidemia e resistência à insulina. A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é uma característica comum na síndrome metabólica e na disfunção hipotalâmica e hipofisária (ICHIKAWA, 2003; ADAMS 2004) .Vários relatórios sugerem que o comprometimento hepático, pode ser particularmente relacionado com DGH. Acredita-se que tanto o GH como o IGF-I é importante na regulação do metabolismo lipídico hepático.

GH e IGF-I são importantes para o crescimento e desenvolvimento, mas são também de importância metabólica em curso na vida adulta. O GH é secretado pela hipófise anterior sob o controle do hormônio liberador de GH do hipotálamo e estimula a produção hepática de IGF-I. (TAKAHASHI, 2012). O IGF-I é um hormônio catabólico, que participa da síntese de

proteínas e estimula a secreção de IGFBP-3 a partir de células de Kupffer (SCHARF, 1996). A atividade biológica do IGF-1 é fortemente influenciada por várias proteínas de ligação específicos (IGFBP - 1 a 6), e o IGFBP-3 carrega mais de 80% do IGF-1 circulante (JUUL, 2002). A presença de IGFBP-3 reduz a bioatividade de IGF-1 (CONTI, 2004), e a relação entre os níveis de IGF-1 e IGFBP-3 diminui com o aumento da idade em adultos, resultando em diminuição dos níveis IGF-I livre e biologicamente ativo (COLAO, 2005). Modelos animais com deficiência de GH desenvolvem esteatose hepática e fibrose que é amenizada pela administração do GH ou IGF1. No entanto, os mecanismos exatos pelos quais a deficiência de GH e IGF1 contribui para fibrose e esteatose hepática não são totalmente compreendidos. (NISHIZAWA, 2012).

Ademais, o IGF-I também mostrou ter um efeito protetor para cardiopatias isquêmicas, doenças cardiovasculares e aterosclerose (JUUL, 2002; LAUGHLIN, 2004; JANSSEN, 1998) e os altos níveis de IGFBP-3 associado a uma baixa relação de IGF-1/IGFBP-3 estão correlacionados com aterosclerose (COLAO, 2005). Vale destacar que doença cardiovascular é um problema grave em pacientes com DHGNA e a cardiopatia isquêmica é uma das principais causas de morte entre estes pacientes (ADAMS 2005). No entanto, apesar dos níveis de GH estarem correlacionados com a síndrome metabólica, e os de IGF-1 e IGFBP-3 com doenças cardiovasculares, as relações entre GH, IGF-I, IGFBP-3 e a gravidade da DHGNA não foram examinadas.

A DHGNA ocorreu com mais frequentemente em pacientes com DGH do que em pacientes sem DGH, (ICHIKAWA et al. 2003), sugerindo que a DGH de início na vida adulta é um possível fator de risco para DHGNA. Diminuições dos níveis de GH também foram associadas com a gravidade da esteatose hepática em outros estudos (ICHIKAWA, 2007; HONG, 2011). No entanto, o papel do GH em DHGNA permanece incerto, apesar do crescente conhecimento da atividade desse hormônio na indução da lipólise e oxidação de lipídios (MAURAS, 2005). No presente trabalho, será estudado o papel do GH na DHGNA em um modelo genético de DIGH, os “anões de Itabaianha”.

II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS LA, Feldstein A, Lindor KD, Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction. *Hepatology* 2004;39:909–14.

ADAMS LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113–21.

ADAMS, LA; Talwalkar, JA. Diagnostic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: S34-S38.

AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. *et al.*, Effect of growth hormone (GH) deficiency due to a mutation in the GH-releasing hormone receptor on insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins, and ternary complex formation throughout life. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, p. 4118-126, 2004.

ANDREASEN T, HELMGAARD L, GAUDREAU P, et al. Growth hormone-releasing substances. In: RANKE, M. B.; CHRISTIANSEN J. S. The complexity of endocrine systems: Interactions of Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor and Growth Hormone-Releasing Peptides. Alemanha: J & J Verlag, p.22-30, 1996.

ANGULO P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;34:1221-1231.

BACON BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.

BARRETTO ESA, Gill MS, Freitas MES, Magalhães MG, Souza AHO, Aguiar-Oliveira MH, et al. Serum leptin and body composition in children with familial GH deficiency (GHD) due to a mutation in the growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. *Clin Endocrinol* 1999;51:559-64.

BARRETTO-FILHO JA, Alcântara MR, Salvatori R. Familial isolated growth hormone deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2018.

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

BELLENTANI, Stefano; MARINO, Mariano. Epidemiology and natural history of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol*, v. 8, n. Suppl 1, p. S4-S8, 2009.

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

CARAKUSHANSKI M, Whatmore aj, Clayton pe et al. A new missense mutation in the growth hormone releasing hormone receptor gene in familial isolated GH deficiency. *Eur J Endocrinol*, v.148, p. 25-29, 2003.

COGAN, J.D.; PHILLIPS III, J.A. Growth disorders caused by genetics defects in the growth hormone pathway GH deficiency. In: Barnes LA, Morron III G, Rudolph AM et al eds. *Advances in pediatrics*, St. Louis: Mosby; v.45, p.337-361, 1998.

COLAO A, Spiezia S, Di Somma C, Pivonello R, Marzullo P, Rota F, Musella T, Auriemma RS, De Martino MC, Lombardi G. Circulating insulin-like growth factor-I levels are correlated with the atherosclerotic profile in healthy subjects independently of age. *J Endocrinol Invest* 2005;28:440–8.

CONTI E, Carrozza C, Capoluongo E, Volpe M, Crea F, Zuppi C, Andreotti F. Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation* 2004;110:2260–5.

CONTOS, MJ, Sanyal, AJ. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol* 2002; 9: 37- 51.

CORREA-SILVA, S.R.; CUNHA DE SÁ, L.B.P.; LENGUEL, A.J. Ghrelina e Secretagogos do Hormônio de Crescimento (GHS): Modulação da Secreção do Hormônio de Crescimento e Perspectivas Terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 52, n.5, p. 726-733, 2008.

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

DIEHL, AM; Goodman, Z, Ishak, KG. A clinical and histologic comparison with alcohol induced liver injury. *Gastroenterol* 1988; 95: 1056-62.

FIRTH SM, BAXTER RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*, v.23, p.824, 2002.

GLEESON HK, Souza AOH, Gill MS, Wieringa GE, Barretto ESA, Barretto-Fillho JAS, et al. Lipid profiles in untreated severe congenital isolated growth hormone deficiency through the lifespan. *Clin Endocrinol* 2002;57:89.

GOLA, M. et al. Clinical review. Growth hormone and cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab*, v.90, p.1864-1870, 2005.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Hormônio do Crescimento. *CECIL - Tratado de Medicina Interna*. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p 1594-1596, 2005.

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

HONG JW, Kim JY, Kim YE, Lee EJ (2011) Metabolic parameters and Nonalcoholic fatty liver disease in hypopituitary men. *Horm Metab Res* 43: 48–54.

HULTCRANTZ R, Gabrielsson N. Patients with persistent elevation of aminotransferases: investigation with ultrasonography, radionuclide imaging and liver biopsy. *J Intern Med* 1993;233:7-12.

ICHIKAWA T, Hamasaki K, Ishikawa H, Ejima E, Eguchi K, Nakao K. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatic steatosis in patients with adult onset growth hormone deficiency. *Gut* 2003;52:914.

ICHIKAWA T, Nakao K, Hamasaki K, Furukawa R, Tsuruta S, et al. (2007) Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int* 1: 287–294.

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

JANSSEN JA, Stolk RP, Pols HA, Grobbee DE, Lamberts SW. Serum total IGF-I, free IGF-I, and IGFB-1 levels in an elderly population: relation to cardiovascular risk factors and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:277–82.

JOHANNSSON G, Bengtsson BA. Growth hormone and the metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest* 1999;22:41–6.

JONES JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 1995;16:3-34.

JOSEPH AE, Saverymuttu SH, al-Sam S, Cook MG, Maxwell JD. Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clin Radiol* 1991;43:26-31.

JOY, D; Thava, VR; Scott, BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary ? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003; 15: 539- 543.

JUUL A, Scheike T, Davidsen M, Gyllenborg J, Jorgensen T. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case control study. *Circulation* 2002;106:939–44.

LARON, Z. Somatomedin, insulin, growth hormone and growth: a review. *Isr J Med Sci*, v.18, n. 8, p. 823-829, 1982.

LAUGHLIN GA, Barrett-Connor E, Criqui MH, Kritz-Silverstein D. The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:114–20.

LEE, RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989; 20: 594-8.

LUDWIG J, Viggiano T, McGill D, Ott B. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438.

- MAHESHWARI, H. G. et al. Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: Dwarfism of Sindh. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 83, n. 11, p. 4065-4074, 1998.
- MARCHESINI G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease - A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850.
- MARTINELLI JR, C.E.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Crescimento normal: avaliação e regulação endócrina. In: Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, Castro M, editores *Neuroendocrinologia básica e aplicada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 366- 89, 2005.
- MARTINELLI JR, C.E; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do eixo GH-sistema IGF. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 52, n. 5, p. 717-725, 2008.
- MATTEONI CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Spectrum of Clinical and Pathological Severity. *Gastroenterol* 1999;116:1413-1419.
- MAURAS N, Haymond MW. Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable? *Growth Horm IGF Res* 2005;15:19–27.
- MCQUILLAN, D.J. et al. Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-1 in cultured bovine articular cartilage. *Biochem J*, v. 240, p. 423-30, 1986.
- NISHIZAWA H, Takahashi M, Fukuoka H, Iguchi G, Kitazawa R & Takahashi Y. GH-independent IGF-I action is essential to prevent the development of nonalcoholic steatohepatitis in a GH-deficient rat model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012 423 295–300. (doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.115).
- OLIVEIRA CR, MENEGUZ-MORENO RA, AGUIAR-OLIVEIRA MH, BARRETO-FILHO JA. Emerging role of the GH/IGF-I on cardiometabolic control. *Arq Bras Cardiol*, v. 97 (5), p. 434-439, 2011.
- PHILLIPS, J. A. *et al.* Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci, E.U.A.*, v. 78, n. 10, p. 6372-6375, 1981.
- POWELL EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
- ROSENFELD, R.G.; COHEN, P. Disorders of Growth Hormone/Insulin-like Growth Factor Secretion and Action. In: SPERLIN, M.A.(ed). *Pediatric Endocrinology*. 2.ed. Philadelphia Saunders,. p:211-288, 2002.
- ROSICKA M, Krsek M, Jarkovska Z, Marek J, Schreiber V. Ghrelin – a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiol Res*. 2002;51:435-41.

SAADEH, S; Younossi ZM; Remer EM; Gramlich T; Ong, JP; Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol.* 2002; 123: 745- 750.

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

SALVATORI, R. et al. Serum GH response to pharmacological stimuli and physical exercise in two new inactivating mutations in the GH-releasing hormone. *Eur J Endocrinol*, v.147(5), p.591-596, 2002.

SALVATORI, R. et al. Three new mutations in the gene for the growth hormone (GH)-releasing hormone receptor in familial isolated GH deficiency type IB. *J Clin Endocrinol Metab*, E.U.A., v. 86, n. 1, p. 273-279, 2001.

SALVATORI, R. Growth hormone and IGF-1. *Rev Endocr Metab Disord*, v.5, p.15-23, 2004.

SANYAL AJ; American Gastroenterological Association. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:1705-25.

SCHARF J, Ramadori G, Braulke T, Hartmann H. Synthesis of insulin like growth factor binding proteins and of the acid-labile subunit in primary cultures of rat hepatocytes, of Kupffer cells, and in co-cultures: regulation by insulin, insulin like growth factor, and growth hormone. *Hepatology* 1996;23:818–27.

SEGERLANTZ, M. et al. Inhibition of lipolysis during acute GH exposure increases sensitivity in previously untreated GH-deficient adults. *Eur J Endocrinol*, v.149, p.511-519, 2003.

SORRENTINO, P; Tarantino, G; Conca, P et al. Silent non-alcoholic fatty liver disease – a clinical histological study. *J Hepatol* 2004; 41: 751-7.

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

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

TAKAHASHI Y. Essential roles of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the liver (Review). *Endocrine Journal* 2012 59 955-962. (doi:10.1507/endocrj.EJ12-0322)

TELI, MR; James, OFW; Burt, AD et al. The natural history on nonalcoholic fatty liver disease: a follow-up study. *Hepatol* 1995; 22: 1714-9.

THOMAS JD & Monson JP. Adult GH deficiency throughout lifetime. *European Journal of Endocrinology* 2009 161 (Suppl 1) S97–S106. (doi:10.1530/EJE-09-0258).

TWIGG SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)- binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 1998;273:6074-9.

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

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

YOUNOSSI ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease; an agenda for clinical research. *Hepatology* 2002;35:746-52.

ZAFRANI, ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004; 444: 3-12.

III. ARTIGO CIENTÍFICO

Liver status in congenital, untreated, isolated GH deficiency

* Renata M. Souza¹,*Rachel D. C. A. Diniz¹, Roberto Salvatori², Alex Franca³, Elenilde Gomes-Santos¹, Thiago O. Ferrão⁴, Carla R. P. Oliveira¹, João A. M. Santana¹, Francisco A. Pereira¹, Rita A. A. Barbosa¹, Anita H. O. Souza¹, Rossana M. C. Pereira¹, Alécia A. Oliveira-Santos¹, Allysson M. P. Silva¹, Francisco J. Santana-Júnior¹, Eugênia H. O. Valença¹, Viviane C. Campos¹ and Manuel H. Aguiar-Oliveira¹.

¹Federal University of Sergipe, Brazil, Division of Endocrinology Diabetes and Metabolism;²The Johns Hopkins University School of Medicine, Division of Endocrinology, Baltimore, Maryland 21287,USA; ³Division of Hepatology and ⁴Division of Radiology , Aracaju, SE, Brazil 49060–100 and.

*Both authors contribute equally to this work.

Corresponding author:

Roberto Salvatori, MD,
Division of Endocrinology,
Johns Hopkins University School of Medicine,
1830 East Monument street suite #333,
Baltimore, MD 21287
Tel. (410) 955-3921
Fax (410) 955-8172
E-mail: salvator@jhmi.edu

Running head: GH deficiency and liver

Key words: GH, IGF-I, NAFLD, Isolated GH deficiency

Word count: 1750

Disclosure statement: The authors have nothing to disclose.

ABSTRACT

Context: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is known to be associated with insulin resistance, atherosclerosis, and low serum IGF-I levels. We have described a large cohort of patients with isolated GH deficiency (IGHD) due to the c.57+1G→A mutation in the GHRH receptor gene. These subjects have increased insulin sensitivity (IS), delayed atherosclerosis, and normal longevity. We hypothesized that despite visceral obesity NAFLD would be absent or mild due to the increased IS.

Objective: To assess the prevalence and severity of NAFLD in subjects with lifetime, congenital, untreated IGHD.

Methods: We studied 22 IGHD adults and 25 controls (CO) matched for age and gender. NAFLD was assessed by a comprehensive liver function panel, and ultrasonographic pattern (HP) coded as 0=absent; 1=mild; 2=moderate; and 3=severe.

Results: Compared to CO, IGHD individual had lower serum IGF- I ($p < 0.0001$), higher total cholesterol ($p=0.027$), lower prothrombin time ($p= 0.017$), similar activated partial thromboplastin time and fibrinogen values. ALT values were similar in the two groups, but AST was higher in IGHD ($p=0.013$). However, more IGHD subjects (7/22) than CO (3/23) had ALT above the upper limit of normal ($p=0.044$). The HP score was higher in IGHD than CO ($p=0.041$), but severe NAFLD was not observed in any IGHD (or CO) individual.

Conclusions: liver HP score is increased in lifetime untreated IGHD, but the increase in transaminases is mild, suggesting lack of advanced forms of NAFLD.

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a manifestation of the metabolic syndrome, and is associated to very common conditions such as obesity, type 2 diabetes, hypertension, dyslipidemia and atherosclerosis (1). NAFLD includes the mere accumulation of lipid within hepatocytes, (hepatic steatosis, HS), or the inflammation of the liver, (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), liver fibrosis, or cirrhosis (2). The evolution of HS to NASH occurs through the development of insulin resistance, by accumulation of fat in visceral tissue, and increased oxidative stress, with the consequent development of hepatitis (3). High leptin and low adiponectin levels have also been associated to this evolution (4). The consequences of NAFLD on mortality are issue of debate (5), as this can be influenced by variable definitions and associated conditions. Cardiovascular mortality is increased in NASH cirrhosis compared to other types of cirrhosis, and the incidence of associated hepatocellular carcinoma is higher than 10% in 5 years (6). It is therefore important to define the causes of NAFLD.

Adult onset GH deficiency (AOGHD) constitutes a specific model of metabolic syndrome (7, 8), with visceral obesity, insulin resistance, accelerated atherosclerosis, and increased cardiovascular mortality (9). AOGHD has been associated to NAFLD (10-12). Some of the effects of GH are mediated by circulating IGF-I, which is mostly of liver origin. IGF-I circulates bound to six IGF-I binding proteins, mainly IGFBP3. Low serum levels of GH or IGF-I and IGF-I/IGFBP-3 ratio (reflecting the IGF-I bioavailability) have been hypothesized to contribute to NAFLD in AOGHD (13, 14). However, congenital (vs. acquired) isolated GH deficiency (IGHD) may have different consequences in terms of NAFLD.

In Itabaianinha County, in the Brazil Northeast, we have identified a large cohort of patients (more than 100 over 7 generations) with congenital IGHD due to a homozygous mutation (c.57+1G→A) in the GHRH receptor gene (*GHRHR*) (15). These subjects have very low circulating serum IGF-I levels, and could therefore be predisposed to developing NAFLD (16). Despite abdominal obesity and unfavorable cardiovascular risk profile (high total and LDL-cholesterol and high C-reactive protein) (17, 18), they have increased insulin sensitivity (19), high adiponectin and normal leptin serum levels (20), no evidence of premature atherosclerosis (21), and normal longevity (22). Because NAFLD is related to insulin resistance, we hypothesized that-despite low IGF-I, NAFLD would be absent or mild in this model. The aim of this work was to assess the liver status of these subjects.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

This was a cross-sectional study performed in Itabaianinha County in the Northeastern Brazilian state of Sergipe. We recruited volunteers (age 20-59 yrs) by advertising placed in the local Dwarfs Association building, and by word of mouth. Inclusion criteria for IGHD were short stature and genotype-proven homozygosity for the c.57+1G→A *GHRHR* mutation, whereas COs were normal-statured individuals proven to be homozygous for the wild-type *GHRHR* allele. For both groups, exclusion criteria were a history of current or past excessive alcohol intake (defined by an average daily consumption of more than 20 g of alcohol); % fat mass below 20% and above 50%; diabetes mellitus, use of glucocorticoids, GH, and thyroid hormones; positive hepatitis B and C serology, and inherited, autoimmune, cholestatic, or drug-induced liver disease. Individuals had been previously matched for age, gender and percentage of fat mass (assessed by DXA) (23). Twenty-two IGHD and twenty-five CO volunteers were enrolled.

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

Study protocol

Anthropometric measurement

The subjects' height and weight were measured using a wall-mounted stadiometer (Digital Wall Mounted Stadiometer, Model HM210D, Charder Medical Weighing and Measuring Products, Taichung City Taiwan, R.O.C), and scale (Charder MS2510 Platform Scale). Waist circumference was measured at half the distance between the last rib and the superior margin of iliac crest, and hip circumference was measured at the level of femoral

trochanters. Height, weight, and body mass index (BMI) were converted to standard deviation scores (SDS) using the site <http://www.phsim.man.ac.uk/SDSCalculator/SDSCalculator.aspx>.

Sonography

Sonographic measurements were all performed by a single radiologist (T.O.F.), using Medison Sono Ace 8000SE (Samsung, Seoul, South Korea), with a 3.5 MHz convex-array probe. The probe was touched as adjusted in such a way that the liquid contents of the gall bladder and the blood in the inferior vena cava were non-echogenic. Gain curve was adjusted to the neutral position. The patient was placed supine and the probe was placed on the right hypochondrium in the longitudinal, transverse and oblique planes. To diagnose HS, we used a hyper echogenic pattern (HP) coded as follows: 0=absent; 1=mild (hepatic parenchyma with subtle increase in echogenicity and sound beam attenuation, with subtle decrease in the visualization of the diaphragm and intrahepatic vascularization); 2=moderate (hepatic parenchyma with moderate increase in echogenicity and sound beam attenuation, with moderate decrease in the visualization of the diaphragm and intrahepatic vascularization); and 3=severe (hepatic parenchyma with a great in echogenicity and sound beam attenuation, with a marked or complete loss of the visualization of the diaphragm and of the intrahepatic vascularization) (24)

Laboratory analyses

Fasting blood samples were collected between 7 and 9 a.m. Alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), total cholesterol and fractions, triglycerides, fibrinogen, prothrombin time (PT), international normalized ratio (INR), prothrombin activity (PA) and activated partial thromboplastin time (APTT) were determined by standard laboratory techniques. AST and ALT were divided by the respective upper limit (AST/upper limit and ALT/upper limit, respectively). Anti- HBC

IgM, HBsAg and anti- HCV were measured by eletrochemiluminescence, ELECSYS 2010 (Roche Diagnostics Basel, Switzerland). IGF-I was measured by a solid-phase, enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay IMMULITE 2000® (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd., Malvern PA, USA), with sensitivity of 25 ng/ml. Intraassay and interassay variabilities were 3.1 and 6.1%, respectively.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SD. Continuous variables were compared by independent samples *t* test and categorical and not normal variables (triglycerides) by Mann Whitney test. Software SPSS/PC 15.0 (SPSS, Inc.) was used. P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Demographic and anthropometric data are shown in table 1. IGHD and CO have similar age, gender, and BMI. As expected, IGHD subjects had lower height and weight, but had higher waist/hip ratio than CO. Laboratorial and sonographic data are shown in table 2. IGF-I levels were extremely low in IGHD individuals, and 16 of 22 IGHD individuals had values below the limit of sensitivity of 25 ng/ml. These values were assumed to be 25 for the purpose of the statistical analyses. IGHD subjects had higher total and LDL cholesterol, lower prothrombin time and similar HDL cholesterol, triglycerides, gama-GT, APTT and fibrinogen values compared to CO.

Average ALT values were similar in the 2 groups, while AST was higher in IGHD subjects. However, more IGHD subjects (7/22) than CO (3/23) had ALT/upper limit of normal ratio above than 1 ($p=0.044$): four IGHD (1.04, 1.13, 1.29 and 1.87), three CO (1.20, 1.33 and 1.42) less than twice, and three IGHD more than twice (2.09, 2.20 and 2.67). Four IGHD (1.00, 1.13, 1.82 and 1.85) and one CO individual (1.31) had AST/upper limit ratio above 1. No individual in either group had AST/upper limit ratio higher than 2. While the average HP score was higher in IGHD than CO ($p=0.041$), severe NAFLD was not observed in any IGHD (or CO) individual.

DISCUSSION

NAFLD is a very important public health care problem, linked to several common conditions like visceral obesity, diabetes, atherosclerosis, and increased cardiovascular mortality. NAFLD can evolve to NASH, liver fibrosis and cirrhosis and, eventually, to liver failure, becoming an important cause of liver transplantation (4). Hypopituitarism (often with GH deficiency) has been associated to NAFLD (3, 25), but it is not clear if NAFLD is a consequence of GHD (and IGF-I deficiency), or if they are both unrelated consequences of hypopituitarism.

GH deficiency has been suggested to be critical for the development hepatic steatosis, and low IGF-I and low IGF-I/IGBP3 ratios for hepatic fibrosis (13). Among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction, NAFLD was diagnosed with a median of 3 years after the diagnosis of pituitary dysfunction, with high prevalence of cirrhosis and liver related death (4). Although GH treatment has a positive regenerative effect on the liver after hepatic resection (26), its efficacy in reducing NAFLD in hypopituitarism is controversial, with positive (27, 28) and negative (29) reports. Furthermore IGF-I treatment does not improve NAFLD in individuals with Laron dwarfism, a known model of GH resistance (30).

The IGHD individuals from the Itabaianinha cohort have very low serum GH and IGF-I levels, but have a high total IGF-I+IGF-II/IGFBP3 ratio (due to a compensatory increase of IGF-II/IGFBP3 ratio). We therefore hypothesized that this high IGF-I+IGF-II/IGFBP3 ratio would slow down the evolution from HS to fibrosis or cirrhosis. As a whole, IGHD subjects have higher serum AST, and the number of individuals with ALT above the normal values was higher in IGHD than CO. The lower prothrombin time may indicate higher synthesis of prothrombin by the liver, without obvious clinical relevance. Therefore, we conclude that, while IGHD subjects have more NAFLD than controls, there is no evolution to

severe stages of NAFLD. Although we did not perform liver biopsies, the gold standard method to diagnose NAFLD, a comprehensive biochemical and clotting liver evaluation support our conclusion of a mild NAFLD pattern in these IGHD subjects.

Given the relatively young age of the subjects studied in this work, one possibility is that such progression may occur later in life. However, having worked with this cohort (including providing primary medical care) for more than 20 years, we saw no case of clinical liver disease except one portal fibrosis due to *Schistosoma mansoni* infection. Furthermore, no liver disease was reported in death certificates of 22 IGHD deceased individuals (22).

The causes of this lack of progression may be multiple. In addition to the high IGF-I+IGF-II/IGFBP3 ratio, other protective factors may have a role. One of them is the high serum adiponectin level (19), as low adiponectin levels are classically associated to insulin resistance. A second protective factor is the normal leptin (19). Lack of leptin signaling in leptin deficient and resistant mice is associated to NAFLD (31). The normal leptin serum values of these IGHD individuals suggest normal leptin signaling.

In conclusion, liver HP score is increased in adults with congenital, lifetime, untreated IGHD, but with modest increase in transaminases, suggesting lack of advanced forms of NAFLD. This finding contrasts with the association of severe forms of NAFLD in acquired hypopituitarism, and weakens the hypothesis of a causal relationship of GH/ IGF-I deficiency in the pathogenesis of NAFLD.

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

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the “Associação do Crescimento Físico e Humano de Itabaianinha” for their assistance.

REFERENCES

- 1- Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, Zoli M, Marchesini G. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005 **42** 473–480.
- 2- Levene AP & Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* 2012 **61** 141–152.(doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04145.x)
- 3- Adams LA & Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic Medicine* 2005 **22** 1129–1133. (doi:10.1111j.1464-5491.2005.01748.x)
- 4- Adams LA, Feldstein A, Lindor KD & Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction. *Hepatology* 2004 **39** 909–914. (doi:10.1002/hep.20140)
- 5- Ong JP, Pitts A & Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 2008 **49** 608–612. (doi:10.1016/j.jhep.2008.06.018)
- 6- Yatsuji S, Hashimoto E, Tobari M, Taniai M, Tokushige K & Shiratori K. Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009 **24** 248–254. (doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05640.x)
- 7- Attanasio AF, Mo D, Erfurth EM, Tan M, Ho KY, et al. (2010) Prevalence of metabolic syndrome in adult hypopituitary growth hormone(GH)-deficient patients before and after GH replacement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 74–81.
- 8- Di SC, Pivonello R, Pizza G, De Rosa A, Lombardi G, et al. (2010) Prevalence of the metabolic syndrome in moderately-severely obese subjects with and without growth hormone deficiency. *Journal Endocrinology Investigation* **33** 171–177.

- 9- Rose´n T & Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 1990 **336** 285–288. (doi:10.1016/0140-6736(90)91812-O)
- 10- Ichikawa T, Hamasaki K, Ishikawa H, Ejima E, Eguchi K, Nakao K. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatic steatosis in patients with adult onset growth hormone deficiency. *Gut* 2003 **52**:914.
- 11- Tarantino G, Savastano S & Colao A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World Journal of Gastroenterology* 2010 **16** 4773–4783. (doi:10.3748/wjg.v16.i38.4773)
- 12- Xu L, Xu C, Yu C, Miao M, Zhang X, Zhu Z, Ding X & Li Y. Association between serum growth hormone levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *PLoS ONE* 2012 **7** e44136. (doi:10.1371/journal.pone.0044136)
- 13- Volzke H, Nauck M, Rettig R, Dorr M, Higham C, Brabant G & Wallaschofski H. Association between hepatic steatosis and serum IGF1 and IGFBP-3 levels in a population-based sample. *European Journal of Endocrinology* 2009 **161** 705–713. (doi:10.1530/EJE-09-0374).
- 14- Ichikawa T, Nakao K, Hamasaki K, Furukawa R, Tsuruta S, Ueda Y, Taura N, Shibata H, Fujimoto M, Toriyama K & Eguchi K. Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology International* 2007 **1** 287–294. (doi:10.1007/s12072-007-9007-4)
- 15- Salvatori R, Hayashida CY, Aguiar-Oliveira MH, Phillips JA III, Souza AH, Gondo RG, Toledo SP, Conceição MM, Prince M, Maheshwari HG et al. Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 917–923. (doi:10.1210/jc.84.3.917)

- 16- Aguiar-Oliveira MH, Gill MS, Barreto ESA, Alcântara MRS, Miraki-Moud F, Menezes CA, et al. Effect of severe growth hormone (GH) deficiency due to a mutation in the GH releasing hormone receptor on insulin-like growth factors (IGF-1), IGF-binding proteins, and ternary complex formation throughout life. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 4118-25.
- 17- Barretto ESA, Gill MS, Freitas MES, Magalhães MMG, Souza AHO, Aguiar-Oliveira MH, Clayton PE. Serum leptin and body composition in children with familial GH deficiency (GHD) due to a mutation in the growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. *Clin Endocrinol.* 1999 **51**: 559–64.
- 18- 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. (doi:10.1210/jc.87.5.2018)
- 19- Oliveira CR, Salvatori R, Barreto-Filho J, Rocha IES, Mari A, Pereira RM, Campos VC, Menezes M, Gomes E, Meneguz-Moreno RA et al. Insulin sensitivity and beta-cell function in adults with lifetime, untreated isolated growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012 **97** 1013–1019. (doi:10.1210/ jc.2011-2590)
- 20- Oliveira CR, Salvatori R, Meneguz-Moreno RA, Aguiar-Oliveira MH, Pereira RM, Valença EH, Araujo VP, Farias NT, Silveira DC, Vieira JG, Barreto-Filho JA 2010 Adipokine profile and urinary albumin excretion in isolated growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 693–698.

- 21- Oliveira JLM, Marques-Santos C, Barreto-Filho JA, Ximenes-Filho R, Britto AVO, Souza AHO, Prado CM, Oliveira CRP, Pereira RMC, Vicente TAR, *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. (doi:10.1210/jc.2005-2571)
- 22- Aguiar-Oliveira MH, Oliveira FT, Pereira RMC, Oliveira CRP, Blackford A, Valenca EHO, Gomes-Santos E, Gois-Junior MB, Meneguz-Moreno RA, Araujo 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. (doi:10.1210/jc.2009-1879)
- 23- Gomes-Santos EG, Salvatori R, Ferrão TO, Oliveira CRP, Diniz RDCA, Santana JAM, Pereira F A, Barbosa RAA, Souza AHO, 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; Jun 13;jc20142132. [Epub ahead of print].
- 24- Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, *et al.* (2005) Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* **54**: 3541–3546.
- 25- Nyenwe, E. A., Williamson-Baddorf, S., Waters, B., Wan, J. Y., & Solomon, S. S. (2009). Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome in Hypopituitary Patients. *The American journal of the medical sciences*, **338**(3), 190-195.
- 26- Collin de l'Hortet, A., *et al.* "GH administration rescues fatty liver regeneration impairment by restoring GH/EGFR pathway deficiency." *Endocrinology* (2014) **155** 2545-54. (doi: 10.1210/en.2014-1010)

- 27- Takahashi, Y., Iida, K., Takahashi, K., Yoshioka, S., Fukuoka, H., Takeno, R., & Chihara, K. (2007). Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency. *Gastroenterology*, **132**(3), 938-943.
- 28- Nishizawa, H., Iguchi, G., Murawaki, A., Fukuoka, H., Hayashi, Y., Kaji, H., & Takahashi, Y. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease in adult hypopituitary patients with GH deficiency and the impact of GH replacement therapy. *European Journal of Endocrinology* **167**(1) 67-74.
- 29- Gardner CJ, Irwin A, Daousi C, Macfarlane I, Joseph F, Bell J, Thomas EL, Adams V, Kemp G & Cuthbertson DJ. Nonalcoholic fatty liver disease, growth hormone deficiency and the effects of growth hormone replacement: a Liverpool magnetic resonance spectroscopy study. *European Journal of Endocrinology* 2012 **166** 993–1002. (doi:10.1530/EJE-12-0002)
- 30- Laron, Zvi. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NaFLD) in Patients with Laron Syndrome." In *Laron Syndrome-From Man to Mouse: Lessons from Clinical and Experimental Experience*, pp. 143-147. Eds Z Laron JJ Kopchick, Berlin–New York: Springer-Verlag, 2011.
- 31- Koteish, Ayman, and Anna Mae Diehl. "Animal models of steatosis." *Seminars in liver disease* 2001 **21** 81-94.

Table 1. Demographic and anthropometric measurements in isolated GH deficiency IGHD (n=22) and control group, CO (n=25)

	IGHD	CO	P
Age (year)	39.30 ± 12.00	37.80 ± 10.86	0.652
Gender	11 M	10 M	0.595
Height (m)	1.29 ± 0.12	1.63 ± 0.09	<0.0001
SDS Height/age	-5.75 ± 1.47	-0.78 ± 0.81	<0.0001
Weight (Kg)	39.33 ± 7.81	67.41 ± 13.13	<0.0001
BMI (Kg/m ²)	23.95 ± 4.99	25.27 ± 4.24	0.329
Waist (cm)	76.6 ± 10.03	84.78 ± 9.92	0.008
Hip(cm)	77.59 ± 9.03	93.56 ± 8.89	<0.0001
Waist/Hip ratio	0.98 ± 0.06	0.90 ± 0.07	<0.0001

Data are expressed as mean ± SD, except for gender

Table 2. Laboratorial data in isolated GH deficiency IGHD (n=22) and control group, CO (n=25)

	IGHD	CO	P
IGF-I	33.41 ± 20.70	160.62 ± 51.93	<0.0001
Total Cholesterol (mg/dl)	200.36 ± 51.19	171.56 ± 28.14	0.027
LDL Cholesterol(mg/dl)	124.86 ± 40.47	102.90 ± 24.20	0.032
HDL Cholesterol (mg/dl)	53.00 ± 12.11	48.65 ± 11.29	0.220
Triglycerides	113.18 ± 100.00	98.08 ± 63.55	0.551
AST (U/L)	32.63 ± 14.12	24.08 ± 7.07	0.013
ALT (U/L)	45.27 ± 28.48	34.36 ± 11.52	0.106
AST / upper limit	0.84 ± 0.36	0.62 ± 0.18	0.013
ALT/upper limit	1.01 ± 0.63	0.76 ± 0.26	0.106
GGT (U/L)	42.22 ± 37.53	28.86 ± 18.65	0.144
PT (seconds)	10.72 ± 0.72	11.20 ± 0.41	0.017
PA (%)	98.09 ± 4.82	97.70 ± 4.31	0.793
INR (%)	1.00 ± 0.03	1.02 ± 0.03	0.216
APTT (seconds)	26.82 ± 2.76	26.81 ± 1.44	0.996
Fibrinogen (mg/dl)	290.69 ± 46.81	272.62 ± 63.28	0.292
HP	0.76 ± 0.70	0.37 ± 0.64	0.041

Data are expressed as mean ± SD. PT= prothrombin time; PA= prothrombin activity;

APTT=Activated partial thromboplastin timeHP: hyper echogenic pattern : 0=absent; 1=mild,

2=moderate and 3=sever3

