

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

**RACHEL DINIZ CORREIA DE ARAÚJO**

**DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA NA  
DEFICIÊNCIA CONGÊNITA E ISOLADA DE GH**

**ARACAJU  
2014**

**RACHEL DINIZ CORREIA DE ARAÚJO**

**DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA NA  
DEFICIÊNCIA CONGÊNITA E ISOLADA DE GH**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar  
Oliveira

**ARACAJU  
2014**

**RACHEL DINIZ CORREIA DE ARAÚJO**

# DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA NA DEFICIÊNCIA CONGÊNITA E ISOLADA DE GH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Aprovada em:**

**Orientador: Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira**

**1º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Condé Lamparelli Elias**

**2º Examinador: Prof. Dr. Alex Vianey Callado França**

## PARECER

[illegible]

*Adelice e Venâncio,*

*Primeiros mestres da minha formação humana, pelo apoio e  
incentivo incondicional em todas as fases da minha vida...*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, pela família, pelos amigos, pela saúde e por ser tão generoso comigo.

A minha amada irmã, Kamila, pelo apoio, amor, conselhos, incentivo e força nas horas mais difíceis.

A minha avó Maria Cícera (in memorian), uma luz muito presente em minha vida.

A minha tia Iracema sempre presente com seus sábios conselhos que me inspiram a fazer esforços na direção de um futuro melhor.

Ao Prof. Dr. Manuel Hermínio, pelos ensinamentos, paciência, por ter acreditado, incentivado e fornecido a base necessária para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Roberto Salvatori (Johns Hopkins University), pela grande colaboração neste trabalho e em toda pesquisa com os Anões de Itabaianinha.

Ao Prof. Dr. Alex Vianey, pela disponibilização do aparelho de ultrassonografia, para o trabalho de campo em Itabaianinha. Obrigada!

À minha mãe sergipana Luzia Meire que me adotou como filha sempre ao meu lado, principalmente nas horas mais difíceis.

Aos meus tios, primos e amigos que hoje se alegram com mais esta conquista.

À amiga Rossana fez-me apaixonar por essa pesquisa, que há anos vem contribuindo na saúde, nas melhorias e na vida social dessa comunidade de Itabaianinha. Pelas dicas, disponibilidade de ajuda e colaboração do Pré-Projeto à qualificação.

À Renata Dultra, minha companheira de mestrado, meu anjo da guarda, minha colega de trabalho e uma grande amiga que a admiro pela sua inteligência, bondade, profissionalismo. Sempre calma e disponível para ajudar.

À minha amiga Ivina pelas dicas valiosas, apoio e incentivo e a toda equipe do Laboratório do Hospital Universitário pelo apoio incondicional no momento que mais precisei. Principalmente a Flavia, Armando, Dayse por sua ajuda e disponibilidade.

Ao grupo de pesquisa do projeto de Itabaianinha pela ajuda e força na realização desse trabalho Dra. Anita, Elenilde, Renata Machado, Rossana, Carla Raquel, Viviane, Eugênia, Daniela e Carlos.

Ao Saulo pelo apoio, incentivo, compreensão e disponibilidade, que no final dessa jornada entrou na minha vida como um anjo sempre ao meu lado.

À minha chefe Sandra Cavalcante (LACEN-SE) pela torcida, ajuda e compreensão.

Aos Anões de Itabaianinha pela paciência e disposição, sem os quais este trabalho seria impossível;

**Às amigas,** Maximiliana Andrade, Catarina Amaral, Ana Cristina Muniz, Ângela Maria, Ângela Lucia, Elen Paesante, Gabrielle Silva, Lucélia Lunguinho, Fabricia Alvisi, Lidianne Barreto, Lívia Amorim, Eroneide Brito, Lenise Franco Obrigada pela força e principalmente pela amizade.

## RESUMO

Rachel D C A Diniz. Doença hepática gordurosa não alcoólica na deficiência congênita e isolada de GH. Dissertação de Mestrado em Ciências da saúde. Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, UFS, Aracaju, Sergipe, 2014.

**Introdução:** 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 aumentada, com aterosclerose tardia e longevidade normal. **Método:** 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 (PH), codificado como 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderada; e 3 = grave. **Resultados:** Em comparação com controle, 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), ( $p = 0,044$ ). A frequência de DHGNA foi mais alta na DIGH que no CO (61 x 29 %,  $p = 0.032$ ) e PH foi superior em DIGH do que nos CO ( $p = 0,041$ ), mas não foi observada DHGNA grave em qualquer indivíduo com DIGH (ou CO). **Conclusão:** O escore do PH é maior nos indivíduos com DIGH não tratada. No entanto, o aumento da AST é moderado, sugerindo ausência de formas avançadas de DHGNA na DIGH.

**Palavras Chave:** Fígado Gorduroso; Hormônio do Crescimento; Fator de Crescimento Insulin-Like I.

# ABSTRACT

## LIVER STATUS IN CONGENITAL, UNTREATED, ISOLATED GH DEFICIENCY

**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 adult 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 prevalence of NAFLD was higher in IGHD than CO (61% vs. 29%,  $p=0.032$ ), and 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 congenital IGHD, but the increase in transaminases is mild, suggesting lack of advanced forms of NAFLD.

**Key Words:** Fatty Liver, Growth Hormone, Insulin Growth Factor-I Like

## LISTA DE FIGURAS

|                 |                                                                                                           |    |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Esquema da regulação intrínseca do eixo GH-IGF-I. <b>Fonte:</b> AGUIAR-OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010..... | 15 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

|                 |                                                                                                                                   |    |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Medidas demográficas e antropométricas em indivíduos com deficiência isolada de GH, DIGH (n=22) e grupo controle (CO) (n=25)..... | 29 |
| <b>Tabela 2</b> | Dados laboratoriais em pacientes com deficiência isolada de GH, DIGH (n = 22) e grupo controle (CO) (n=25).....                   | 30 |
| <b>Tabela 3</b> | Frequência dos grupos com DIGH e controles pelo grau de esteatose hepática....                                                    | 31 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ALT** - Alanina Aminotransferase ou Alanina Transaminase

**TTPA** - Tempo de Tromboplastina parcial ativada

**AST** - Aspartato Aminotransferase

**IMC** - Índice de massa corpórea

**CO** - Controle

**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

**GHRHR** - 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

**INR** - International normalized ratio

**DHGNA** - Doença hepática gordurosa

**EHNA** - Esteato hepatite não alcoólica

**EH** - Esteatose hepática

**PH** - Padrão hiperecogênico

**EDP** - Escore de desvio padrão

**HOMA<sub>ir</sub>** = Modelo homeostático de resistência a insulina

**PCR** = Reação em cadeia da polimerase

## LISTA DE SÍMBOLOS

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| <             | menor que                             |
| >             | maior que                             |
| ≤             | menor ou igual                        |
| ≥             | maior ou igual                        |
| %             | porcentagem                           |
| +             | adição                                |
| <b>ml</b>     | mililitro                             |
| <b>μl</b>     | microlitro                            |
| <b>UI</b>     | Unidades Internacionais               |
| <b>UI/ml</b>  | Unidades Internacionais por mililitro |
| <b>μl /ml</b> | microlitro por mililitro              |
| <b>μg/L</b>   | micrograma por mililitro              |
| <b>g</b>      | grama                                 |

# SUMÁRIO

|          |                                                                  |           |
|----------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                           | <b>12</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA</b>                                                | <b>14</b> |
|          | <b>LITERATURA.....</b>                                           | <b>14</b> |
|          | 2.1 Controle da Secreção do GH. ....                             | 15        |
|          | 2.2 Fatores de Crescimento semelhantes à Insulina .....          | 17        |
|          | 2.3 Ações do GH/IGF-I.....                                       | 18        |
|          | 2.4 Deficiências do GH por Mutações no Receptor GHRH(GHRHR)..... | 19        |
|          | 2.5 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica(DHGNA).....          | 21        |
|          | 2.6 Relação entre DGH e DHGNA .....                              | 23        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                            | <b>23</b> |
|          | 3.1 Objetivo Geral.....                                          | 23        |
|          | 3.2 Objetivos Específicos.....                                   | 24        |
| <b>4</b> | <b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>                                 | <b>24</b> |
|          | 4.1 Cauística.....                                               | 24        |
|          | 4.2 Critérios de exclusão.....                                   | 24        |
|          | 4.3 População.....                                               | 24        |
|          | 4.3.1 Experimento.....                                           | 25        |
|          | 4.4 Antropometria.....                                           | 25        |
|          | 4.5 Ultrassonografia.....                                        | 26        |
|          | 4.6 Análise laboratorial.....                                    | 27        |
|          | 4.7 Análise estatística.....                                     | 28        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                           | <b>32</b> |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                            | <b>35</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                            | <b>36</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                          | <b>43</b> |
|          | <b>ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b> | <b>44</b> |
|          | <b>ANEXO B – Parecer .....</b>                                   |           |
|          | <b>ARTIGO</b>                                                    |           |

## 1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma manifestação da síndrome metabólica e está associada às condições comuns, tais como obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias e aterosclerose (VILLANOVA *et al.*, 2005). A DHGNA inclui a mera acumulação de lipídios nos hepatócitos (esteatose hepática, EH), ou a inflamação do fígado (esteato hepatite não alcoólica, EHNA), com fibrose hepática ou fibrose avançada (LEVENE; GOLDIN, 2012).

A evolução da EH para EHNA pode ocorrer através do desenvolvimento de resistência a insulina, pelo acúmulo de gordura no tecido visceral e aumento do estresse oxidativo, com o consequente desenvolvimento de hepatite (ADAMS; ANGULO, 2005). Altas concentrações de leptina e níveis baixos de adiponectina também têm sido associados a esta evolução (ADAMS *et al.*, 2004). As consequências da DHGNA sobre mortalidade são temas de debates (ONG *et al.*, 2008), já que esta pode ser influenciada por definições variáveis e condições associadas. A mortalidade cardiovascular aumenta proporcionalmente à cirrose associada à EHNA em comparação com outros tipos de cirrose e a incidência de carcinoma hepatocelular associado é superior a 10% em 5 (cinco) anos (YATSUJI *et al.*, 2009). Portanto, torna-se importante a definição das causas da DHGNA.

A deficiência do hormônio de crescimento (DGH) de início na idade adulta constitui um modelo específico de síndrome metabólica (ATTANASIO *et al.*, 2010; DI *et al.*, 2010), assim como a obesidade visceral, a resistência à insulina, aterosclerose acelerada e aumento da mortalidade cardiovascular (ROSEN; BENGTSSON, 1990). A DGH tem sido associada à DHGNA (ICHIKAWA *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2012). Alguns dos efeitos do GH são mediados pelo IGF-I circulante, na maior parte de origem hepática. O IGF-I circula ligado a seis proteínas de ligação ao IGF-I, principalmente a IGFBP-3. Baixos níveis séricos de GH ou IGF-I e a proporção IGF-I/IGFBP-3 (refletindo a biodisponibilidade de IGF-I) têm sido propostos para contribuir para EHNA na DGH (VOLZKE *et al.*, 2009; ICHIKAWA *et al.*, 2007).

No município de Itabaianinha, no nordeste do Brasil, há pouco mais de 15 anos, iniciamos nossa pesquisa com um grande coorte de indivíduos (mais de 100 por 7 gerações) com deficiência congênita isolada do hormônio do crescimento (DIGH) devido a uma mutação em homozigose (c.57 +1 G → A) no gene do receptor do hormônio liberador do GH (GHRHR) (SALVATORI *et al.*, 1999). Esses indivíduos apresentam baixa circulação de níveis séricos de IGF-I e poderiam, portanto, estar predispostos a desenvolver DHGNA (AGUIAR-OLIVEIRA *et*

*al.*, 1999). Apesar da obesidade abdominal e o perfil de risco cardiovascular desfavorável (altos níveis de LDL-colesterol total e proteína C-reativa) (BARRETTO *et al.*, 1999; BARRETO-FILHO *et al.*, 2002), eles apresentam aumento da sensibilidade à insulina (OLIVEIRA *et al.*, 2012), adiponectina elevada e níveis séricos de leptina normais (OLIVEIRA *et al.*, 2010), não existe evidência aterosclerose prematura (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e a longevidade é normal (AGUIAR-OLIVEIRA *et al.*, 2010). Apesar de baixos níveis de IGF-I, a DHGNA estaria ausente ou leve, mesmo estando relacionada à resistência à insulina.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CONTROLE DA SECREÇÃO DO GH

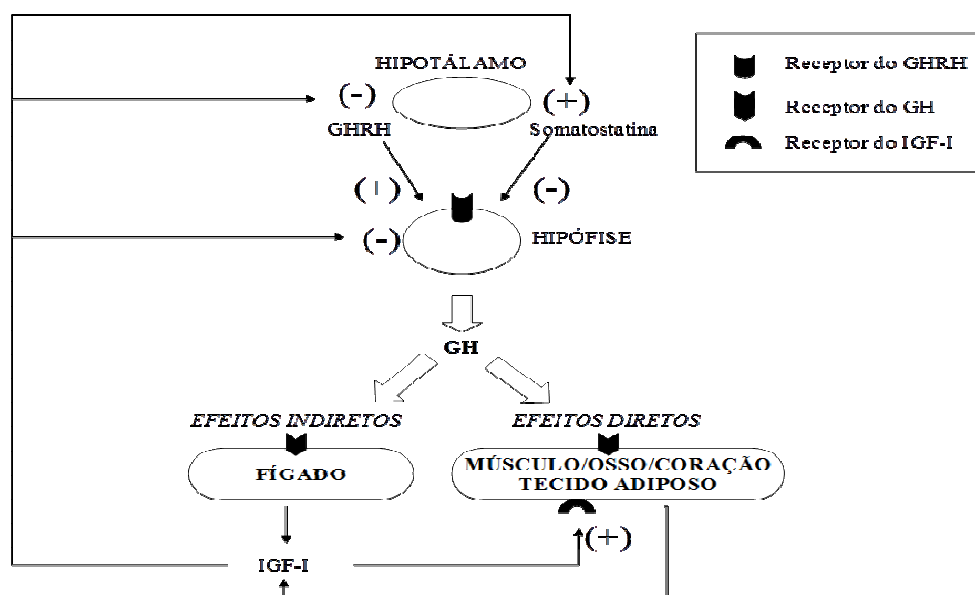
O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio polipeptídico de 198 aminoácidos com duas ligações internas, peso molecular de 22 Kda, sintetizado e secretado pela hipófise anterior, representando metade das células desta glândula. A secreção hipofisária de GH tem controle hipotalâmico, exercido fundamentalmente 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 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

### 3.2 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 (JONES *et al.*, 1995). Os genes codificadores dos IGFs localizam-se no braço longo do cromossomo 12 (*IGF-I*) e no braço curto do cromossomo 11 (*IGF-II*), em regiões próximas a proto-oncogenes (MARTINELLI *et al.*, 2005).

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). GH 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 sobre 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).

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).

Cada uma dessas proteínas transportadoras apresenta reguladores distintos que envolvem o 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).

### 3.3 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), 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, exerce efeitos metabólicos específicos: 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 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 participa 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; GOLLA *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 essencial 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.

### 3.4 DEFICIÊNCIA DO GH POR MUTAÇÕES NO RECEPTOR DO GHRH (GHRHR)

A primeira mutação no gene do GHRH-R ocasionando a DIGH tipo IB foi descrita em três famílias do sub-contidente 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 c.57 +1 G → 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 nesses 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). Os dados descritos sugerem a

existência de fatores de risco cardiovascular nos indivíduos com deficiência de GH, sem ocorrência maior de doença vascular ateromatosa nessa 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. Os 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.

### **3.5 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 al.*,1980; BACON *et al.*,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 al.*,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 al.*,2009).

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 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. Com 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 al.*, 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.*, 1988; MATTEONI *et al.*, 1999; Angulo *et al.*, 1999). Os níveis da fosfatase alcalina (FA) e glutamilttransferase (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. Dessa forma, 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 al.*, 1991; HULTCRANTZ *et al.*, 1993, SAADEH *et al.*, 2002).

No entanto, os exames por imagem não estabelecem o grau de severidade hepático e da fibrose hepática existente. Em casos que são necessárias essas informações indica-se a biópsia hepática (JOY *et al.*, 2003). A biópsia hepática é, portanto, considerada o exame padrão-ouro, devendo o diagnóstico 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.

### **3.6 RELAÇÕES 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 alterações metabólicas observadas em ambas às condições (JOHANNSSON, 1999; THOMAS, 2009). 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 têm importância na regulação do metabolismo lipídico hepático.

O GH e IGF-I são necessários 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-I é fortemente influenciada por várias proteínas de ligações específicas (IGFBP - 1 a 6), e o IGFBP-3 carrega mais de 80% do IGF-I circulante (JUUL, 2002). A presença de IGFBP-3 reduz a bioatividade de IGF-I (CONTI, 2004), e a relação entre os níveis de IGF-I e IGFBP-3 diminui com o aumento da idade em adultos, resultando em diminuição dos níveis IGF-I livre e biologicamente ativo (COLAO, 2005).

O fígado possui uma extraordinária capacidade regenerativa e de cura de lesões, não comparável a qualquer outro órgão. Esta resposta regenerativa é governada por uma complexa rede de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e metabólitos que são postos em ação em resposta a lesão hepatocelular (BERASAIN E AVILA, 2014). Contudo, quando a lesão é crônica, estes mecanismos regenerativos ficam desregulados, facilitando a acumulação de alterações genéticas, levando a cirrose hepática ou ao carcinoma hepatocelular.

O sistema de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, na sigla em inglês) tem sido identificado como uma peça chave em todos os estágios da resposta hepática à lesão, a partir da inflamação inicial e proliferação hepatocelular até a fibrogênese e transformação neoplásica (BERASAIN E AVILA, 2014). Modelos animais com deficiência de GH desenvolvem esteatose hepática e fibrose que é amenizada pela administração do GH ou IGF-I. No entanto, os mecanismos exatos pelos quais a deficiência de GH e IGF-I 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), os altos níveis de IGFBP-3 associado a uma baixa relação de IGF-I/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).

A DHGNA ocorreu com mais frequência 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 estudada a relação do GH na DHGNA em um modelo genético de DIGH, os “anões de Itabaianinha”.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Avaliar as alterações hepáticas em indivíduos com deficiência congênita e isolada do GH.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- Avaliar as alterações das enzimas hepáticas em indivíduos com deficiência congênita e isolada do hormônio do crescimento;
- Avaliar a presença e o grau de esteatose hepática em indivíduos com deficiência congênita e isolada do hormônio do crescimento;

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **4.1 Casuística**

Estudo transversal, analítico, com grupo controle realizado no município de Itabaianinha, Centro-Sul do Estado de Sergipe.

Este estudo foi submetido ao comitê de ética em pesquisa e os participantes assinaram o termo de consentimento e livre e esclarecido (Apêndice A).

#### **4.2 Critérios de exclusão**

- Histórico de consumo excessivo de álcool atual ou passado (definido por um consumo médio diário de mais de 20 g de álcool);
- Porcentagem de massa gorda inferior a 20% e superior a 50%;
- Diagnóstico de Diabetes Mellitus;
- Uso de glicocorticoides, GH e hormônios de tireoide;
- Sorologia positiva para Hepatite A, B e C, ou doença hepática congênita, auto-imune, colestática, ou induzida por drogas;

#### **4.3 População**

Indivíduos com DIGH e controles (idade 20 – 59 anos) foram convidados a participar do presente estudo, através de publicidade fixada no edifício local da associação e convites por ocasião das reuniões realizadas na Associação do Hormônio de Crescimento Físico e Humano de Itabaianinha (ASCRIN). O presente trabalho foi realizado num período de 2 (dois) anos.

##### **4.3.1 Experimento**

No grupo DIGH compareceram 22 indivíduos com homozigose comprovada em genótipo para a mutação c.57+1G→A no gene do receptor GHRH e no grupo Controle 25 indivíduos homozigotos para o alelo HLHC do tipo selvagem.

Os grupos ficaram assim constituídos:

- a) Grupo DIGH, 22 indivíduos ( $39 \pm 12$  anos, 11 M/ 11 F)
- b) Grupo Controle, 25 indivíduos ( $37 \pm 10$  anos, 10 M/ 15 F)

#### 4.4 Antropometria

Peso foi aferido utilizando balança digital G.TECH, com variação de 100g, e a altura com estadiômetro digital de parede (Modelo HM210D, Charder Medical Weighing and Measuring Products, Taichung City Taiwan, R.O.C) e escala (Charder Plataforma MS2510 Scale). A utilização consistiu em prender o suporte do estadiômetro na parede a 2 metros de altura e medir a estatura, puxando o estadiômetro para baixo até alcançar o vértice do indivíduo, descalço sobre a plataforma, calcanhares juntos, nádegas e ombros em contato com a parede e sendo exercida leve pressão no processo mastoide para cima com a média de 03 medidas consecutivas realizadas pelo mesmo examinador (BARRETTO *et al.*, 1999; CAMERON, 1984).

Circunferência abdominal foi medida com o paciente em posição ortostática de frente para o examinador, passando a fita métrica de fibra de vidro pelo abdome, na menor circunferência obtida entre o rebordo costal e a crista ilíaca. Circunferência do quadril foi medida com o indivíduo em posição lateral com pés juntos, sendo a fita posicionada ao nível da maior protrusão glútea, passando pelas cristas ilíacas.

Altura, peso e índice de massa corpórea (IMC) foram convertidos em escore de desvio-padrão da altura para a idade (EDP) utilizando o site:

<http://www.phinm.man.ac.uk/SDSCalculator/SDSCalculater.aspx>.

#### 4.5 Ultrassonografia

Medições ultra-sonográficas foram todas realizadas por um único radiologista, Professor do Serviço de Radiologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (T.O.F.), utilizando aparelho Medison Sono Ace 8000SE (*Samsung, Seoul Korea*), com transdutor convexo de 3.5 MHz. Respeitando-se o seguinte protocolo:

- a) ganho total: ajustado de modo que o conteúdo líquido da vesícula biliar e do sangue no interior da veia cava inferior se apresentassem não-ecogênicos. Curva de ganho calibrada na posição neutra;

- b) posicionamento do paciente: decúbito dorsal horizontal;
- c) varredura do transdutor realizada no hipocôndrio direito nos eixos longitudinal, transversal e oblíquo.

Para diagnosticar ES, foi utilizado um padrão hiperecogênico (PH) codificado como segue: 0 = ausente; 1, leve = (parênquima hepático com aumento sutil da ecogenicidade e atenuação do feixe sonoro, com redução sutil na visualização do diafragma e da vascularização intra-hepática); 2, moderado = (parênquima hepático com aumento moderado da ecogenicidade e atenuação do feixe sonoro, com redução moderada na visualização do diafragma e da vascularização intra-hepática); e 3, severo = (parênquima hepático com um grande aumento na ecogenicidade e atenuação do feixe de som, com uma perda marcada ou completa da visualização do diafragma e da vascularização intra-hepática) (TARGHER G *et al.*, 2005). O ultra-sonografista não teve acesso aos dados laboratoriais. Devido à redução da altura grave era impossível o conhecimento do fenótipo IGHD. Um indivíduo em cada grupo não realizou o ultrassom.

#### 4.6 Análise laboratorial

Foram coletadas em jejum amostras de sangue entre 07:00 e 09:00 horas para dosagem de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama-glutamil transpeptidase (GGT), colesterol total e frações, triglicérides, IGF-I (ng/mL), fibrinogênio, tempo de protrombina (TP), atividade de protrombina (AP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), Anti-HBC IgM, HBsAg e anti-HCV.

A alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama-glutamil transpeptidase (GGT), colesterol total e frações, triglicérides foi dosada pelo método de espectrofotometria com o Equipamento Vitros 5.1 da Johnson & Johnson.

AST e ALT foram divididos pelo respectivo limite superior (limite superior AST/limite superior ALT, respectivamente).

Os testes de coagulação como o fibrinogênio, tempo de protrombina (TP), atividade de protrombina (AP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) através da metodologia Detecção por Dispersão de Luz com o equipamento CA 540 – SYSMEX.

O IGF-I foi dosado por ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente, IMMULITE 2000® (*Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd., Malvern PA, USA*), com sensibilidade de 25 ng/ml, variabilidade intra e inter ensaio de 3.1% e 6.1%, respectivamente.

Em 16 de 23 (70%) indivíduos com DIGH os níveis séricos de IGF-I foram menores que o valor de detecção do ensaio, sendo considerado o valor de 25 ng/ml para cálculo da média e desvio-padrão da amostra.

Os anticorpos para detectar a Hepatite B e C, o Anti-HBC IgM, HBsAg e anti-HCV foram medidos por eletroquimioluminescência, ELECSYS 2010 (*Roche Diagnostics Basel, Suíça*).

Todos os testes foram realizados no Laboratório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, em Aracaju, capital do estado de Sergipe. Os resultados dos testes foram validados através de controle interno e externo de qualidade.

#### **4.7 Análise Estatística**

Os resultados foram gerenciados no software EXCEL e os dados foram expressos como média  $\pm$  DP. As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste t de amostras independentes e as variáveis categóricas e não normais (triglicéridos) pelo teste de Mann Whitney. Para a frequência dos grupos (DIGH E CO) com esteatose hepática pelo teste exato de Fisher. O software SPSS/PC 17,0 (SPSS, Inc.) foi utilizado. Valores *P* menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

Os dados demográficos e antropométricos são apresentados na tabela 1. Indivíduos com DIGH e CO com a mesma idade, sexo e IMC. Como esperado, os indivíduos com DIGH apresentaram menor altura e peso, mas tinham maior relação cintura/quadril que os indivíduos do CO.

Dados laboratoriais e ultrassonográficos são mostrados na tabela 2. Os níveis de IGF-I foram extremamente baixos e 16 de 22 em indivíduos com DIGH apresentaram valores abaixo do limite de sensibilidade de 25 ng/ml. Esses valores foram aceitos como sendo 25 com a finalidade de análises estatísticas.

Indivíduos com DIHC tiveram maior colesterol total e LDL, menor tempo de protrombina. O colesterol HDL, triglicérides, gama-GT, TTPA e valores de fibrinogênio semelhantes ao CO.

Os valores médios de ALT foram similares nos dois grupos, enquanto a AST foi maior nos indivíduos com DIGH. No entanto, mais indivíduos com DIGH (7/22) do que os do CO (3/23) apresentaram ALT / limite superior da relação normal acima de 1 ( $p = 0,044$ ). Quatro indivíduos DIGH (1,04; 1,13; 1,29 e 1,87), três Controles (1,20; 1,33 e 1,42), inferior 2 vezes, e três DIGH maior que o dobro (2,09; 2,20 e 2,67). Quatro indivíduos com DIGH (1,00; 1,13; 1,82 e 1,85) e um indivíduo do CO (1,31) tiveram AST / proporção limite acima da relação normal acima de 1. Nenhum indivíduo em ambos os grupos tiveram AST / proporção limite maior do que 2.

Enquanto a média da pontuação HP foi maior em indivíduos com DIGH do que indivíduos do CO ( $p=0,041$ ), esteatose hepática grave não foi observada em nenhum indivíduo com DIGH ou CO. Em DIGH, 61% dos indivíduos (13 em 21) tiveram EH (10 leve e 3 moderada), enquanto no CO 29% dos indivíduos (7 a 24) teve EH (5 leve e 2 moderada ) ( $p < 0,032$ ), Tabela 3.

**Tabela 1. Medidas demográficas e antropométricas em indivíduos com deficiência isolada de GH, DIGH (n= 22) e CO (n = 25)**

|                          | DIGH          | CO            | P       |
|--------------------------|---------------|---------------|---------|
| Idade (ano)              | 39,30 ± 12,00 | 37,80 ± 10,86 | 0,652   |
| Sexo                     | 11 M          | 10 M          | 0,595   |
| Altura (m)               | 1,29 ± 0,12   | 1,63 ± 0,09   | <0,0001 |
| EDP Altura/idade         | -5,75 ± 1,47  | -0,78 ± 0,81  | <0,0001 |
| Peso (Kg)                | 39,33 ± 7,81  | 67,41 ± 13,13 | <0,0001 |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | 23,95 ± 4,99  | 25,27 ± 4,24  | 0,329   |
| Cintura (cm)             | 76,6 ± 10,03  | 84,78 ± 9,92  | 0,008   |
| Quadril (cm)             | 77,59 ± 9,03  | 93,56 ± 8,89  | <0,0001 |
| Relação Cintura/Quadril  | 0,98 ± 0,06   | 0,90 ± 0,07   | <0,0001 |

**Tabela 2. Dados laboratoriais em pacientes com deficiência isolada de GH, DIGH (n= 22) e CO (n= 25)**

|                          | DIGH            | CO             | P       |
|--------------------------|-----------------|----------------|---------|
| IGF-I                    | 33,41 ± 20,70   | 160,62 ± 51,93 | <0,0001 |
| Colesterol total (mg/dl) | 200,36 ± 51,19  | 171,56 ± 28,14 | 0,027   |
| Colesterol LDL (mg/dl)   | 124,86 ± 40,47  | 102,90 ± 24,20 | 0,032   |
| Colesterol HDL (mg/dl)   | 53,00 ± 12,11   | 48,65 ± 11,29  | 0,220   |
| Triglicérides            | 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 / limite superior    | 0,84 ± 0,36     | 0,62 ± 0,18    | 0,013   |
| ALT/limite superior      | 1,01 ± 0,63     | 0,76 ± 0,26    | 0,106   |
| GGT (U/L)                | 42,22 ± 37,53   | 28,86 ± 18,65  | 0,144   |
| TP (segundos)            | 10,72 ± 0,72    | 11,20 ± 0,41   | 0,017   |
| AP (%)                   | 98,09 ± 4,82    | 97,70 ± 4,31   | 0,793   |
| INR (%)                  | 1,00 ± 0,03     | 1,02 ± 0,03    | 0,216   |
| TTPA (segundos)          | 26,82 ± 2,76    | 26,81 ± 1,44   | 0,996   |
| Fibrinogênio (mg/dl)     | 290,69 ± 46,81  | 272,62 ± 63,28 | 0,292   |

Os dados são expressos em média ± DP. TP = Tempo de protrombina; AP = Atividade de protrombina; TTPA= Tempo de tromboplastina parcial ativada.

Tabela 3. Frequência dos grupos com DIGH e controles pelo grau de esteatose hepática

|       | <b>0<br/>n(%)</b> | <b>1<br/>n(%)</b> | <b>2<br/>n(%)</b> | <b>EH<br/>n (%)</b> | <b>3<br/>n(%)</b> | <b>TOTAL<br/>n (%)</b> |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| DIGH  | 8(38%)            | 10(48%)           | 03(14%)           | 13(61%)             | 0(0)              | 21(100%)               |
| CO    | 17(29%)           | 05(21%)           | 02(8%)            | 07(29%)             | 0(0)              | 24(100%)               |
| TOTAL | 25(56%)           | 15(33%)           | 05(11%)           | 20(100%)            | 0(0)              | 45(100%)               |

0= ausente; 1=leve; 2=moderado; 3= severo.

## 6 DISCUSSÃO

A DHGNA é um problema de saúde pública muito importante, associada a várias condições comuns como a obesidade visceral, diabetes, aterosclerose e aumento da mortalidade cardiovascular. A DHGNA pode evoluir para EHNA, fibrose hepática e cirrose e, eventualmente, à insuficiência hepática, tornando-se uma importante causa de transplante de fígado (ADAMS *et al.*, 2004).

Dados do estudo atual mostram que a EHNA é mais frequente em indivíduos com DIGH congênita grave do que nos controles indígenas, apesar de ultrassonografia e bioquímica moderada, acompanhada por porcentagem de massa gorda e IMC. Mas com maior Relação cintura/quadril esse aumento é devido ao aumento específico da adiposidade visceral (GOMES-SANTOS *et al.*, 2014).

O sistema de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, na sigla em inglês) tem sido identificado como uma peça chave em todos os estágios da resposta hepática à lesão, a partir da inflamação inicial e proliferação hepatocelular até a fibrogênese e transformação neoplásica (BERASAIN E AVILA, 2014). O sistema EGFR engaja-se em vários “*crosstalk's*” com outros sistemas atuando como (BERASAIN E AVILA, 2014) um verdadeiro eixo para outros fatores de crescimento, citocinas e marcadores inflamatórios. Está bem demonstrado que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF-II) ativa o receptor tipo 1 de insulina (IGF-1 R) e transativa o EGF-R, através da heterodimerização. A inibição deste sistema em adição ao bloqueio do EGFR vem sendo usado na terapia do carcinoma hepatocelular (DESBOIS-MOUTHON C *et al.*, 2006). Por outro lado, a redução na sinalização do sistema do EGFR pode estar implicada na patogênese do déficit de regeneração pós hepatectomia. A diminuição da sinalização do sistema GH/EGFR é provavelmente o mecanismo responsável pela deficiência na regeneração hepática associada com a esteatose hepática que pode ser parcialmente recuperada no camundongo ob/ob pela administração de GH (COLLIN DE L'HORTET A *et al.*, 2014).

Embora o tratamento com o GH tenha um efeito positivo sobre a regeneração do fígado após a ressecção hepática (COLLIN DE L'HORTET A *et al.*, 2014), a sua eficácia na redução da esteatose hepática em hipopituitarismo é controverso, com relatos positivos (TAKAHASHI *et al.*, 2007; NISHIZAWA *et al.*, 2012) e negativos (GARDNER *et al.*, 2012) relatados. Além

disso, o tratamento com IGF-I não melhora DHGNA em indivíduos com nanismo na Síndrome de Laron, um modelo conhecido de resistência GH (LARON *et al.*, 2011).

Hipopituitarismo (muitas vezes com deficiência de GH) tem sido associada à esteatose hepática (ADAMS *et al.*, 2005; NYENWE *et al.*, 2009), mas não está claro se DHGNA é uma consequência da DGH (e IGF-I deficiência), ou se ambos são consequências não relacionadas de hipopituitarismo. Foi mostrado, por meio de biópsia hepática e do ácido hialurônico como marcador de fibrose, que o GH pode estar envolvido no mecanismo de secreção de triglicéridos de hepatócitos. Assim, os baixos níveis molares de IGF-I e IGF-I / IGFBP3 (refletindo baixa biodisponibilidade de IGF-I) podem ser associados com o acúmulo de lipídios e avançada fibrose em EHNA (ICHIKAWA *et al.*, 2007). Foi mostrado anteriormente que os indivíduos DIGH da coorte de Itabaianinha apresentam níveis muito baixos de GH no soro e de IGF-I, mais altos níveis IGF-I + IGF-II / IGFBP3 molar (devido a um aumento compensatório de IGF-II / IGFBP3 molar) (AGUIAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999). Acredita-se que este aumento de IGF-I + IGF-II / IGFBP3 molar pode resultar em uma maior biodisponibilidade (IGF-I + IGF-II), podendo diminuir a evolução da EH para fibrose ou cirrose.

Os indivíduos com DIGH têm maior AST sérica, e o número de indivíduos com ALT acima dos valores normais, foi maior na DIGH do que em CO. O tempo de protrombina mais baixo pode indicar maior síntese de protrombina pelo fígado, sem relevância clínica evidente. Os indivíduos DIGH apresentam mais DHGNA do que os controles, sem aparente evolução para estágios graves da DHGNA. Apesar de não realizarmos biópsia hepática, o método padrão-ouro para o diagnóstico de DHGNA, uma ampla avaliação do fígado por exames bioquímicos e de coagulação sugerem um padrão de DHGNA leve na DIGH de Itabaianinha. A EH dos nossos indivíduos DIGH (61%) foi semelhante ao relatado (55%) em pacientes adultos com nanismo Laron (resistência GH) (LARON *et al.*, 2011). A gravidade do EH também foi semelhante (leve em 48% do DIGH e em 45% dos anões Laron). Curiosamente, a presença de esteatose hepática não tem relação com a idade, sexo, grau de obesidade, dislipidemia, HOMA-IR, e terapia de estatina ou IGF-I os dados foram relatados pelo Prof Laron "as atuais teorias não se enquadram com desenvolvimento do fígado gorduroso (LARON *et al.*, 2011) ". Nossos dados estão de acordo com a sua conclusão sobre a dificuldade em diferenciar a influência da deficiência GH / IGF-I ou outros fatores no desenvolvimento da DHGNA.

Entre os pacientes com disfunção do hipotálamo e da hipófise, DHGNA foi diagnosticado com uma média de 3 anos após o diagnóstico de disfunção hipofisária, com alta prevalência de cirrose e morte (ADAMS LA *et al.*, 2004). Devido à idade relativamente jovem dos indivíduos

estudados neste trabalho, existe uma possibilidade de que essa progressão em DIGH congênita possa ocorrer na idade adulta. No entanto, depois de ter trabalhado com DIGH de Itabaianinha (incluindo o fornecimento de cuidados médicos primários) por mais de 20 anos. Não vimos nenhum caso de doença hepática clínica, exceto uma fibrose portal, devido à infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Além disso, nenhuma doença hepática foi relatada em certidões de óbito de 22 indivíduos com DIGH falecidos (AGUIAR-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As causas da não evolução da EH para cirrose e morte podem ser múltiplas. Um desses fatores altos níveis de IGF-I e IGF-II / IGFBP3, mas outros fatores de proteção podem ser importantes. Um deles é o nível elevado de adiponectina no soro (OLIVEIRA CR *et al.*, 2012). Um segundo fator de proteção é o de leptina normal (KOTEISH A & DIEHL *et al.*, 2011). A falta de sinalização da leptina em camundongos deficientes ou resistente a leptina está associada à DHGNA (KOTEISH A & DIEHL *et al.*, 2011). Os níveis da leptina sérica nos indivíduos com DIGH sugerem sinalização normal da leptina.

A prevalência do PH do fígado é maior em adultos com DIGH congênita, sem tratamento, mas com o apenas modesto aumento de transaminases, sugerindo falta de formas avançadas de DHGNA em DIGH congênito enfraquece a hipótese de uma relação causal de deficiência de GH/IHF-I com a patogênese do DHGNA.

## **7 CONCLUSÃO**

- 1.** A enzima hepática (AST) apresenta discreta elevação na DIGH.
- 2.** Maior frequência da DHGNA foi maior na DIGH.
- 3.** A DIGH não parece está associada à DHGNA.
- 4.** A deficiência de IGH não parece estar associada à EH.

## REFERÊNCIAS

- 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. et al. 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 MH. 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.
- 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.
- AGUIAR-OLIVEIRA MH. 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).
- 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* 2005;34:1221-1231.
- ATTANASIO AF. et al. Prevalence of metabolic syndrome in adult hypopituitary growth hormone(GH)-deficient patients before and after GH replacement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 74–81.
- BACON BR, FARAHVASH MJ, JANNEY CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.
- BARRETTO ESA. 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.
- BERASAIN C & AVILA MA. The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2014 **49** 9-23.
- BELLENTANI, STEFANO, MARINO, MARIANO. Epidemiology and natural history of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol*, v. 8, n. Supl 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 JD, PHILLIPS III JA. Growth disorders caused by genetics defects in the growth hormone pathway GH deficiency. In: Barness LA, Morron III G, Rudolph AM et al eds. *Advances in pediatrics*, St. Louis: Mosby; v.45, p.337-361, 1998.
- COLAO A. et al. 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.
- 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).
- CONTI E. et al. 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 SR, CUNHA DE SÁ LBP, LENGYEL AJ 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 RC. et al. The Growth Hormone Deficiency in adults. **Clin Endocrinol**, v. 37, p. 387-397, 1992.

DESBOIS-MOUTHON C. et al. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition induces a resistance mechanism via the epidermal growth factor receptor/HER3/AKT signaling pathway: rational basis for cotargeting insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;1(15):5445–56.

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

DI SOMMA C. et al. Prevalence of the metabolic syndrome in moderately-severely obese subjects with and without growth hormone deficiency. *Journal Endocrinology Investigation* 2010 **33** 171–177.

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

GLEESON HK. 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.

GOMES-SANTOS EG. 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].

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. et al. (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.

ICHIKA WAT. et al. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatic steatosis in patients with adult onset growth hormone deficiency. *Gut* 2003;52:914.

ICHIKAWA T. et al. 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).

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

JANSSEN JA. et al. 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 JI, CLEMMONS DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16:3-34.

JOSEPH AE. et al. 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. et al. 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.

KOTEISH A & DIEHL AM. Animal models of steatosis. *Seminars in liver disease* 2001 **21** 81-94.

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

LARON Z. "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.

LAUGHLIN GA. et al. 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.

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)

LUDWIG J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438.

MAHESHWARI HG. 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. et al. Nonalcoholic fatty liver disease - A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850.

- MARTINELLI JR CE, AGUIAR-OLIVEIRA MH. 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 CE, CUSTÓDIO RJ, AGUIAR-OLIVEIRA MH. Fisiologia do eixo GH-sistema IGF. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 52, n. 5, p. 717-725, 2008.
- MATTEONI CA. et al. 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 DJ. 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. et al. 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).
- NYENWE EA. et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome in Hypopituitary Patients. *The American journal of the medical sciences*, 2009 **338** 190-195.
- OLIVEIRA JLM. 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).
- OLIVEIRA CR. et al. Adipokine profile and urinary albumin excretion in isolated growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 693–698.
- OLIVEIRA CR. et al. Emerging role of the GH/IGF-I on cardiometabolic control. *Arq Bras Cardiol*, v. 97 (5), p. 434-439, 2011.
- OLIVEIRA CR. 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).
- 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)
- 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. et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
- ROSEN T & BENGTTSSON BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 1990 **336** 285–288. (doi:10.1016/0140-6736(90)91812-O)

ROSENFELD RG, 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. et al. Ghrelin – a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiol Res*. 2002;51:435-41.

SAADEH S. 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. et al. 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. et al. Silent non-alcoholic fatty liver disease – a clinical histological study. *J Hepatol* 2004; 41: 751-7.

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

SOUZA, AHO. 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 955962.(doi:10.1507/endocrj.EJ12-0322)

TELI MR. 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 YK. 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.

VILLANOVA N. et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005 **42** 473–480.

VOLZKE H. et al. 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).

XU L. et al. Association between serum growth hormone levels and nonalcoholic fatty liver disease: across-sectional study. *PLoS ONE* 2012 **7** e44136.(doi:10.1371/journal.pone.0044136).

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.

YATSUJI S. et al. 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)

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.

## APÊNDICE A



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

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o projeto: PERFIL HEPÁTICO NOS INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DE GH

Sr.(a) \_\_\_\_\_, estamos lhe convidando para fazer exames de sangue e imagem (Ultrassonografia) no Hospital Universitário, porque desejamos saber se o(a) senhor(a) tem alterações do perfil hepático no sangue e maior quantidade de gordura fígado. Nós forneceremos o transporte, e cuidaremos para não lhe causar malefícios, uma vez que, será somente uma coleta de sangue, em jejum, depois, mediremos seu peso e sua altura, e após a alimentação, seguiremos para realizar as os exames de imagem, que serão rápidas e sem riscos para a sua saúde.

Como benefício, iremos cuidar dos problemas que encontrarmos nos seus exames. Estes exames farão parte de um estudo: “Perfil Hepático Nos Indivíduos Com Deficiência Isolada de GH”, do mestrado em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Sergipe, orientado pelo Prof. Dr. Manuel Hermínio Aguiar Oliveira. O seu nome não será divulgado, porque o substituiremos por um número. Nossos telefones são: 2105-1700 e 9972-6015. Nós lhe daremos uma cópia deste termo de consentimento assinada e datada.

Se desejar participar assine abaixo.

Atenciosamente,

Rachel Diniz Correia de Araújo

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Data

## ANEXO A

### PARECER N° 1361/2004

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

Registro CEP: 043/2004

Processo nº 25000.064789/2004-90

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

Pesquisador Responsável: Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira.

Instituição: Universidade Federal de Sergipe/SE

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

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

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



# Liver status in congenital, untreated, isolated GH deficiency

Rachel D C A Diniz<sup>\*</sup>, Renata M Souza<sup>\*</sup>, Roberto Salvatori<sup>1</sup>, Alex Franca<sup>2</sup>, Elenilde Gomes-Santos, Thiago O Ferrão<sup>3</sup>, Carla R P Oliveira, João A M Santana, Francisco A Pereira, Rita A A Barbosa, Anita H O Souza, Rossana M C Pereira, Alécia A Oliveira-Santos, Allysson M P Silva, Francisco J Santana-Júnior, Eugênia H O Valença, Viviane C Campos and Manuel H Aguiar-Oliveira

Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Federal University of Sergipe, Aracaju, Brazil

<sup>1</sup>Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, the Johns Hopkins University School of Medicine, 1830 East Monument Street Suite #333, Baltimore, Maryland 21287, USA

<sup>2</sup>Division of Hepatology and <sup>3</sup>Division of Radiology, Federal University of Sergipe, Aracaju, Brazil

<sup>\*</sup>(R D C A Diniz and R M Souza contributed equally to this work)

Correspondence  
should be addressed  
to R Salvatori

**Email**  
salvator@jhmi.edu

## Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is known to be associated with insulin resistance, atherosclerosis, and low serum IGF1 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. To assess the prevalence and severity of NAFLD in adult subjects with lifetime, congenital, untreated IGHD, we studied 22 IGHD adults and 25 controls (COs) matched for age and sex. NAFLD was assessed by a comprehensive liver function panel, and ultrasonographic pattern (hyperechogenic pattern, HP) coded as follows: 0, absent; 1, mild; 2, moderate; and 3, severe. Compared with COs, IGHD individual had lower serum IGF1 ( $P < 0.0001$ ), higher total cholesterol ( $P = 0.027$ ), lower prothrombin time ( $P = 0.017$ ), and similar activated partial thromboplastin time and fibrinogen values. Alanine transaminase (ALT) values were similar in the two groups, but aspartate transaminase was higher in IGHD ( $P = 0.013$ ). However, more IGHD subjects (7/22) than COs (3/23) had ALT above the upper limit of normal ( $P = 0.044$ ). The prevalence of NAFLD was higher in IGHD than COs (61 vs 29%,  $P = 0.032$ ), and the HP score was higher in IGHD than COs ( $P = 0.041$ ), but severe NAFLD was not observed in any IGHD (or CO) individual. Liver HP score is increased in lifetime, untreated, congenital IGHD, but the increase in transaminases is mild, suggesting a lack of advanced forms of NAFLD.

## Key Words

- GH
- IGF1
- NAFLD
- isolated GH deficiency

Endocrine Connections  
(2014) 3, 132–137

## Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a manifestation of the metabolic syndrome and is associated with 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 with this evolution (4). The consequences of NAFLD on mortality are an issue of debate (5), as this can be influenced by variable definitions and associated conditions. Cardiovascular mortality is increased in NASH cirrhosis compared with 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 with NAFLD (10, 11, 12). Some of the effects of GH are mediated by circulating IGF1, which is mostly of liver origin. IGF1 circulates bound to six IGF1-binding proteins, mainly IGFBP3. Low serum levels of GH or IGF1 and IGF1/IGFBP3 ratio (reflecting low IGF1 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 seven 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 IGF1 levels and could therefore be predisposed to developing NAFLD (16). Despite abdominal obesity and unfavorable cardiovascular risk profile (high total and LDL-C 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). As NAFLD is related to insulin resistance, we hypothesized that, despite low IGF1, 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 conducted in Itabaianinha County in the Northeastern Brazilian state of Sergipe. We recruited volunteers (aged 20–59 years) through advertisement placed in the local Dwarfs Association building, and

through communication with subjects. 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 WT *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, sex, and percentage of fat mass (assessed by DXA) (23). From the 53 IGHD adult living individuals identified previously (22), two declined, 16 were excluded by age criterion, nine by GH treatment, one for alcoholism, one because of portal hypertension due to *Schistosoma mansoni*, and two because of fat mass lower than 20%. Therefore, 22 IGHD and 25 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 BMI were converted to SDSs using the website <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 nonechogenic. 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 hyperechogenic pattern (HP) coded as follows: 0, absent; 1, mild (hepatic parenchyma with a subtle increase in

**Table 1** Demographic and anthropometric measurements in isolated GH-deficient IGHD ( $n=22$ ) and control groups, COs ( $n=25$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  s.d., except for sex.

|                          | IGHD            | CO              | P       |
|--------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| Age (years)              | 39.3 $\pm$ 12.0 | 37.8 $\pm$ 10.9 | 0.652   |
| Sex                      | 11 M            | 10 M            | 0.595   |
| Height (m)               | 1.3 $\pm$ 0.1   | 1.6 $\pm$ 0.1   | <0.0001 |
| SDS height/age           | -5.8 $\pm$ 1.5  | -0.8 $\pm$ 0.8  | <0.0001 |
| Weight (kg)              | 39.3 $\pm$ 7.8  | 67.4 $\pm$ 13.1 | <0.0001 |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 24.0 $\pm$ 5.0  | 25.3 $\pm$ 4.2  | 0.329   |
| Waist (cm)               | 76.6 $\pm$ 10.0 | 84.8 $\pm$ 9.9  | 0.008   |
| Hip (cm)                 | 77.6 $\pm$ 9.0  | 93.6 $\pm$ 8.9  | <0.0001 |
| Waist/hip ratio          | 0.98 $\pm$ 0.1  | 0.90 $\pm$ 0.1  | <0.0001 |

echogenicity and sound beam attenuation and a subtle decrease in the visualization of the diaphragm and intrahepatic vascularization); 2, moderate (hepatic parenchyma with a moderate increase in echogenicity and sound beam attenuation and a moderate decrease in the visualization of the diaphragm and intrahepatic vascularization); and 3, severe (hepatic parenchyma with a increase in echogenicity and sound beam attenuation, with a marked or complete loss of the visualization of the diaphragm and of the intrahepatic vascularization) (24). The sonographer was blinded to the laboratory data, but it was impossible to blind him to the IGHD phenotype, due to the severe height reduction. One subject in each group did not undergo ultrasound imaging.

**Laboratory analyses** ► Fasting blood samples were collected between 0700 and 0900 h. 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 electrochemiluminescence, ELECSYS 2010 (Roche Diagnostics). IGF1 was measured by a solid-phase, enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay IMMU-LITE 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd, Malvern, PA, USA), with a sensitivity of 25 ng/ml. Intra- and interassay variabilities were 3.1 and 6.1% respectively. All the tests were carried out in the Laboratory of University Hospital of the Federal University of Sergipe, in Aracaju, capital of Sergipe state.

## Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  s.d. Continuous variables were compared by the independent-samples *t*-test and categorical and not normal variables (triglycerides) by the Mann-Whitney *U* test. Percentages were compared by Fisher's exact test. The SPSS/PC 15.0 software (SPSS, Inc.) was used. *P* values <0.05 were considered significant.

## Results

Demographic and anthropometric data are given in Table 1. IGHD and COs were of similar age and sex and have a similar BMI. As expected, IGHD subjects had lower height and weight, but had a higher waist/hip ratio than COs. Laboratory and sonography data are given in Table 2. IGF1 levels were extremely low in IGHD individuals, and 16 out 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-C, lower PT, and similar HDL-C, triglycerides,  $\gamma$ -GT, APTT, and fibrinogen values compared with COs.

Average ALT values were similar in the two groups, while AST was higher in IGHD subjects. However, more IGHD subjects (7/22) than COs (3/23) had an ALT/upper

**Table 2** Laboratorial data in isolated GH-deficient IGHD ( $n=22$ ) and control groups, COs ( $n=25$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  s.d.

|                           | IGHD              | CO               | P       |
|---------------------------|-------------------|------------------|---------|
| IGF1                      | 33.4 $\pm$ 20.7   | 160.6 $\pm$ 51.9 | <0.0001 |
| Total cholesterol (mg/dl) | 200.4 $\pm$ 51.2  | 171.6 $\pm$ 28.1 | 0.027   |
| LDL-C (mg/dl)             | 124.9 $\pm$ 40.5  | 102.9 $\pm$ 24.2 | 0.032   |
| HDL-C (mg/dl)             | 53.0 $\pm$ 12.1   | 48.7 $\pm$ 11.3  | 0.220   |
| Triglycerides (mg/dl)     | 113.2 $\pm$ 100.0 | 98.1 $\pm$ 63.6  | 0.551   |
| AST (U/l)                 | 32.6 $\pm$ 14.1   | 24.1 $\pm$ 7.1   | 0.013   |
| ALT (U/l)                 | 45.3 $\pm$ 28.5   | 34.4 $\pm$ 11.5  | 0.106   |
| AST/upper limit           | 0.8 $\pm$ 0.4     | 0.6 $\pm$ 0.2    | 0.013   |
| ALT/upper limit           | 1.0 $\pm$ 0.6     | 0.8 $\pm$ 0.3    | 0.106   |
| GGT (U/l)                 | 42.2 $\pm$ 37.5   | 28.9 $\pm$ 18.7  | 0.144   |
| PT (s)                    | 10.7 $\pm$ 0.7    | 11.2 $\pm$ 0.4   | 0.017   |
| PA (%)                    | 98.1 $\pm$ 4.8    | 97.7 $\pm$ 4.3   | 0.793   |
| INR (%)                   | 1.0 $\pm$ 0.0     | 1.0 $\pm$ 0.0    | 0.216   |
| APTT (s)                  | 26.8 $\pm$ 2.8    | 26.8 $\pm$ 1.4   | 0.996   |
| Fibrinogen (mg/dl)        | 290.7 $\pm$ 46.8  | 272.6 $\pm$ 63.3 | 0.292   |
| HP                        | 0.8 $\pm$ 0.7     | 0.4 $\pm$ 0.7    | 0.041   |

PT, prothrombin time; PA, prothrombin activity; APTT, activated partial thromboplastin time; HP, hyperechogenic pattern: 0, absent; 1, mild, 2, moderate and 3, severe.

limit of normal ratio above one ( $P=0.044$ ): four IGHD subjects (1.04, 1.13, 1.29, and 1.87) and three COs (1.20, 1.33, and 1.42) less than twice, and three IGHD subjects more than twice (2.09, 2.20, and 2.67). Four IGHD subjects (1.00, 1.13, 1.82, and 1.85) and one CO individual (1.31) had an AST/upper limit ratio above one. No individual in either group had an AST/upper limit ratio higher than two. While the average HP score was higher in IGHD subjects than COs ( $P=0.041$ ), severe NAFLD was not observed in any IGHD (or CO) individual. It has been observed that 61% of IGHD subjects (13/21) had HS (ten mild and three moderate), while only 29% of COs (7/24) had HS (five mild and two moderate) ( $P<0.032$ ).

## Discussion

NAFLD is a very important public health care problem, linked to several common conditions such as 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).

Our data show that NAFLD is more frequent (although sonographic and biochemically mild) in individuals with severe congenital IGHD than in indigenous controls, matched by fat mass % and BMI, but with higher WHR. Such increase in WHR is due to a specific increase in visceral adiposity (23).

HS, together with insulin resistance, is correlated with downregulation of the GH signaling. The epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling system is a key player in all stages of the liver response to injury, from early inflammation and hepatocellular proliferation to fibrogenesis and neoplastic transformation (24). The EGFR receptor heterodimerizes with the IGF1 receptor, playing major roles in liver responses to injury (24). The GH/EGFR pathway downregulation is probably the mechanism responsible for liver regeneration deficiency associated with HS, which can be partially rescued in *ob/ob* mice by GH administration (25). Although GH treatment has a positive regenerative effect on the liver after hepatic resection (25), its efficacy in reducing NAFLD in hypopituitarism is controversial, with positive (26, 27) and negative (28) reports. Furthermore, IGF1 treatment does not improve NAFLD in individuals with Laron dwarfism, a known model of GH resistance (29).

Hypopituitarism (often with GHD) has been associated with NAFLD (30), but it is not clear whether NAFLD is a consequence of GHD (and IGF1 deficiency), or whether they are both unrelated consequences of hypopituitarism.

It has been shown, using liver biopsy and the hyaluronic acid as a fibrosis marker, that GH may be involved in the mechanism of triglyceride secretion from hepatocytes. Therefore, low levels of IGF1 and low IGF1/IGFBP3 ratio (reflecting low IGF1 bioavailability) may be associated with the accumulation of lipids and advanced fibrosis in NAFLD (14). We have previously shown that IGHD individuals from the Itabaianinha cohort have very low serum GH and IGF1 levels, but have a high total IGF1 + IGF2/IGFBP3 molar ratio (due to a compensatory increase in IGF2/IGFBP3 molar ratio) (16). We therefore hypothesize that this high IGF1 + IGF2/IGFBP3 molar ratio, resulting in high total (IGF1 + IGF2) bioavailability, could 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 COs. The lower PT 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, supports our conclusion of a mild NAFLD pattern in these IGHD subjects. The HS frequency of our IGHD subjects (61%) was similar to that reported (55%, 6/11) in adult patients with Laron dwarfism (GH resistance). The severity of HS was also similar (mild in 48% of our IGHD and in 45% of Laron dwarfs). Interestingly, because the presence of NAFLD was found not to correlate with age, sex, degree of obesity, blood lipids, HOMA-IR, and therapy by statins or IGF1, the data were reported by Prof. Laron to be 'not fitting with present theories of the development of fatty liver (29)'. Our data agree with their conclusion on the difficulty in differentiating between the influences of longstanding GH/IGF1 deficiency and other factors on the development of NAFLD.

Among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction, NAFLD was diagnosed with a median of 3 years after the diagnosis of pituitary dysfunction, with a high prevalence of cirrhosis and liver-related death (4). Given the relatively young age of the subjects studied in this work, one possibility is that such progression in congenital IGHD may occur later in life. However, having worked with this cohort (including providing primary medical care) for more than 20 years, we did not observe any case of clinical liver disease except one portal fibrosis due to *S. 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 IGF1+IGF2/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 with insulin resistance. A second protective factor is the normal leptin (19). Lack of leptin signaling in leptin-deficient and -resistant mice is associated with NAFLD (31). The normal leptin serum values of these IGHD individuals suggest normal leptin signaling.

In conclusion, the prevalence of NAFLD and the liver HP score are increased in adults with congenital, lifetime, untreated IGHD, but with only a modest increase in transaminases, suggesting the 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/IGF1 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.

#### Acknowledgements

The authors thank the 'Associação do Crescimento Físico e Humano de Itabaianinha' for their assistance.

#### References

- Villanova N, Moscatello 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. (doi:10.1002/hep.20781)
- 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)
- Adams LA & Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic Medicine* 2005 **22** 1129–1133. (doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01748.x)
- 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)
- 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)
- 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)

- Attanasio AF, Mo D, Erfurth EM, Tan M, Ho KY, Kleinberg D, Zimmermann AG & Chanson P. Prevalence of metabolic syndrome in adult hypopituitary growth hormone (GH)-deficient patients before and after GH replacement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 74–81. (doi:10.1210/jc.2009-1326)
- Di Somma C, Pivonello R, Pizza G, De Rosa A, Lombardi G, Colao A & Savastano S. Prevalence of the metabolic syndrome in moderately–severely obese subjects with and without growth hormone deficiency. *Journal of Endocrinological Investigation* 2010 **33** 171–177. (doi:10.1007/BF03346577)
- Rosen T & Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 1990 **336** 285–288. (doi:10.1016/0140-6736(90)91812-O)
- 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. (doi:10.1136/gut.52.6.914)
- 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)
- 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: across-sectional study. *PLoS ONE* 2012 **7** e44136. (doi:10.1371/journal.pone.0044136)
- 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)
- Ichikawa T, Nakao K, Hamasaki K, Furukawa R, Tsuruta S, Ueda Y, Taura N, Shibata H, Fujimoto M, Toriyama K et al. 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)
- 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/jcem.84.3.5599)
- Aguiar-Oliveira MH, Gill MS, Barretto ESA, Alcântara MR, Miraki-Moud F, Menezes CA, Martinelli CE, Pereira FA, Salvatori R, Levine MA 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** 4118–4125. (doi:10.1210/jcem.84.11.6133)
- Barretto ESA, Gill MS, Freitas ME, Magalhães MM, Souza AH, 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. *Clinical Endocrinology* 1999 **51** 559–564. (doi:10.1046/j.1365-2265.1999.00837.x)
- 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/jcem.87.5.8474)
- Oliveira CR, Salvatori R, Barreto-Filho J, Rocha IE, 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 et al. Adipokine profile and urinary albumin excretion in isolated growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 693–698. (doi:10.1210/jc.2009-1919)
- 21 Oliveira JL, Marques-Santos C, Barreto-Filho JA, Ximenes-Filho R, Britto AV, Souza AH, Prado CM, Oliveira CR, Pereira RM, Vicente TA 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 RM, Oliveira CR, Blackford A, Valença EH, Santos EG, 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 CR, Diniz RD, Santana JA, 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 [in press]. (doi:10.1210/jc.2014-2132)
- 24 Berasain C & Avila MA. The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2014 **49** 9–23. (doi:10.1007/s00535-013-0907-x)
- 25 Collin de l'Hortet A, Zerrad-Saadi A, Prip-Buus C, Fauveau V, Helmy N, Zioli M, Vons C, Billot K, Baud V, Gilgenkrantz H et al. GH administration rescues fatty liver regeneration impairment by restoring GH/EGFR pathway deficiency. *Endocrinology* 2014 **155** 2545–2554. (doi:10.1210/en.2014-1010)
- 26 Takahashi Y, Iida K, Takahashi K, Yoshioka S, Fukuoka H, Takeno R & Chihara K. Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency. *Gastroenterology* 2007 **132** 938–943. (doi:10.1053/j.gastro.2006.12.024)
- 27 Nishizawa H, Iguchi G, Murawaki A, Fukuoka H, Hayashi Y, Kaji H & Takahashi Y. Nonalcoholic fatty liver disease in adult hypopituitary patients with GH deficiency and the impact of GH replacement therapy. *European Journal of Endocrinology* 2012 **167** 67–74. (doi:10.1530/EJE-12-0252)
- 28 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)
- 29 Laron Z. 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.
- 30 Nyenwe EA, Williamson-Baddorf S, Waters B, Wan JY & Solomon SS. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in hypopituitary patients. *American Journal of the Medical Sciences* 2009 **338** 190–195. (doi:10.1097/MAJ.0b013e3181a84bde)
- 31 Koteish A & Diehl AM. Animal models of steatosis. *Seminars in Liver Disease* 2001 **21** 81–94. (doi:10.1055/s-2001-12932)

Received in final form 7 August 2014

Accepted 12 August 2014

