

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**CONCENTRAÇÃO DE GRELINA, LEPTINA,
INSULINA E GLICOSE EM CRIANÇAS EUTRÓFICAS
PREVIAMENTE HÍGIDAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA INÊS DE ALBUQUERQUE WILASCO

Porto Alegre, Brasil

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**CONCENTRAÇÃO DE GRELINA, LEPTINA,
INSULINA E GLICOSE EM CRIANÇAS EUTRÓFICAS
PREVIAMENTE HÍGIDAS**

MARIA INÊS DE ALBUQUERQUE WILASCO

Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Ayako Sueno Goldani

A apresentação da dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2010

Ficha catalográfica

W664c Wilasco, Maria Inês de Albuquerque

Concentração de grelina, leptina, insulina e glicose em crianças eutróficas previamente hípidas / Maria Inês de Albuquerque Wilasco ; orient. Themis Reverbel da Silveira ; co-orient. Helena Ayako Sueno Goldani. – 2010.

161 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Índice de massa corporal 2. Grelina 3. Leptina 4. Insulina 5. Glicose 6. Criança I. Silveira, Themis Reverbel da II. Goldani, Helena Ayako Sueno III. Título.

NLM: WS 130

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Esta dissertação foi defendida publicamente em: 28 de abril de 2010 e, foi avaliada pela banca examinadora composta por:

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

Prof. Dra. Simone Morelo Dal Bosco

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Centro Universitário Univates

Prof. Dr. Boaventura Antônio dos Santos

Departamento de Pediatria e Puericultura
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Aos meus **filhos** e **esposo** que me apoiaram nesta jornada entendendo a necessidade do tempo que dediquei para o desenvolvimento deste trabalho, muitas vezes abdicando da companhia deles.

Aos meus **pais**, que me proporcionaram educação, formação e estudo.

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Professora Doutora **Themis Reverbel da Silveira**, cujos ensinamentos, apoio e entusiasmo contagiante me ajudaram a prosseguir nesta jornada sem desanimar.
- À minha co-orientadora Professora Doutora **Helena Ayako Sueno Goldani**, sempre incansável em orientar e resolver situações inesperadas.
- À amiga e colega de profissão, **Cristina Toscani Leal Dornelles** pelo companheirismo, participação e dedicação na pesquisa; sem essa parceria o trabalho não teria sido possível.
- Ao amigo e biólogo **Rafael Lucyk Maurer**, pela serenidade e paciência sempre demonstradas nos ensinamentos das técnicas de laboratório e por a toda dedicação durante o decorrer do trabalho.
- Aos amigos **Michelle Garcia Maksud**, **Paula Ferrugem**, **Álvaro Macedo Laureano** e **Sandra Golçalves Vieira**, pelo apoio e participação no trabalho.
- À amiga **Marilene Porowski Garrido** que, com inesgotável paciência, muito auxiliou no entendimento dos complicados processos biológicos que participam da homeostase energética.
- Aos médicos **Jorge Luiz Santos** e **Cristiane Zilz**, por terem propiciado fácil acesso ao prontuário *on line*.
- Ao médico **Carlos Kieling**, por ter sido pacencioso e prestativo quando solicitado.
- Ao Professor Doutor **Masayasu Kojima**, pela delicadeza e disponibilização de informações e dados ainda não publicados.

- A **toda a equipe do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, que sempre tinham uma palavra de incentivo nos momentos difíceis.
- A **toda a equipe da Zona 14 do Hospital de Clínicas**, especialmente os coletadores **Mauro, Valentina, Marisa e Rosane**, que sempre tiveram paciência e auxiliaram incansavelmente durante todo o longo tempo de coleta.
- À **Marta Dotto** do GPPG, sempre disposta a resolver situações difíceis.
- Ao **CNPQ, FINE e CAPES/PROF.PPGSCA**, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.
- À Professora **Maria do Horto Motta**, pelo trabalho de correção ortográfica.
- A **Ceres Oliveira e Vania Hirakata**, pela análise estatística realizada.
- A **todas as pessoas** que colaboraram com este trabalho e às quais involuntariamente eu possa ter esquecido de mencionar.

RESUMO

Objetivos: Leptina e grelina são hormônios relacionados a regulação da ingestão alimentar e consequentemente o controle de peso. Como tem sido descrito até agora, os valores normais desses hormônios estão sujeitos a grande variabilidade. Devido a falta de estudos que contemplem os valores totais de grelina total, grelina acilada, leptina, insulina e glicose em crianças, esse estudo tem o objetivo de avaliar esses hormônios e comparar com as variáveis antropométricas em crianças eutróficas de 4 meses a 10 anos.

Pacientes e métodos: É um estudo transversal que avaliou 111 crianças de 4 meses a 10 anos de idade. Foram consideradas eutróficas crianças de até 5 anos com valores de IMC para idade entre -2,0 e +2,0 escores-z, e crianças maiores de 5 anos com valores entre -2,0 e +1,0 escores-z, de acordo com a OMS 2009. Os participantes foram selecionados de uma população saudável com pequeno procedimento cirúrgico ou revisão de saúde programada. As crianças foram categorizadas em três grupos: ≤ 24 meses ($n = 10$); 25-60 meses ($n = 22$); > 60 meses ($n = 27$). As amostras de sangue foram coletadas com um jejum mínimo de 3 horas e máximo de 14 horas. As concentrações de grelina total, grelina acilada e leptina foram dosadas pelo kit comercial ELISA (Linco Research, St Charles-MI, US). A concentração de Insulina foi testada com o kit ELISA (Diagnostics System Laboratories, INC Webster-TX, USA) e a de Glicose com o kit comercial GlicosePAP liquiform[®] (Labtest Diagnóstica – Lagoa Santa-MG, Brasil). Variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas com o teste t de Student e analisadas com ANOVA, e as que apresentaram distribuição assimétrica foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis e analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As correlações foram testadas pelos coeficientes de Pearson ou Spearman. O nível de significância utilizado foi 0,05.

Resultados: A média de idade foi 60 meses (mín-máx 35-91 meses). A mediana (percentis 25-75) dos valores de grelina acilada, grelina total, grelina desacilada, leptina e insulina foram 1,374 pg/ml (949-1,875); 288 pg/ml (212-450); 1,086 pg/ml (711-1,393); 1,53 ng/ml (1,11-2,77) e 15,5 μ U/ml (12,1-23,5), respectivamente. A média \pm DP da glicose foi $88,6 \pm 13,1$. A média do escore-z do IMC/I encontrada foi $-0,16 \pm 0,78$ para meninos e $-0,04 \pm 0,83$ para meninas. Foi encontrada uma correlação inversa da grelina total, acilada e desacilada com a idade [$r_s = -0,455$ ($P < 0,001$); $r_s = -0,313$ ($P = 0,001$); $r_s = -0,484$ ($P < 0,001$)], respectivamente. Ocorreu uma relação direta da leptina com IMC/I e com a idade [$r_s = 0,190$ ($P = 0,046$); $r_s = 0,429$ ($P < 0,001$)], respectivamente.

Conclusões: Os resultados observados nas dosagens e as correlações encontradas de grelina com faixa etária e leptina com sexo feminino e parâmetros antropométricos podem ser úteis para comparação com crianças que são portadoras de alterações de apetite.

Palavras chaves: Crianças; eutrofia; grelina; leptina; insulina; glicose.

ABSTRACT

Objective: Leptin and ghrelin are hormones related to regulation of food intake and consequently body weight control. Normal values of these hormones are subject to a great variability as has been described so far. Due to the lack of studies regarding plasma levels of total and acylated ghrelin and serum levels of leptin, insulin and glucose in young children, this study aimed to assess these hormones and compare with body mass index (BMI) in healthy well-nourish children aged 4 months -10 years old.

Methods: Cross-sectional study evaluated 118 children aged 4-129 months old with BMI-for-age values were within -2.0 and +2.0 SD z-scores for children under 5 years and within -2.0 and +1.0 SD for children over five years, according to WHO 2009. Subjects were enrolled from a population referred to minimal surgeries and routine medical check up. All subjects were categorized into 3 groups: ≥ 24 months (n = 10); 25-60 months (n = 22); > 60 months (n = 27). Blood samples were collected following a minimum of 3-hour and a maximum of 14 hours fasting period. Total and acylated ghrelin and leptin concentrations were assessed by ELISA commercial kit (Linco Research, St Charles-MI, US). Insulin was assessed by ELISA commercial kit (Diagnostics System Laboratories, INC Webster-TX, USA) and glucose by ELISA commercial kit GlicosePAP liquiform[®] (Labtest Diagnóstica – Lagoa Santa-MG, Brazil). Variables with normal distribution were compared by Student's *t* test and analysis of variance (ANOVA). Variables with asymmetric distribution were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests. Correlation between continuous variables was assessed by Pearson or Spearman correlation coefficient test. The level of significance used was 0.05.

Results: Total and acyl ghrelin, leptin and glucose were detected in all samples with a median (P 25-75) concentration in the whole group of 1.374 (949-1.875) pg/mL, 288 (212-450) pg/mL, 1.53 (1.11-2.77) ng/mL and 15.5 (12.1-23.5) μ U/mL, respectively. Glucose media \pm SD concentration was 88.6 ± 13.1 mg/dL.

Conclusions: Ghrelin showed an inverse correlation between and age and leptin a direct correlation between anthropometric parameters and gender in healthy well-nourished children. Insulin and glucose didn't correlate with any variable.

Keywords: Children; healthy; ghrelin; leptin; insulin; glucose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Variáveis que afetam a homeostase energética	17
Figura 2	Estrutura da grelina humana.....	19
Figura 3	Peptídios hipotalâmicos neurais envolvidos na regulação do apetite	22
Figura 4	Ação da grelina no tecido adiposo e no cérebro.....	28
Figura 5	Ação da leptina no hipotálamo e órgãos periféricos.....	31
Figura 6	Neurônios alvo da leptina no hipotálamo	32
Figura 7	Ação da leptina na puberdade.....	33
Figura 8	Funções da insulina	39
Figura 9	Fluxograma de triagem.....	55
Figura 10	Avaliação antropométrica.....	62
Figura 11	Grelina total e idade.....	75
Figura 12	Grelina acilada e idade.....	75
Figura 13	Grelina desacilada e idade.....	76
Figura 14	Curvas de percentis da grelina total para meninos e meninas	76
Figura 15	Curvas de percentis da grelina acilada para meninos e meninas.....	77
Figura 16	Curvas de percentis da grelina desacilada para meninos e meninas.....	77
Figura 17	Leptina e idade.....	79
Figura 18	Leptina e IMC para idade.....	79
Figura 19	Leptina e sexo.....	80
Figura 20	Leptina e estatura para a idade.....	80
Figura 21	Curvas de percentis da leptina para meninos e meninas.....	81
Figura 22	Curvas de percentis da insulina para meninos e meninas.....	81
Figura 23	Curvas de percentis da glicose para meninos e meninas.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Funções fisiológicas da grelina acilada.....	25
Tabela 2	Expressão predominante de diferentes adipocinas nos tecidos visceral e no subcutâneo.....	34
Tabela 3	Caracterização da amostra.....	69
Tabela 4	Dosagem de hormônios e glicose.....	70
Tabela 5	Dosagem de hormônios e glicose por faixa etária.....	71
Tabela 6	Dosagens entre as faixas etárias e por sexo.....	72
Tabela 7	Correlações entre as dosagens de grelina, variáveis antropométricas e idade.....	73
Tabela 8	Regressão linear múltipla para os níveis de grelina total, acilada e desacilada (valores sofreram transformação logarítmica).....	74
Tabela 9	Associações entre as dosagens de leptina, variáveis antropométricas e idade.....	78
Tabela 10	Regressão linear múltipla para os níveis de leptina (valores sofreram transformação logarítmica).....	78
Tabela 11	Associação entre as concentrações dos hormônios e glicose.....	82
Tabela 12	Trabalhos que avaliaram grelina e índices antropométricos em crianças.....	92
Tabela 13	Valores dosados de grelina em diversos estudos.....	93
Tabela 14	Trabalhos que avaliaram leptina e índices antropométricos em crianças.....	95
Tabela 15	Valores dosados de leptina em diversos trabalhos.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADP	<i>Adenosin diphosphate</i>
AgRP	<i>Agouti-related protein</i>
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ARC	<i>Arcuate nucleos</i>
ATP	<i>Adenosin tri-phosphate</i>
CART	<i>Cocaine and anfetamine regulated transcript</i>
CB	Circunferência braquial
CB/I	Circunferência do braço para idade
cDNA	<i>Complementary deoxiribonucleic acid</i>
CRH	<i>Corticotropin release hormone</i>
DCS	Dobra cutânea subescapular
DCS/I	Dobra cutânea subescapular para idade
DCT	Dobra cutânea tricipital
DCT/I	Dobra cutânea tricipital para idade
DP	Desvio padrão
DRIs	<i>Dietary reference intake</i>
E/I	Estatura para idade
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
GHS-R	<i>Ghrelin hormone secretagogue receptor</i>
GOAT	<i>Ghrelin O-acyltransferase</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment-insulin resistance</i>
IMC/I	Índice de massa corporal para idade
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
JAK-STAT	<i>Janus activating kinase-signal transducer and activator of transcription</i>
LEHG	Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NCHS	<i>National Center for Health and Statistics</i>
NCHS-OMS	<i>National Center for Health and Statistics - Organização Mundial de Saúde</i>
NHANES	<i>National Health and Nutritional Examination Surveys</i>
NPY	<i>Neuropeptide Y</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
POMC	<i>Pro-opiomelanocortin</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PVN	<i>Paraventricular nucleus</i>
RI	Resistência insulínica
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
SNC	Sistema nervoso central
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
VMN	<i>Ventromedial nucleus</i>
α-MSH	<i>α-melanocyte stimulating hormone</i>

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA LISTA DE TABELAS

DE ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 REGULAÇÃO DO APETITE E SACIEDADE	17
1.1.1 Grelina	18
1.1.1.1 Estrutura da grelina acilada e descilada	19
1.1.1.2 Distribuição no organismo	21
1.1.1.3 Receptor da grelina	22
1.1.1.4 Concentração da grelina	23
1.1.1.5 Funções fisiológicas da grelina	25
1.1.2 Leptina	29
1.1.2.1 Funções da leptina	30
1.1.2.2 Resistência à leptina	35
1.1.2.3 Outras situações que alteram os níveis de leptina	36
1.1.3 Insulina e glicose	37
1.1.3.1 Estrutura e secreção da insulina	37
1.1.3.2 Mecanismos da ação da insulina	39
1.1.3.3 Insulina, modulação hormonal e homeostase metabólica	40
1.1.3.4 Resistência à insulina	42

1.1.4 Moduladores da homeostase energética	43
1.1.5 Antropometria	44
1.1.5.1 Indicadores de crescimento	47
2 JUSTIFICATIVA	50
3 OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL	52
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	52
4 PACIENTES E MÉTODOS	54
4.1 DELINEAMENTO	54
4.2 POPULAÇÃO	54
4.3 AMOSTRA	56
4.3.1 Cálculo do tamanho da amostra	56
4.3.2 Critérios de inclusão	56
4.3.3 Critérios de exclusão	57
4.3.4 Coleta de dados	57
4.4 VARIÁVEIS ESTUDADAS	57
4.5 LOGÍSTICA	60
4.6 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	61
4.6.1 Crianças de zero a cinco anos	61
4.6.2 Crianças com mais de cinco anos	62
4.7 ANÁLISES DOS HORMÔNIOS E GLICOSE	63
4.8 EQUIPE DE TRABALHO	64
4.9 RESPONSABILIDADE NA PESQUISA	65
4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	65
4.11 ANÁLISE DOS DADOS	66

5 RESULTADOS	69
5.1 DOSAGENS DOS HORMÔNIOS E GLICOSE NO GRUPO	70
5.2 DOSAGEM DE HORMÔNIOS E GLICOSE POR FAIXA ETÁRIA E SEXO	71
5.3 ASSOCIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE GRELINA.....	73
5.4 ASSOCIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE LEPTINA.....	77
5.5 ASSOCIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA E GLICOSE.....	81
5.6 ASSOCIAÇÕES ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DOS HORMÔNIOS E GLICOSE	82
6 DISCUSSÃO	85
6.1 ANTROPOMETRIA.....	85
6.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	86
6.2.1 Hemoglobina e hematócrito.....	86
6.2.2 Sulfato ferroso e suplemento vitamínico em doses profiláticas.....	87
6.2.3 Jejum.....	88
6.3 DOSAGEM DE GRELINA.....	88
6.4 DOSAGEM DE LEPTINA.....	94
6.5 DOSAGEM DE INSULINA E GLICOSE.....	98
7 CONCLUSÕES	101
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
9 REFERÊNCIAS	105
10 Artigo: GHRELIN, LEPTIN, INSULIN AND GLUCOSE IN HEALTHY CHILDREN AGED 4-128 MONTHS	120
11 ANEXOS	139

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A última década proporcionou descobertas notáveis devido ao crescimento da obesidade como um problema de saúde pública mundial (OGDEN *et al.*, 2006). Foram realizados grandes avanços no entendimento de como o nosso organismo controla o peso e o apetite. Muitos trabalhos foram conduzidos e o resultado foi um aumento no entendimento do complexo, mas fascinante, sistema neuroendócrino no qual hormônios convertem informações sobre o balanço energético para rotas cerebrais que controlam a ingestão alimentar e o gasto energético. Apesar de todo o progresso alcançado, ainda se fazem necessárias mais pesquisas para uma completa elucidação destes mecanismos, principalmente na população infantil.

Os hormônios podem ser divididos em dois grandes grupos; os que agem rapidamente no sentido de controlar as refeições individuais e os que agem mais lentamente para promover a estabilidade dos estoques de tecido adiposo.

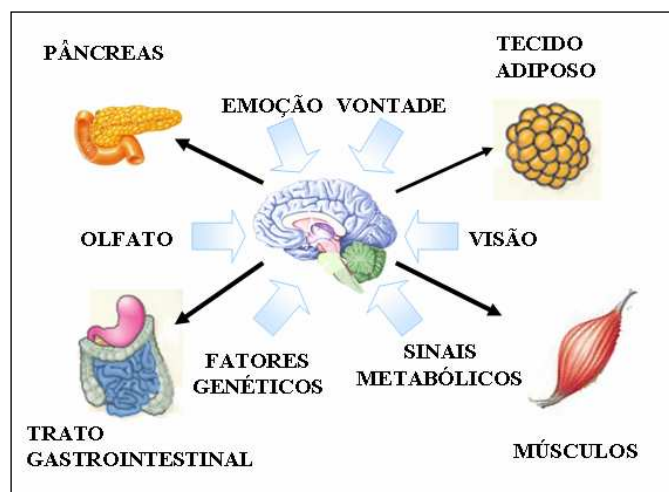
A grelina é um hormônio com potente efeito orexígeno produzido principalmente no estômago e que age rapidamente relacionada com o consumo de alimentos. É transportada ao hipotálamo através do nervo vago, onde participa de processos neuroendócrinos que controlam o apetite e a secreção do hormônio do crescimento (GH) (em inglês, *growth hormone*).

A leptina e a insulina são hormônios de ação mais lenta e que são liberados na corrente sanguínea em proporção à quantidade de tecido adiposo. Estes hormônios exercem efeitos inibitórios na ingestão alimentar e aumento no gasto energético.

Outros hormônios e peptídios interagem em rotas neuroendócrinas proporcionando aos seres humanos eutróficos um apreciável equilíbrio, mas que infelizmente ainda não está totalmente esclarecido.

1.1 REGULAÇÃO DO APETITE E SACIEDADE

A infância é o período em que ocorre a formação do comportamento alimentar, o qual engloba três importantes aspectos: fome, apetite e saciedade. A fome relaciona-se a mecanismos fisiológicos, biológicos e instintivos; o apetite refere-se ao desejo físico ou emocional de ingerir alimentos específicos, e a saciedade vincula-se à sensação de plenitude em relação à necessidade em alimentar-se. Integrando esses três aspectos, o sistema nervoso central (SNC) processa informações de variedade e complexidade surpreendentes, envolvendo várias substâncias centrais e periféricas. Através de estímulos cognitivo, visual, olfativo e gustativo, os alimentos são avaliados e integrados aos sinais de longa e curta duração relativos ao estado nutricional (figura 1).



Fonte: Modificado de Friedman, 2009.

Fig. 1 - Variáveis que afetam a homeostase energética.

Na década de 1930, Clara Davis, tentando responder à pergunta: *As crianças “sabem” o quanto precisam comer?* realizou um estudo sobre autosseleção dietética com crianças de zero a cinco anos, onde relatou que elas eram capazes de ajustar a ingestão de alimentos em função de suas necessidades nutricionais, mantendo assim o crescimento normal associado a um estado de saúde satisfatório. O estudo pioneiro sugeriu que as crianças possuem uma capacidade inata de regular a ingestão de alimentos *wisdom of de body* (STRAUSS, 2006), o que foi mais tarde bastante questionado.

Atualmente discutem-se o envolvimento de alguns hormônios, como a leptina e a grelina, bem como mecanismos neuroendócrinos e neuromoduladores na regulação do apetite. Em crianças, os dados ainda são escassos e controversos, sugerindo a necessidade de maiores investigações. O presente estudo se propõe a abordar mais detalhadamente a concentração de grelina, leptina, insulina e glicose em crianças eutróficas.

1.1.1 Grelina

A grelina é um hormônio peptídico que atua na liberação do GH e como modulador da homeostase energética na regulação da ingestão alimentar (KORBONITS *et al.*, 2004; SOARES & MOREIRA, 2008). Kojima *et al.*, em 1999, identificaram e isolaram, em extratos gástricos de ratos e humanos, o ligante endógeno para o receptor do secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R) (em inglês, *ghrelin hormone secretagogue receptor*), até então órfão, denominando-o de grelina. (KOJIMA *et al.*, 1999; HOSODA *et al.*, 2000; BEDNAREK *et al.*, 2000; KOJIMA *et al.*, 2001). O radical *ghre* descreve uma das principais funções desse hormônio, a secreção de GH (KOJIMA *et al.*, 2001).

1 Introdução

O gene da grelina humana está localizado no cromossomo 3p25-26 e o gene do GHS-R também se localiza no cromossomo três, na posição q26-q27 (SMITH *et al.*, 1997). Os 28 aminoácidos da grelina estão codificados nos éxons dois e três (KOJIMA & KANGAWA, 2005). Não está esclarecida a relação entre a grelina acilada e a desacilada, mas sabe-se que ambas são ativas e estão presentes no plasma e no estômago de humanos. Estudos recentes mostraram que o gene da grelina pode gerar, além da grelina acilada, outras moléculas bioativas, como a grelina desacilada e a obestatina (SOARES & MOREIRA, 2008).

1.1.1.1 Estrutura da grelina acilada e descilada

A grelina possui 28 aminoácidos e é o primeiro e único caso, até então, de um peptídeo modificado por um ácido graxo (KOJIMA *et al.*, 1999). Existem duas formas principais desse hormônio, a desacilada e a acilada, na qual o terceiro aminoácido, que é uma serina (ser3), sofre acilação (figura 2). Essa acilação ocorre por um ácido graxo *n-octanoico* na serina que está na posição três, condição que é postulada como essencial para muitas das atividades da grelina embora a forma desacilada circule em quantidades muito maiores, mas seu papel fisiológico não está bem estabelecido (KOJIMA & KANGAWA, 2005; SOARES & MOREIRA, 2008).

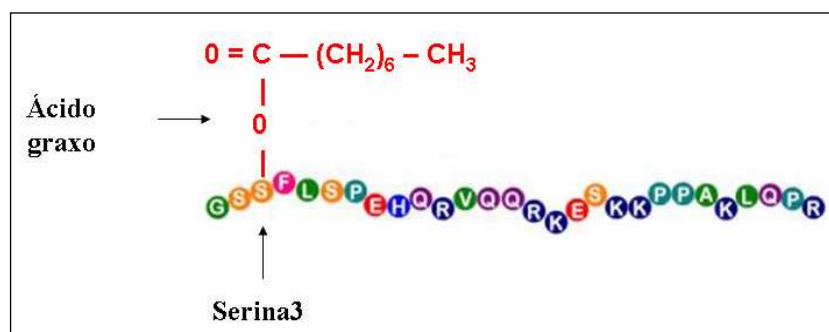


Fig. 2 - Estrutura da grelina humana.

No plasma, a grelina desacilada é encontrada predominantemente entre 75-90% ou mais e a grelina acilada, em aproximadamente 10-25% da grelina total (acilada e desacilada) (CHEN *et al.*, 2009a). Cassoni *et al.* (2004) destacaram que a forma desacilada compartilha, com a forma acilada, algumas ações não endócrinas, como o controle de proliferação celular e a adipogênese.

Há evidências de que a ingestão de triglicerídios de cadeia média pode aumentar a produção da grelina acilada sem alterar o nível total da grelina. O grupamento acil que se liga à grelina sintetizada corresponde aos que foram ingeridos, indicando que os ácidos graxos ingeridos são usados diretamente para a acilação da grelina (KOJIMA & KANGAWA, 2005).

A enzima que catalisa a acilação da grelina foi identificada em 2008 por dois grupos independentes (YANG *et al.*, 2008; KIRCHNER *et al.*, 2009) e denominada de grelina *O*-aciltransferase (GOAT) (em inglês, *ghrelin O-acyltransferase*). Recentemente foi demonstrada a colocalização da GOAT e da grelina na mucosa gástrica de ratos, bem como a atividade *in vitro* e as propriedades desta aciltransferase de cadeia média específica para grelina. A regulação da atividade da GOAT interfere nas atividades e funções fisiológicas da grelina, sugerindo, portanto, que a enzima GOAT seja um alvo terapêutico para doenças metabólicas e transtornos alimentares (YANG *et al.*, 2008; SAKATA *et al.*, 2009; OHGUSU *et al.*, 2009). O descobrimento da GOAT forneceu um provável alvo seletivo através do qual é possível inibir a ação biológica da grelina no sentido de prevenir sua ativação pela acilação. Inibidores da GOAT podem prevenir o desenvolvimento da obesidade induzida pela ingestão alimentar ou ser usados em outros tratamentos clínicos (GUALILLO *et al.*, 2008).

1.1.1.2 Distribuição no organismo

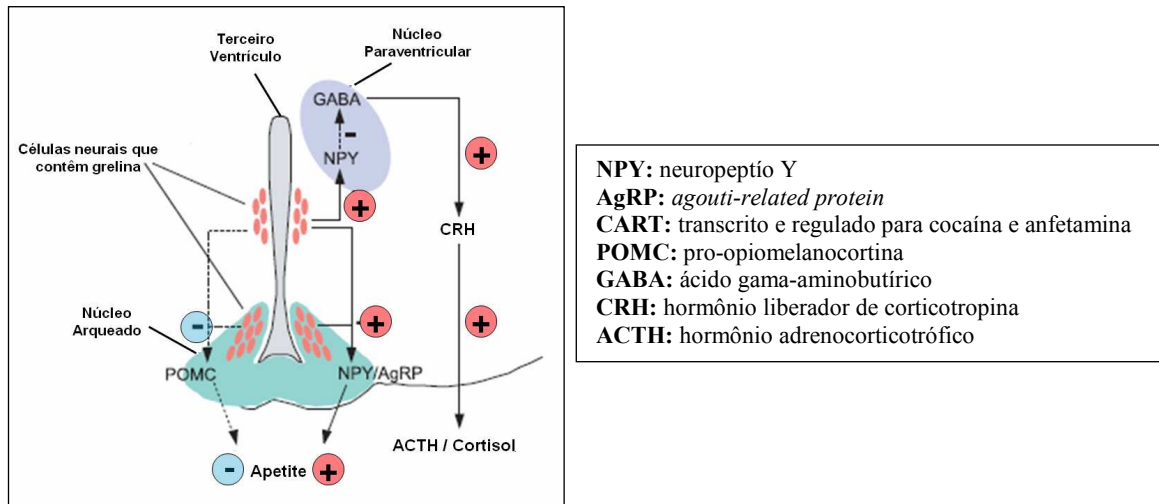
A grelina é produzida no estômago, mais abundantemente nas células do fundo (corpo) do que no piloro (DATE *et al.*, 2000a). Estudos por hibridização *in situ* e por análises histoquímicas indicam que as células produtoras de grelina (*X/A-like*) são um tipo distinto de células endócrinas situadas na mucosa do estômago (DATE *et al.*, 2000b). Células imunorreativas para a grelina também são encontradas no duodeno, jejuno, íleo e cólon (DATE *et al.*, 2000a). O pâncreas é igualmente um órgão produtor de grelina, que foi localizada nas células das ilhas α junto com o glucagon e/ou nas células ϵ , que são um novo tipo de células recentemente identificadas (KOJIMA & KANGAWA, 2010).

A grelina age no núcleo arqueado (ARC) (em inglês, *arcuate nucleus*) do hipotálamo, uma importante região no controle do apetite (HOWARD *et al.*, 1996; GUAN *et al.*, 1997). A grelina foi encontrada na glândula hipófise onde pode agir na liberação do GH por uma via autócrina ou parácrina. Esse padrão de localização sugere ter ela um papel no controle da ingestão alimentar com ação independente de seu efeito na liberação de GH (KOJIMA & KANGAWA, 2005; CHEN *et al.*, 2009a).

A grelina produzida no ARC induz uma pré-sinapse nos neurônios que expressam neuropeptídeo Y (NPY) (em inglês, *neuropeptide Y*) para liberá-los, estimulando a ingestão alimentar. Esses neurônios produtores de grelina no ARC também aumentam a taxa de ácido gama-aminobutírico (GABA) (em inglês, *gamma-aminobutyric acid*) que pode modular uma pós-sinapse para liberar pro-opiomelanocortina (POMC) (em inglês, *pro-opiomelanocortin*). No núcleo paraventricular (PVN) (em inglês, *paraventricular nucleus*), a grelina estimula a liberação de NPY que, em resposta, suprime a liberação de GABA, resultando na estimulação da liberação dos neurônios que expressam o hormônio liberador da corticotropina (CRH) (em

1 Introdução

inglês, *corticotropin release hormone*), levando à liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (em inglês, *adrenocorticotropic hormone*) e de cortisol (figura 3).



Fonte: Modificado de Kojima & Kangawa, 2005.

Fig. 3 - Peptídios hipotalâmicos neurais envolvidos na regulação do apetite.

1.1.1.3 Receptor da grelina

O GHS-R é um receptor de ligação para uma proteína G (GPCR) (em inglês, *G protein-coupled receptor*). Dois ácidos desoxirribonucleicos complementares (cDNAs) (em inglês, *complementary deoxiribonucleic acid*) distintos de receptores da grelina foram identificados, o GHS-R tipo 1a, com propriedades de ligação e funcionais, e o tipo 1b, produzido por um mecanismo de recomposição alternativa (HOWARD *et al.*, 1996). O GHS-R tem muitos homólogos, cujos ligantes endógenos são peptídios gastrointestinais ou neuropeptídios. O receptor da grelina é homólogo ao receptor da motilina, que é um peptídeo sintetizado pelas células endócrinas da mucosa duodeno-jejunal e cujo nome refere-se à sua

capacidade de estimular a motilidade dos órgãos digestivos; as formas humanas compartilham 52% de aminoácidos idênticos (FEIGHNER *et al.*, 1999; INUI, 2001; SMITH *et al.*, 2001).

O ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) (em inglês, *messenger ribonucleic acid*) do receptor para a grelina é predominantemente expresso no ARC, no núcleo ventromedial (VMN) (em inglês, *ventromedial nucleus*) e no hipocampo (NAKAZATO *et al.*, 2001). O mRNA do GHS-R também é detectado em múltiplos núcleos hipotalâmicos e na hipófise, bem como em outras regiões (KOJIMA & KANGAWA, 2005). Análises por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) (em inglês, *real-time polymerase chain reaction*) demonstraram que o mRNA do GHS-R é expresso em vários órgãos, como coração, rim, pulmão, fígado, pâncreas, estômago, intestinos, tecido adiposo e células do sistema imunológico (GNANAPAVAN *et al.*, 2002).

A grelina acilada, que se liga ao GHS-R, causa aumento na ingestão alimentar e diminuição no gasto energético; a desacilada não se liga ao mesmo receptor e sua ligação provável é com um receptor ainda não identificado (HOSODA, 2003). A obestatina, um peptídeo derivado do gene da grelina (progrelina) (SOARES & MOREIRA, 2008), se liga a outro receptor fazendo o inverso, ou seja, diminui a ingestão alimentar e aumenta o gasto energético. A grelina e a obestatina trabalham no sentido de manter um equilíbrio energético (NOGUEIRAS & TSCHOP, 2005).

1.1.1.4 Concentração da grelina

A concentração normal da grelina no plasma sanguíneo em humanos adultos é de 34-69 pg/ml (10-20 fmol/ml) para a acilada e de 340-519 pg/ml (100-150 fmol/ml) para a total (acilada e desacilada) (KOJIMA & KANGAWA, 2005).

A concentração de grelina geralmente aumenta em jejum prolongado e imediatamente antes das refeições habituais e diminui no período pós-prandial, pela ingestão de nutrientes. Os carboidratos têm um maior efeito supressor da produção de grelina do que os lipídios (SÁNCHEZ *et al.*, 2004). Segundo Overduin e colaboradores (2005), a supressão da grelina não é mediada por nutrientes no estômago e duodeno, pois, quando administrados nutrientes diretamente no jejuno, ocorre o mesmo efeito. Além do mais, glicose e aminoácidos têm um efeito supressor mais efetivo na grelina do que lipídios e frutose (TEFF *et al.*, 2004).

Segundo Cummings *et al.* (2001), a concentração plasmática aumenta em condições de jejum e se reduz após a alimentação, sugerindo assim que a grelina seja um sinal inicial para o aumento do apetite. A intensidade e a duração da supressão dos níveis de grelina pós-prandial estão relacionadas de forma dose-dependente com a quantidade de calorias das refeições (CALLAHAN *et al.*, 2004). Tannous dit El Khoury *et al.* (2006) e Foster-Schubert *et al.* (2008) descreveram um fenômeno notável na supressão da grelina, que denominaram de supressão bifásica, caracterizado por um decréscimo pré-prandial na grelina total e na acilada e um rebote intenso sobre as mesmas após a ingestão de carboidratos isolados, sugerindo que existem mecanismos que contribuem para promover a perda de peso com dieta hiperproteica e hipoglicêmica e o ganho de peso em dietas hiperlipídicas.

O controle da secreção de grelina pré-prandial não está completamente esclarecido, mas a ação simpática pode estar envolvida (DE LA COUR *et al.*, 2007). A supressão da grelina pós-prandial está bem documentada em animais e em humanos adultos, mas não em crianças (BELLONE *et al.*, 2004).

1 Introdução

1.1.1.5 Funções fisiológicas da grelina

Além da sua influência sobre o apetite, a grelina acilada interfere no peso corpóreo e na adiposidade (CHEN *et al.*, 2009b). Suas funções consistem em estimular ou inibir hormônios e/ou funções fisiológicas (tabela 1).

Tabela 1 - Funções fisiológicas da grelina acilada

Secreção hormonal	Função gástrica
↑ GH	↑ Secreção ácida
↑ ACTH (fraco)	↑ Motilidade
↑ Cortisol (fraco)	↑ <i>Turnover</i> gástrico e motilidade intestinal
↑ Prolactina (fraco)	
↑?↓ Insulina	
Efeitos anabólicos	Função cardiovascular
↑ Apetite	↑ Débito cardíaco
↑ Adiposidade	↓ Pressão sanguínea
↑ Glicose sanguínea	

↑Estimula; ↓Inibe

Fonte: Modificado de Kojima & Kangawa, 2005.

Dentre as ações periféricas da grelina acilada, destacam-se estimulação da secreção ácida e alterações da motilidade gástrica em ratos e humanos (ASAKAWA *et al.*, 2001; BALDELLI *et al.*, 2001; CAMILLERI *et al.*, 2009).

Um estudo demonstrou ações biológicas sutis e às vezes contraditórias da grelina desacilada no controle não só do metabolismo da ingestão alimentar da glicose e dos lipídios,

bem como no da motilidade gastrointestinal e da proliferação celular. Esses efeitos normalmente se opõem ou modificam a ação da grelina (CAMILLERI *et al.*, 2009).

- **Atividade de liberação do GH**

A grelina estimula a liberação do GH, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, diretamente proporcional à dose aplicada (ARVAT *et al.*, 2000). A liberação do GH atinge seu pico em aproximadamente cinco a 15 minutos após a injeção intravenosa de grelina e cai ao nível basal uma hora após a injeção. Uma simples administração de grelina intracerebroventricularmente também aumenta a concentração do GH no plasma de ratos de uma maneira diretamente proporcional, com uma dose mínima de 10 pmol (DATE *et al.*, 2000b).

- **Regulação da secreção de grelina e controle de peso**

A regulação do apetite revela que os mecanismos regulatórios não são somente do SNC, mas também mediados por fatores secretados por tecidos periféricos (NEARY *et al.*, 2004; SMALL & BLOOM, 2004; UKKOLA, 2004; WYNNE *et al.*, 2004) (figura 4). A leptina, produzida no tecido adiposo, age como um inibidor do apetite que transmite sinal de saciedade ao cérebro (FRIEDMAN, 2002). O sinal de fome dos tecidos periféricos permanecia sem identificação até a descoberta da grelina.

A distensão gástrica pela água não altera a concentração de grelina e a distensão mecânica isolada não induz sua secreção (KOJIMA & KANGAWA, 2008). Experimentos recentes com ratos adultos demonstraram que a grelina pode afetar a ingestão de alimentos e de água de maneira oposta: estimula a ingestão alimentar enquanto inibe a ingestão hídrica (MIETLICKI *et al.*, 2009).

A concentração de grelina, no entanto, é sensível ao tipo de refeição: diminui com uma refeição hiperlipídica e aumenta com uma refeição hiperproteica (KOJIMA &

KANGAWA, 2008). A grelina é produzida primariamente nos órgãos gastrointestinais em resposta à fome e ao apetite, considerado um forte sinal periférico no SNC para estimular a ingestão alimentar. Os níveis de grelina no plasma aumentam imediatamente antes de cada refeição programada e se reduzem a níveis basais uma hora após a ingestão (CUMMINGS *et al.*, 2001). Há aumento pré-prandial e supressão pós-prandial em humanos que iniciam a refeição voluntariamente, sem horários fixos (CUMMINGS *et al.*, 2004). O fator mais importante para a regulação da secreção da grelina é a alimentação. O nível de glicose no sangue também pode ser um fator crítico; quando a glicose é administrada oral ou intravenosamente, a concentração de grelina no plasma diminui (SHIYA *et al.*, 2002). A concentração de grelina no plasma é sensível, entretanto, ao número e horário de refeições e diminui mediante uma refeição rica em gordura (ERDMANN *et al.*, 2003; GREENMAN *et al.*, 2004).

A taxa pela qual a grelina periférica ultrapassa a barreira hematoencefálica parece ser muito baixa; assim, a grelina deve ativar regiões hipotalâmicas próprias via uma rota indireta. A detecção de receptores para grelina em neurônios aferentes vagais de ratos sugere que ela é transmitida ao cérebro via nervo vago (DATE *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2004).

A concentração de grelina no plasma é mais baixa em indivíduos obesos do que em não obesos (TSCHÖP *et al.*, 2001; HAQQ *et al.*, 2005). Relacionado a este fato, o nível de grelina no plasma se encontra bastante elevado em portadores de anorexia nervosa e retorna a níveis normais com ganho de peso e quando o indivíduo se recupera da doença (TANAKA *et al.*, 2003a). As concentrações de grelina também são elevadas em indivíduos com bulimia nervosa (TANAKA *et al.*, 2003b).

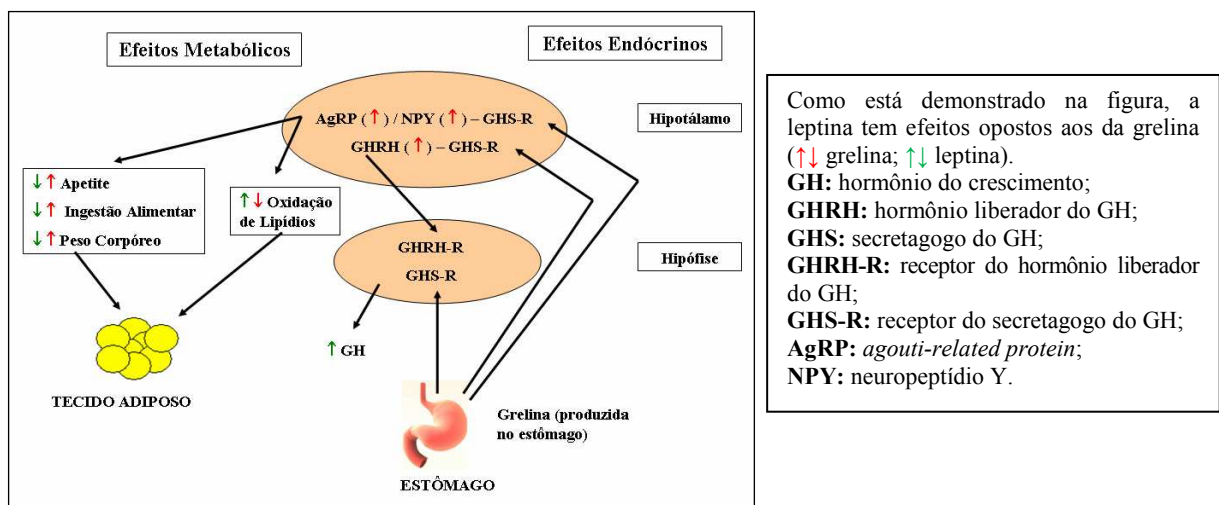
QI *et al.* (2003) observaram que uma elevação nos níveis circulantes do GH endógeno causa redução na produção e secreção de grelina no estômago de ratos. Em contrapartida, a administração do GH exógeno não afeta as reservas de grelina do estômago

1 Introdução

de animais o que pode ser atribuído à ideia de que a ingestão calórica também afeta o balanço da grelina no estômago, tornando difícil separar esse efeito do efeito *feedback* do GH.

Os neurônios que expressam grelina no ARC possuem fibras aferentes para as duas classes de neurônios: os orexígenos, que expressam NPY e AgRP (em inglês, *agouti-related protein*), e os anorexígenos, que expressam POMC e transcrito e regulado por cocaína e anfetamina (CART) (em inglês, *cocaine and amphetamine regulated transcript*). A grelina estimula a liberação de NPY e AgRP. O ARC também é um alvo da leptina, e uma parte dos efeitos anorexígenos da leptina e orexígenos da grelina funciona por regulação dos genes que codificam esses peptídios (figura 4).

O trabalho de Minokoshi *et al* (2004) mostrou que a quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (em inglês, *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) está envolvida nos processos hipotalâmicos de regulação do apetite. Quando a grelina é administrada *in vivo*, a atividade da AMPK se mostra aumentada no hipotálamo. Em contraste, quando a leptina é injetada, a atividade da AMPK se mostra diminuída (KOJIMA & KANGAWA, 2005).



Fonte: Modificado de Méier & Gressner, 2004.

Fig. 4 - Ação da grelina no tecido adiposo e no cérebro.

A grelina acilada, a grelina desacilada, a obestatina, o GHS-R e a GOAT podem fazer parte de um sistema composto por vários elementos efetores que constituem o centro de um eixo integrado cérebro-intestino, modulando o apetite, a digestão, a motilidade intestinal, a adiposidade e a distribuição de energia (CHEN *et al.*, 2009b).

1.1.2 Leptina

Em 1953, Kennedy propôs que um fator humoral supostamente produzido nos adipócitos causaria interferência negativa na ingestão energética, agindo de forma direta no hipotálamo e modulando o balanço energético, e sua proporção seria relativa ao grau de adiposidade corporal. No entanto, essa hipótese não foi confirmada até que, em 1994, foi descoberto o gene *ob* e sua proteína codificada denominada leptina (ZHANG *et al.*, 1994). A leptina foi identificada como produto de um gene nomeado *ob* (obeso) em ratos de laboratório. O gene *ob* se encontra no cromossomo 7q31.3 e é constituído por três éxons separados por dois íntrons. A região que codifica a síntese de leptina localiza-se nos éxons dois e três (HERMSDORFF *et al.*, 2004). A leptina constitui-se de 167 aminoácidos, com peptídeo terminal de 21 aminoácidos. Sua estrutura a classifica como da família das citocinas, tendo de quatro a cinco segmentos helicoidais (JANECKOVA, 2001). O radical *leptos*, oriundo do grego, significa magro. Ela é produzida quase que exclusivamente em adipócitos diferenciados embora seja encontrada em outros tecidos (MÉIER & GRESSNER, 2004). Movimenta-se através da corrente sanguínea até o cérebro, onde age nos receptores do hipotálamo para reduzir o apetite. Existe uma homologia de 84% da leptina humana com a de camundongos e de 83% com a de ratos (HAVEL, 2001).

Os ratos mutantes (com genótipo *ob/ob*, que não produzem leptina) mostraram o comportamento e a fisiologia de animais em constante estado de fome. Os seus níveis de corticosterona eram elevados e eles não conseguiam crescer normalmente, manter-se aquecidos, reproduzir-se ou controlar o apetite. Como consequência, tornaram-se gravemente obesos, pesando três vezes mais do que um rato normal (ZHANG *et al.*, 1994).

1.1.2.1 Funções da leptina

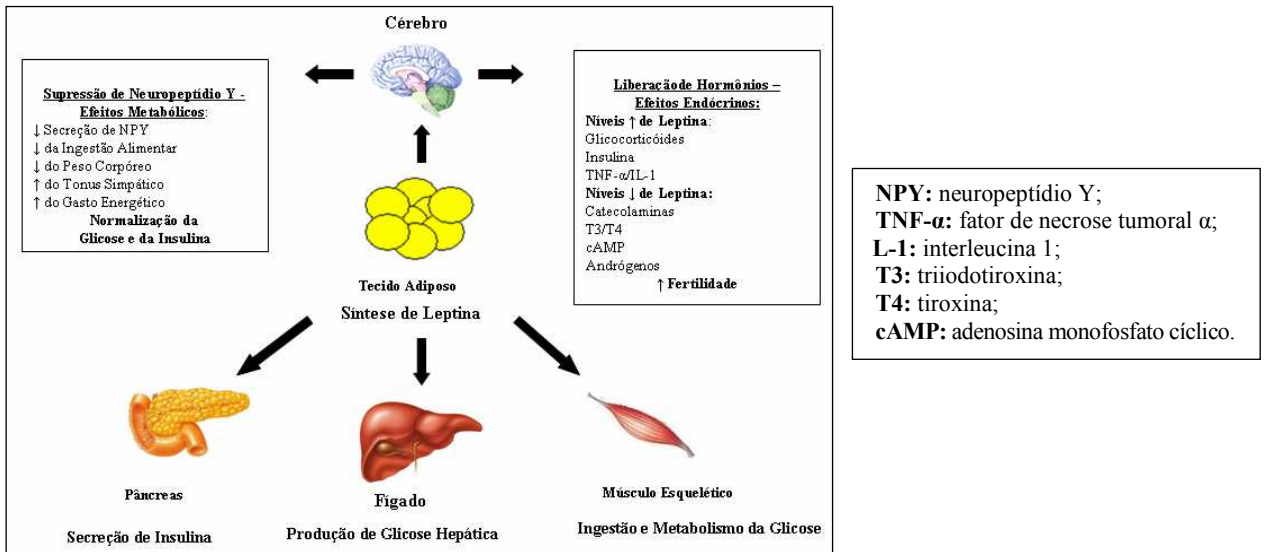
Estudos iniciais com leptina sugeriram que ela seria um indutor de magreza, pois os ratos *ob/ob* apresentam defeitos na regulação da temperatura corporal e obesidade. Efeitos similares ocorreram no jejum e foram atenuados pela reposição de leptina *in vivo* (AHIMA *et al.*, 1996; AHIMA *et al.*, 1997; FLIER, 2004). Dessa maneira, a leptina é um hormônio que age mais na regulação da quantidade de energia do que na perda de peso (FLIER, 1998).

A leptina age no cérebro e em vários tecidos periféricos, como pâncreas, fígado, tecido adiposo e sistema imunológico (BJORBAEK & KAHN, 2004) (figura 5). Sua ação central no cérebro, especialmente no hipotálamo, é bem caracterizada pela homeostase energética e por sua importância na função reprodutiva (FLIER, 2004).

Os níveis de leptina refletem o estado nutricional e são equiparados com a quantidade de tecido adiposo. Os níveis diminuem assim que o jejum se instala. A maneira exata pela qual a expressão da leptina é controlada não está esclarecida, apesar de o metabolismo insulino-estimulador da glicose e do receptor proliferador-ativador da peroxima (PPAR) (em inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor*) e seus antagonistas participarem do processo (MORENO-ALIAGA *et al.*, 2001). Uma das ações periféricas mais importantes da leptina é a redução da síntese e secreção de insulina, estabelecendo-se, assim, um eixo “adipo-

1 Introdução

insular” (SEUFERT, 2004). Evidências recentes sugerem que sinais hipotalâmicos regulam a sensibilidade da insulina no fígado via um neurocircuito envolvendo o nervo vago (GERMAN *et al.*, 2009), o que pode vir a ser um possível eixo cérebro-fígado no controle da homeostase energética.



Fonte: Modificado de Méier & Gressner, 2004.

Fig. 5 - Ação da leptina no hipotálamo e órgãos periféricos.

Em animais normais, a leptina encontra-se altamente expressa no ARC do hipotálamo que contém duas populações distintas de neurônios responsivos à leptina, os que expressam NPY/AgRP e os que expressam POMC/CART. Os que contêm POMC/CART são ativados pela leptina e conseqüentemente promovem o gasto energético e a perda de peso, enquanto que os que contêm NPY/AgRP promovem ingestão alimentar e ganho de peso e estão inibidos (ELIAS *et al.*, 1999; COWLEY *et al.*, 2001; VAN DEN TOP *et al.*, 2004) (figura 6).

1 Introdução

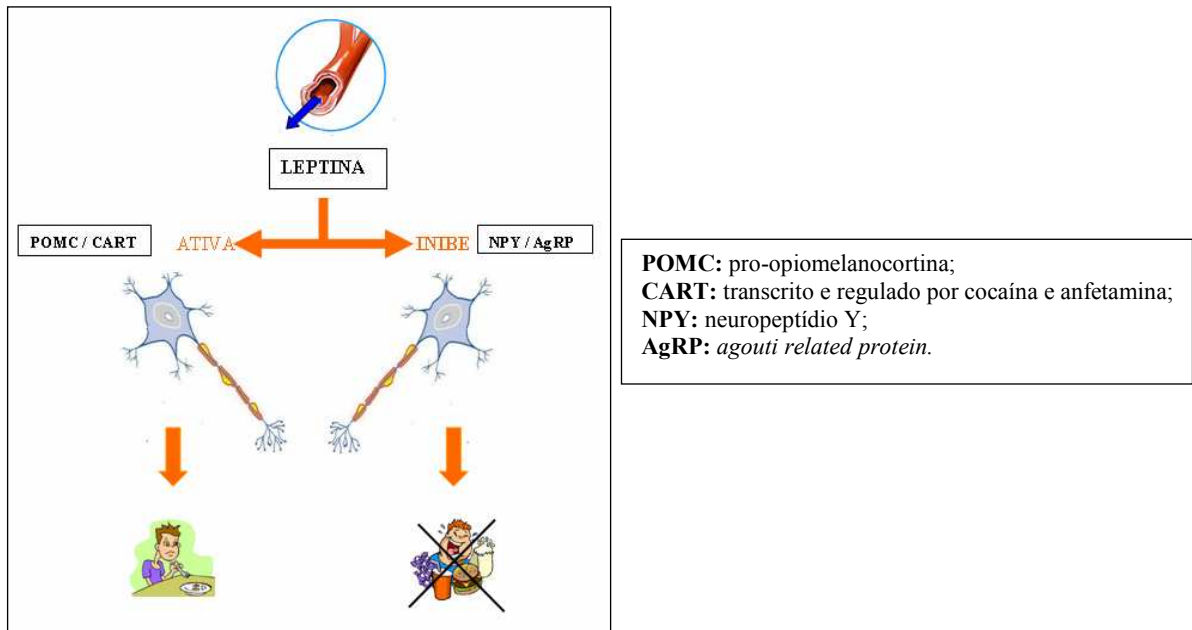


Fig. 6 - Neurônios alvo da leptina no hipotálamo.

Além de funcionar na regulação do peso corpóreo, a leptina participa da fisiologia da puberdade e da reprodução, informando ao cérebro se as reservas energéticas são suficientes para sustentar o início da puberdade e da reprodução; é ainda responsável por estimular a oxidação de ácidos graxos e a captação de glicose, impedindo assim o acúmulo de gordura nos tecidos. A leptina tem também papel fundamental sobre os sistemas imunológico, hematopoiético e cardiovascular (ROMERO & ZANESCO, 2006).

A leptina é um hormônio que tem relação direta com a fertilidade. Camundongos com genótipo *ob/ob* são inférteis, situação que é revertida após injeções de leptina, tornando-os capazes de procriar com cepas selvagens (CHEHAB *et al.*, 1996). Devido à alta demanda energética necessária à gestação e à lactação, a leptina teria o papel de informar ao SNC se as reservas de tecido adiposo são suficientes para manter a reprodução (CUNNINGHAM *et al.*, 1999).

Frisch & Revelle (1971) sugeriram a existência de uma quantidade crítica de gordura corpórea necessária para o desenvolvimento normal do ciclo menstrual: especificamente o

peso de 48 kg ou o percentual de gordura de 22% para permitir o progresso da puberdade (APTER *et al.*, 1978; VAN DER SPUIY, 1985). Essa hipótese do “peso crítico” foi controversa (CRAWFORD & OSLER, 1975; SCOTT & JOHNSTON, 1982) até que a descoberta da leptina, em 1994 (ZHANG *et al.*, 1994), que apresentou um hormônio candidato à sensibilização dos níveis de adiposidade com conseqüente retorno ao SNC para ativar a secreção de gonadotrofinas. Altos níveis de leptina são seguidos de uma infância curta, pois o ganho de peso seria o gatilho para uma puberdade precoce. De forma inversa, baixos níveis de leptina, como é o caso de crianças desnutridas, retardaria o processo (DUNGER *et al.*, 2006) (figura 7).

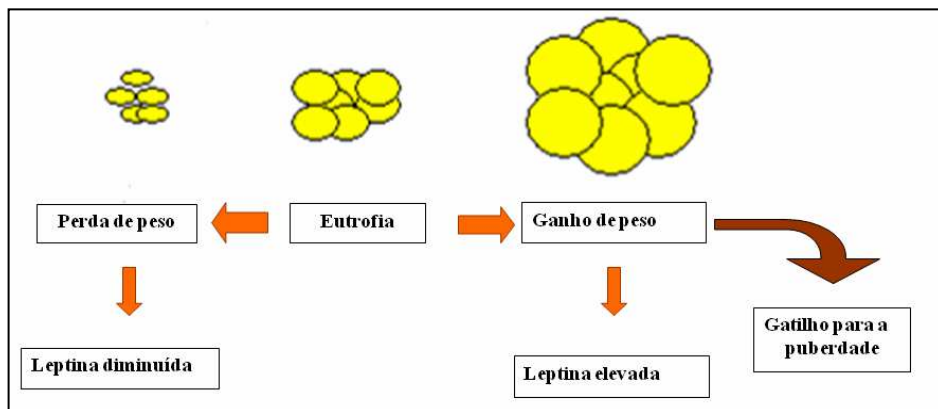


Fig. 7 - Ação da leptina na puberdade.

Na infância e na adolescência, há diferença nos níveis plasmáticos de leptina entre os sexos. No feminino, a concentração aumenta progressivamente de acordo com a idade, com o ganho de peso e com a gordura corporal, ao passo que no masculino se verifica uma diminuição progressiva. Isso ocorre devido às diferenças hormonais, tendo a testosterona uma correlação negativa com níveis de leptina. A expressão desse peptídeo é duas a três vezes maior no tecido subcutâneo do que no visceral, particularmente no sexo feminino, devido a serem os adipócitos subcutâneos maiores do que os viscerais (HERMSDORFF *et al.*, 2004).

1 Introdução

Em termos de secreção de adipocinas, algumas são preferencialmente expressas no tecido subcutâneo, e outras, no tecido visceral (tabela 2).

A presença de leptina no leite humano levanta a hipótese de um importante papel biológico no metabolismo neonatal, modulando a termogênese e a utilização de energia no período pós-natal imediato (SAVINO, 2008). As concentrações de leptina poderiam ser definidas pela alimentação recebida nos primeiros anos de vida e este seria um mecanismo que ligaria a dieta na infância ao risco de desenvolvimento de doenças na vida adulta (SAVINO, 2008).

Tabela 2 - Expressão predominante de diferentes adipocinas nos tecidos visceral e no subcutâneo

Subcutâneo	Visceral
Leptina	TNF- α *
Adiponectina	Visfatina
RBP-4	Interleucina-6
Proteína estimuladora da acilação	Interleucina-8
	Adipsina
	PAI-1
	Agiotensinogênio
	Resistina

Fonte: modificado de Marra & Bertolani, 2009.

RBP-4: proteína ligadora de retinol-4;

TNF- α : fator de necrose tumoral- α ;

PAI-1: inibidor de ativação de plasminogênio-1

*Indica prevalência não esclarecida ou dados conflitantes.

1.1.2.2 Resistência à leptina

A descoberta da leptina promoveu expressivo entusiasmo no âmbito dos estudos sobre balanço energético, que diminuiu após a compreensão de que a obesidade não é uma condição de insuficiência, mas, sim, de resistência à leptina. Indivíduos obesos frequentemente apresentam concentração de leptina elevada e sua administração mostra efeitos muito limitados (HEYMSFIELD *et al.*, 1999). Várias pesquisas sugerem que, assim como a insulina, o aumento da leptina no cérebro é facilitado pelos receptores da leptina expressos nas células endoteliais na barreira hematoencefálica que funcionam como transportadores de leptina. Não está claro se disfunção nesse processo de transporte pode levar à obesidade, porém a observação de que humanos obesos têm níveis baixos de leptina no fluido cerebroespinal quando comparados com os níveis plasmáticos é consistente com essa possibilidade (CARO *et al.*, 1996; BJØRBAEK *et al.*, 1998).

Uma área que está avançando no campo da obesidade é o entendimento do mecanismo molecular que fundamenta a sinalização da leptina via rota janus quinase-transdutores de sinal e ativadores da transcrição (JAK-STAT) (em inglês, *janus activating kinase-signal transducer and activator of transcription*). Enquanto a leptina ativa múltiplos sinais intracelulares em cascata, a resistência a ela é quase que exclusivamente caracterizada como uma ativação reduzida no fator de transcrição STAT3. Existem seis receptores da leptina (*ob-Ra / ob-Rb / ob-Rc / ob-Rd / ob-Re / ob-Rf*) (MARRA & BERTOLANI, 2009). O receptor *ob-Rb*, que possui a forma longa, ou seja, um número maior de aminoácidos, sinaliza principalmente via rota JAK-STAT. Quando ocorre resistência à leptina, a exposição a ela rapidamente induz a expressão do sinalizador da supressão da citocina-3 (SOCS3) (em inglês, *suppressor of cytokine signaling 3*) que inibe a sinalização do receptor de leptina, inibindo, conseqüentemente, a estimulação da leptina na rota JAK-STAT (HOWARD *et al.*, 2004). Os

mecanismos de resistência à leptina são essencialmente centrais, ou seja, ocorrem alterações na sinalização do receptor *ob-Rb* no SNC e um transporte ineficiente da mesma através de uma superexpressão da SOCS3, que é a molécula que inibe a sinalização da leptina (MARRA & BERTOLANI, 2009).

1.1.2.3 Outras situações que alteram os níveis de leptina

Situações de estresse, como jejum prolongado e exercícios físicos intensos, diminuem os níveis circulantes de leptina, comprovando, dessa maneira, a atuação do SNC na inibição da liberação de leptina pelos adipócitos (SANDOVAL & DAVIS, 2003). De forma inversa, uma dieta rica em lipídios aumenta a expressão dos receptores de leptina com consequente elevação de seus níveis. Uma dieta rica em lipídios, de alguma maneira, enfraquece a habilidade da leptina em regular a expressão do gene *ob-Rb* no ARC do cérebro (MITCHELL *et al.*, 2009).

Distúrbios nutricionais e alterações do apetite sofrem influência do tipo e da quantidade de nutrientes ingeridos, bem como de vários hormônios e peptídios. Os dados ainda são conflitantes, mas a grelina com sua função orexígena e a leptina com sua função anorexígena juntamente com outros hormônios e peptídios estão envolvidos no delicado equilíbrio que existe em seres humanos eutróficos.

1.1.3 Insulina e glicose

O termo glicose deriva do grego *glykys*, que significa “doce”, acrescentado do sufixo –ose. A glicose é um importante monossacarídeo, pois é a fonte de energia mais utilizada. No metabolismo, a glicose fornece quatro quilocalorias (KCal) de energia por grama. Quando hidratada, como é o caso do soro glicosado, fornece 3,4 KCal por grama. A degradação química da glicose durante o processo de respiração celular dá origem a ligações químicas que armazenam energia sob a forma de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) (em inglês, *adenosin tri-phosphate*). Níveis normais de glicose, além de proporcionar a quantidade de energia necessária ao organismo, também previnem problemas renais, neurológicos e oftalmológicos. A estrutura da glicose é representada por seis átomos de carbono e um grupo aldeído (C₆H₁₂O₆).

A insulina é um hormônio de caráter anabólico, produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas, em resposta aos níveis plasmáticos dos nutrientes, especialmente a glicose (FERRANINNI *et al.*, 1999). Desempenha importante papel no controle do peso corporal, por ser um dos hormônios responsáveis pela regulação da ingestão alimentar e do gasto energético, bem como atua no hipotálamo, interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome e da saciedade (SCHWARTZ, 2000).

1.1.3.1 Estrutura e secreção da insulina

A insulina é o principal hormônio responsável pelo controle do metabolismo da glicose. Seu precursor, a proinsulina (9,6 Kda, 86 aminoácidos), é também metabolizado nas células β das ilhotas de Langerhans. A glicose é o primeiro sinal de estímulo de secreção de

1 Introdução

insulina, pois, dentre os nutrientes secretagogos, somente ela pode iniciar a secreção de insulina. Assim, é recomendável a dosagem de ambas para uma interpretação correta da medida de insulina (CHEVENNE *et al.*, 1999; VOLP *et al.*, 2008).

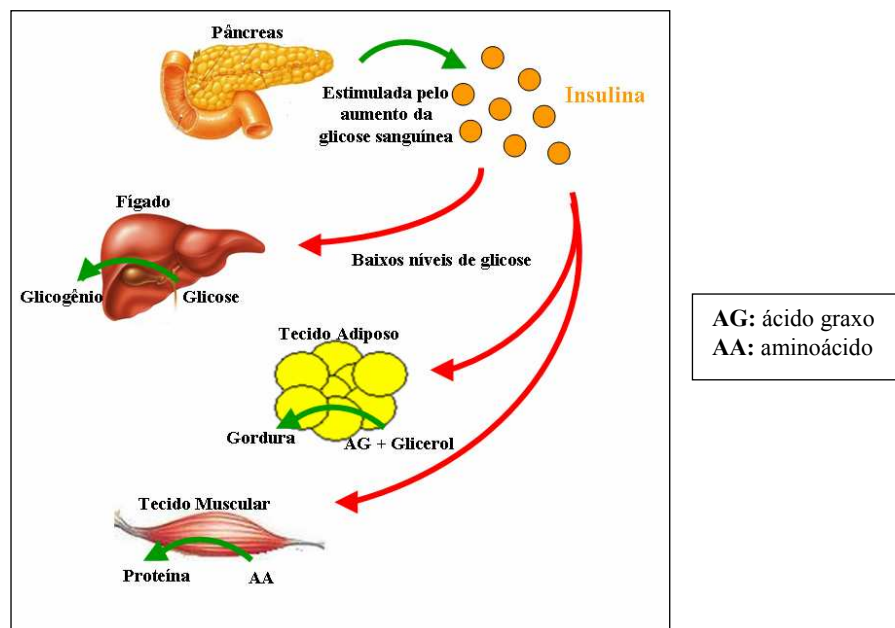
A secreção basal de insulina é constante, porém alguns estímulos provenientes de nutrientes, da atuação de neurotransmissores e de outros hormônios podem aumentar ou diminuir esses níveis (CISTERNAS, 2002). A principal rota do metabolismo da glicose é a glicólise e a subsequente oxidação do piruvato via ciclo de Krebs, fundamentais para o controle da secreção insulínica. O transporte da glicose para o interior das células do organismo é realizado por uma proteína transmembrana homóloga (HABER *et al.*, 2001). A partir da oxidação da glicose intracelular, ocorre aumento da taxa de produção de ATP/difosfato de adenosina (ADP) (em inglês, *adenosin diphosphate*), resultante da ativação da glicoquinase, que ocasiona o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP, com consequente despolarização da membrana das células β causando uma abertura no canal de cálcio para que os íons de cálcio atravessem-na. Essa melhora no aumento dos níveis de cálcio leva a uma liberação exocitótica de insulina dos grânulos de estoque.

O receptor insulínico é formado por uma subunidade α extracelular e uma subunidade β intracelular. A ligação da insulina à subunidade α estimula a atividade da tirosina quinase associada à subunidade β do receptor insulínico inserido na membrana das células, resultando na fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) (em inglês, *insulin receptor substrate-1*). Uma vez fosforilado, o IRS-1 interage com uma série de proteínas intracelulares, desencadeando uma cascata complexa de reações de fosforilação e defosforilação (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

1 Introdução

1.1.3.2 Mecanismo de ação da insulina

A insulina liga-se a receptores de afinidade específica com a membrana celular da maioria dos tecidos, como músculo, fígado e tecido adiposo, desencadeando uma série de reações em cadeia. No músculo, promove a captação de glicose e o estoque de glicogênio. No fígado, inibe a produção e liberação de glicose, bem como promove o estoque de glicogênio. E no tecido adiposo, a captação de glicose é estimulada e a liberação de ácidos graxos livres é inibida, afetando diretamente o metabolismo de lipídios, reduzindo a oxidação de gorduras, por inibir a ação da lipase hormônio-sensível, e estimulando o depósito de gorduras por ativação da lipase lipoproteica (FRIEDMAN, 1998; HOWARD, 1999) (figura 8).



Fonte: Modificado de Taubes, 2009.

Fig. 8 - Funções da insulina.

1.1.3.3 Insulina, modulação hormonal e homeostase metabólica

A insulina também atua no hipotálamo, interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome e da saciedade, sendo o NPY o principal deles. O hipotálamo possui receptores sensíveis à glicemia plasmática, que induzem a uma maior sensação de fome quando os níveis glicêmicos apresentam-se baixos (WOODS *et al.*, 1996; VOLP *et al.*, 2008).

A insulina interage com hormônios como a leptina, resultando em efeitos indiretos sobre a ingestão de alimentos (RABEN & ASTRUP, 2000). É capaz de estimular a expressão da leptina por meio da metabolização da glicose e de lipídios nesse tecido (glicólise e lipogênese) (CNOP *et al.*, 2002). Quando há diminuição da produção da leptina, ocorre supressão da função tireoidiana, em parte pela redução da produção do hormônio estimulador da tireóide no núcleo hipotalâmico paraventricular, e da expressão de fatores anorexígenos como POMC, CRH, CART, hormônio estimulador do melanócito α (α -MSH) (em inglês, *α -melanocyte stimulating hormone*) e pelo aumento da expressão de fatores orexígenos NPY e AgRP (CISTERNAS, 2002; SUVIOLAHTI *et al.*, 2003).

A insulina atua negativamente na expressão do NPY, que é sintetizado primeiramente por neurônios localizados no ARC e ativados em resposta a um balanço energético negativo (SCHWARTZ, 2001). A ativação do NPY traduz-se em ações metabólicas com depósito de gordura corporal devido a seus potentes efeitos orexígenos, promovendo, assim, a lipogênese nos tecidos hepático e adiposo. Esse aumento da expressão promove uma maior secreção de insulina e de glicocorticoides na circulação, mecanismo que contribui para uma hiperfagia compensatória como resposta a perdas de tecido adiposo (SCHWARTZ, 2001). Contrariamente aos efeitos do NPY, a insulina atua positivamente na expressão das melanocortinas como o α -MSH, que são peptídios derivados do POMC e possuem efeitos

catabólicos. Produzidas por neurônios do ARC, exercem efeitos anorexígenos que resultam na diminuição da ingestão com consequente perda de peso (SCHWARTZ, 2001). Outras substâncias cerebrais cuja expressão é estimulada pela insulina, com mesmo efeito catabólico, são o CART e o CRH que suprimem a ingestão alimentar e estimulam a lipólise e a termogênese.

Durante a perda de peso ocorre queda nos níveis de insulina e aumento da atividade das rotas catabólicas em razão do aumento dos níveis dos hormônios contrarreguladores, resultando na inibição da ingestão alimentar e aumentando o gasto energético (SCHWARTZ, 2000). Em ratos, após jejum de 48 horas, ocorre redução dos níveis plasmáticos de insulina, glicose e leptina, além da perda de peso corporal (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

Os humanos possuem dois sistemas reguladores da glicose que se sobrepõem e são ativados pela queda da glicemia: as ilhotas de Langerhans, que liberam glucagon, e os receptores no hipotálamo, que respondem em situações em que a glicemia está excepcionalmente baixa. Os glicorreceptores hipotalâmicos podem estimular a secreção de adrenalina, de cortisol e do GH. Esses hormônios contrarregulatórios têm ação contrária à da insulina, estimulando a glicogenólise, a lipólise e a neoglicogênese, favorecendo a elevação da glicemia plasmática (VOLP *et al.*, 2008).

A ingestão excessiva de alimentos gera sinais de saciedade que, através de circuitos neurais e hormonais, regularão a ingestão alimentar e o gasto energético (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Em humanos saudáveis, a insulina não aumenta proporcionalmente ao aumento da quantidade de carboidratos ingeridos (LEE *et al.*, 1998; HOLT *et al.*, 1997). Outros fatores, como trânsito gastrointestinal, liberação hormonal, viscosidade, osmolaridade, dieta habitual do indivíduo, frequência alimentar e idade, também podem exercer influência na resposta insulínica (JENKINS *et al.*, 1994; PI-SUNYER, 2002).

A resposta insulínica individual a uma determinada quantidade de carboidrato ingerido pode ser influenciada pelo nível de resistência à insulina apresentada, o qual é determinado pelo grau de adiposidade, pela genética, pelo nível de atividade física e pelo tipo de dieta ingerida (WILLET *et al.*, 2002).

Em indivíduos eutróficos, os altos níveis de insulina plasmática induzem a saciedade. Em obesos, o controle da ingestão alimentar parece ineficiente, apesar de a maior quantidade de tecido adiposo favorecer o aumento da insulinemia, que não resulta no aumento da saciedade.

Uma das explicações para o desenvolvimento da resistência periférica à insulina relaciona-se à maior ingestão de lipídios, comumente observada na dieta dos obesos. Os indivíduos com obesidade abdominal são também mais predispostos a apresentar dislipidemias (VOLP *et al.*, 2008).

1.1.3.4 Resistência à insulina

Resistência insulínica (RI) significa diminuição da capacidade da insulina endógena ou exógena de estimular a utilização celular de glicose devido aos defeitos nos mecanismos pós-receptores envolvidos em sua utilização ou à deficiência no receptor insulínico (WALKER, 1995). A RI estabelece um ciclo vicioso: o tecido não responde à insulina, o pâncreas compensa secretando ainda mais insulina e gradualmente o tecido se torna ainda mais resistente.

A RI pode ser medida pelo modelo de avaliação da homeostase-resistência à insulina (HOMA-IR) (em inglês, *homeostasis model assessment-insulin resistance*). Huang *et al.* (2002) validaram um índice de HOMA para identificação da RI em crianças pré-púberes,

utilizando a fórmula: $\text{HOMA-IR} = \text{Insulina } (\mu \text{ mU/l}) \times \text{Glicemia de jejum (mmol/l)} / 22,5$. O critério para diagnóstico da RI são valores de HOMA-IR acima do percentil 90. Até o momento, não há uma equação validada que contemple a determinação do HOMA-IR para crianças e adolescentes de acordo com sexo e idade, em virtude disso o HOMA-IR não foi realizado neste estudo.

Soares & Moreira (2008) identificaram indicadores metabólicos (insulinemia, glicemia e trigliceridemia) e antropométricos (% de gordura, IMC, medida da cintura quadril, índice de conicidade) que podem ter um bom poder de predição da RI em crianças de sete a 11 anos a partir de apenas uma medida. A insulinemia demonstrou o melhor poder de predição, sensibilidade e especificidade quando comparada aos outros indicadores. E os índices antropométricos também mostraram significativo poder de predição da RI.

1.1.4 Moduladores da homeostase energética

A reserva de energia corporal é ativamente controlada por sistemas complexos que regulam a fome e o apetite, a divisão dos substratos e o gasto energético. Várias substâncias estão envolvidas no balanço energético. A regulação neuroendócrina da ingestão alimentar consiste em uma interação entre impulsos gerados nos neurônios do SNC e hormônios produzidos no tecido adiposo e no sistema digestório.

1.1.5 Antropometria

Antropometria é a técnica não invasiva mais aplicada universalmente para avaliar o estado nutricional. Em auxologia, o termo padrão significa que a curva utilizada refere-se a um crescimento esperado, enquanto que referência diz respeito a curvas que mostrem o padrão das crianças selecionadas para as mesmas, e nenhuma avaliação de dados é imposta contra o crescimento. Apesar da diferença, os termos padrão e referência frequentemente são utilizados como sinônimos (FRISANCHO, 2008).

Em razão da praticidade e do baixo custo, a avaliação do estado nutricional de crianças e adolescentes é realizada frequentemente levando em consideração o peso e a estatura, sendo complementada por medidas de dobras cutâneas e circunferências com o intuito de aumentar a acurácia da medida.

Um dos primeiros estudos de que se tem notícia de curva de crescimento é o de Montbeillard, no século 18, que registrou a estatura de seu filho até a idade de 18 anos e que é uma das mais conhecidas ilustrações da auxologia humana. Há outro trabalho sobre crescimento dessa mesma época quando havia uma verdadeira obsessão por altura no exército, sendo os mais altos considerados melhores para lutar. Goethe também descreveu a medida da altura na parede, com um aparelho similar a um antropômetro, na seleção de soldados. São também do século 18 um estudo longitudinal conduzido com alunos da instituição Calschule no período de 1772 a 1794 e um trabalho descoberto nos arquivos da marinha do Reino Unido com dados de altura de meninos (TANNER *et al.*, 1981).

No século 19, os trabalhos começaram a ser publicados e foram estabelecidas as primeiras relações entre nutrição e crescimento. No final desse século, Saint-Hilaire descreveu distúrbios de crescimento: nanismo, gigantismo, puberdade precoce e anomalias congênitas (TANNER *et al.*, 1981).

O século 20 foi marcado pelo trabalho de Tanner, que, na década de 1950, iniciou uma série de pesquisas sobre crescimento, velocidade de crescimento e puberdade. Até hoje os gráficos e métodos criados por ele são utilizados como padrão e, transcorridos mais de cinquenta anos, não são considerados ultrapassados, o que prova o quanto Tanner estava à frente de seu tempo (TANNER *et al.*, 1981).

Entre 1929 e 1975, foram coletados dados transversais de crianças de zero a 23 meses pelo *Ohio Fels Research Institute* e, entre 1960 e 1975, dados transversais de crianças e adolescentes de dois a 18 anos pelo *National Health and Nutritional Examination Surveys* (NHANES), os quais passaram a ser conhecidos como curvas de “referência NCHS”. Em 1975, a Organização Mundial de Saúde (OMS) formou um grupo de especialistas para deliberar sobre o uso de curvas de crescimento. Como não havia nenhum conjunto de dados que preenchesse critérios ideais, foram recomendadas para uso internacional as curvas NCHS, passando então a ser denominada referência NCHS-OMS (WHO, 1978).

Em 1993, a OMS formou um novo grupo para avaliar as frequente críticas à referência NCHS-OMS, bem como avaliar as medidas antropométricas desde sua nomenclatura até sua aplicação (WHO, 1994). Concluiu-se que novas abordagens seriam necessárias e a conduta deveria aproximar-se mais de um padrão do que uma referência, significando que deveria ser produzido um novo conjunto de dados para evidenciar como as crianças deveriam crescer. Em 1995, um novo grupo foi formado para desenvolver um protocolo de desenvolvimento das novas curvas, tendo sido realizada coleta de dados em cinco países, com avaliação longitudinal (zero a 24 meses) e transversal (25 a 71 meses). Os novos padrões definem aleitamento materno como ideal para o crescimento e desenvolvimento infantil, o que certamente levará a uma identificação precoce de crianças com sobrepeso.

O crescimento é considerado o aumento do tamanho corporal. Pode-se dizer que o crescimento do ser humano é um processo dinâmico e contínuo que ocorre desde a concepção

até o final da vida, levando-se em conta os fenômenos de substituição e regeneração de tecidos e órgãos. Também é tido como um dos melhores indicadores de saúde da criança, refletindo suas condições de vida, no passado e no presente. O crescimento possui fatores intrínsecos (genéticos, metabólicos e malformações) e fatores extrínsecos (alimentação, saúde, higiene, habitação e cuidados gerais). As condições em que ocorre o desenvolvimento da criança (fatores extrínsecos) vão determinar se ela poderá atingir seu potencial máximo de crescimento, determinado por sua carga genética. A avaliação periódica do crescimento permite a identificação de possíveis doenças e com isso uma rápida intervenção, no sentido de impedir que o crescimento da criança seja afetado.

- **O sistema de escore-z ou desvio padrão (DP)**

O escore-z expressa os valores antropométricos em números de DP ou escore-z abaixo ou acima da média ou mediana de referência. Um valor fixo de escore-z em determinada faixa de tempo implica estatura e/ou peso fixos para crianças de uma determinada idade, ou seja, não está havendo o crescimento esperado.

- **O sistema de percentis**

O percentil refere a posição de um indivíduo a uma referência dada. A faixa de percentil 25 significa que até 25% dos indivíduos da referência estão com os dados nessa faixa. O percentil 50 representa a mediana e compreende até 50% da população de referência. O percentil 75 indica que 75% dessa população encontram-se nessa faixa, e assim sucessivamente. Logo, os percentis 5 e 95 referem o intervalo de confiança de uma distribuição considerando um P de 0,05. Os valores em percentis são comumente utilizados pela simplicidade de sua interpretação. A falta de mudança em valores de percentis próximos

aos extremos da distribuição de referência, quando na realidade ocorre uma mudança substancial na classificação de peso e/ou estatura, representa uma desvantagem do sistema.

1.1.5.1 Indicadores de crescimento

- **Estatura para a idade**

Estatura para a idade refere-se a um crescimento linear adequado em uma determinada idade. Esse indicador ajuda a identificar se a criança apresenta baixa estatura devido a um processo prolongado de desnutrição ou a episódios repetidos de doença. Crianças altas também podem ser identificadas, o que raramente é problema, exceto na presença de doenças endócrinas.

- **Peso para a idade**

Peso para a idade reflete massa corporal relativa à idade cronológica. Esse indicador pode ser utilizado para avaliar se a criança apresenta baixo peso ou baixo peso grave, mas não pode ser utilizado para avaliar sobrepeso e obesidade. É influenciado pela estatura da criança, e sua interpretação é mais complexa.

- **Peso para estatura**

Peso para a estatura refere-se ao peso corporal relacionado ao crescimento linear da criança. Esse indicador avalia a proporcionalidade da criança, ou seja, uma criança pode apresentar baixa estatura por razões genéticas ou por doenças sem ser desnutrida.

- **IMC para a idade (IMC/idade)**

O IMC/idade (kg/m^2) também conhecido como índice de Quetelet, é a medida que expressa o peso (kg) por metro quadrado (m^2) de estatura em determinada idade. Em geral esse índice está relacionado com a gordura corporal, motivo pelo qual é especialmente útil

para avaliar sobrepeso e obesidade. Em alguns casos, o excesso de massa muscular pode levar a um aumento do IMC/idade sem indicar sobrepeso; nessas situações devem-se associar outros indicadores para uma avaliação correta (FRISANCHO, 2008).

- **Circunferência do braço para a idade**

A medida da circunferência do braço representa o perímetro ocupado pelos tecidos ósseos e musculares acrescidos do tecido adiposo. É um indicador que pode ser utilizado em associação ou não com as dobras cutâneas.

- **Dobras cutâneas**

As dobras cutâneas são medidas de adiposidade que permitem avaliar a composição corporal. A gordura subcutânea constitui grande parte da gordura corporal e tem composição variada em função da idade, do sexo e do grau de adiposidade. Para discriminar de forma mais adequada a composição corporal, necessária para a definição do estado nutricional, podem-se utilizar outros indicadores antropométricos, como as dobras cutâneas tricipital, subescapular, suprailíaca e abdominal. Em crianças e adolescentes, as mais utilizadas são a tricipital e a subescapular.

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Grelina e leptina são hormônios-chave na regulação do apetite e da ingestão alimentar. Existem trabalhos que descreveram a concentração destes hormônios em crianças, mas que utilizaram amostras heterogêneas no que se refere ao estado nutricional (IÑIGUES *et al.*, 2002; WHATMORE *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2003; VISO GONZÁLEZ *et al.*, 2005, PARK *et al.*, 2005; CAMURDAN *et al.*, 2006; SAVINO *et al.*, 2006). A uniformidade da amostra aqui analisada, que considerou os parâmetros atuais de eutrofia, difere das demais pesquisas por dosar conjuntamente grelina total, grelina acilada, leptina, insulina e glicose.

A importância deste estudo deve-se principalmente aos critérios com que foi selecionada a amostra, estando sua relevância relacionada à formação de uma base de dados para futuras comparações com crianças portadoras de distúrbios alimentares ou alteração do apetite.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concentração de grelina total, grelina acilada, grelina desacilada, leptina, insulina e glicose em crianças eutróficas e híginas.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar a eventual relação entre dados obtidos na análise da concentração de grelina total, grelina acilada, grelina desacilada, leptina, insulina e glicose com:

- Faixas etárias.
- Sexo.
- Tempo de jejum.
- Índices antropométricos.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

Foi realizado um estudo transversal prospectivo, considerando-se como fatores em estudo a idade, o sexo e os parâmetros antropométricos. Os desfechos analisados foram as concentrações de grelina total, grelina acilada, grelina desacilada, leptina, insulina e glicose.

4.2 POPULAÇÃO

A população constituiu-se de crianças de quatro meses a 10 anos, classificadas como eutróficas de acordo com o padrão da OMS 2006 e 2007 (WHO 2006; WHO 2007), com coleta de sangue programada para revisões de saúde ou procedimentos cirúrgicos ambulatoriais de pequeno porte, agendadas nos laboratórios do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Durante o período de coleta, 753 crianças foram triadas, das quais 180 foram encaminhadas para coleta de sangue. Após a segunda avaliação, 118 integraram o estudo, conforme o fluxograma a seguir (figura 9).

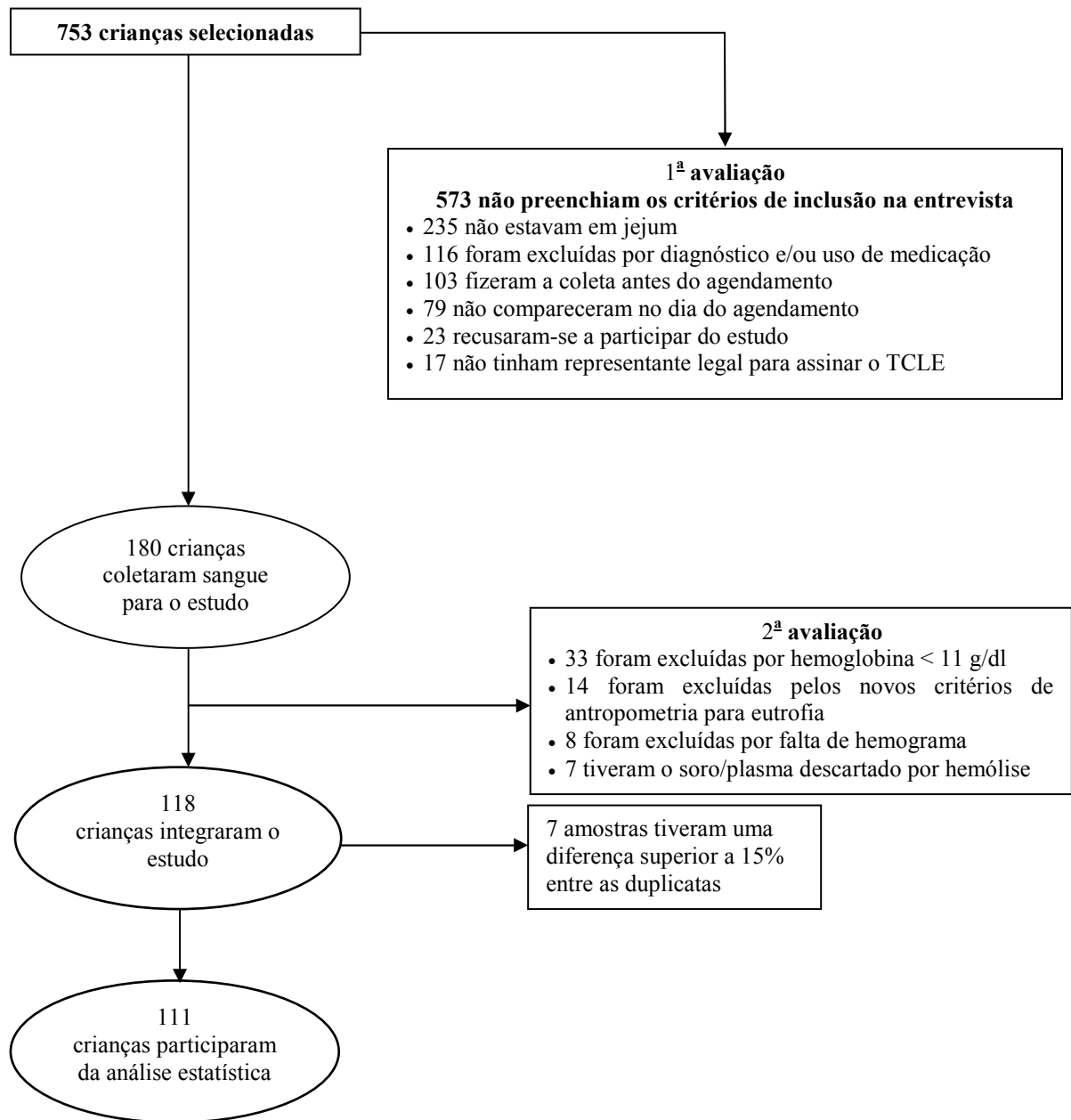


Fig. 9 - Fluxograma de triagem.

4.3 AMOSTRA

4.3.1 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base nos estudos de WHATMORE *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2003; BELLONE *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2005; VISO GONZÁLEZ *et al.*, 2006 e IÑIGUEZ *et al.*, 2006, que investigaram os níveis plasmáticos de grelina, leptina, insulina e glicose por métodos diversificados. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa PEPI (*Programs for Epidemiologists*) versão 4.0. Para que fosse possível estimar a média de grelina com uma margem de erro de 12 pg/ml e desvio-padrão (DP) de 63, a de leptina com 0,5 ng/dl e DP de 2,6, a de insulina com 1,0 μ U/ml e DP de 5,0 e a de glicose de 0,5 mg/dl com DP de 2,5, considerando-se um nível de confiança de 95%, foram necessárias amostras de 110, 107, 97 e 97 crianças respectivamente.

4.3.2 Critérios de inclusão

Os critérios de elegibilidade para o estudo foram os seguintes:

- Crianças de quatro meses a 10 anos, eutróficas, hígdas e com solicitação de coleta de sangue nos laboratórios do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Jejum mínimo de três horas e máximo de 14 horas.

4 Pacientes e Métodos

4.3.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram:

- Idade gestacional < 37 semanas para crianças com até dois anos de idade.
- Idade gestacional < 28 semanas e/ou abaixo 1.000 g de peso, para crianças com até três anos de idade.
- Utilização de medicação à exceção de sulfato ferroso e polivitamínico em doses profiláticas.
- Dieta para perda de peso nos últimos 30 dias.
- Processo infeccioso nos últimos sete dias.
- Impossibilidade de realização da avaliação antropométrica.

4.3.4 Coleta de dados

Os dados foram obtidos no período compreendido entre dezembro de 2006 e maio de 2009. A coleta de sangue foi solicitada por um dos serviços de Pediatria, Puericultura ou Cirurgia.

4.4 VARIÁVEIS ESTUDADAS

Idade: foi registrada em meses e anos, através da diferença entre a data da entrevista e a data de nascimento.

Sexo: masculino ou feminino.

Idade gestacional (semanas), peso ao nascimento (g) e comprimento ao nascimento (cm): foram verificados no prontuário *on line* ou no cartão da criança do Ministério da Saúde.

Grupo racial: as crianças foram consideradas caucasoides e não caucasoides.

Hemoglobina (g/dl) e hematócrito (%): foram verificados nos exames de rotina. Quando não solicitado hemograma, a hemoglobina e o hematócrito foram verificados no prontuário *on line* com validade máxima de três meses prévios à coleta.

Tempo de jejum (minutos): durante a entrevista, após certificar-se de que a criança não havia ingerido nenhum tipo de alimento líquido ou sólido, foi solicitado ao responsável que informasse o horário da última ingestão de alimento, considerada como última refeição. Foi realizada a subtração do horário da coleta com o da última refeição.

Medicação: como a amostra engloba uma faixa etária na qual são amplamente utilizados sulfato ferroso e complexo vitamínico em doses profiláticas, foram consideradas quatro categorias de uso de medicação: nenhuma medicação, sulfato ferroso, complexo vitamínico e sulfato ferroso associado a complexo vitamínico.

Peso (g): foi medido, com as crianças sem roupa, em balança eletrônica de marca Filizola[®] com carga máxima de 16 kg e variação de 10g para crianças até 24 meses. Para as crianças acima de dois anos foi utilizada balança de marca Filizola[®] de uso hospitalar com carga máxima de 120 kg.

Estatura (cm): crianças com até 24 meses de idade foram medidas em decúbito dorsal, em uma prancha com lâmina de madeira fixa de um lado e móvel do outro (topo da cabeça na parte fixa), sendo a parte móvel colocada de modo a ficar paralela aos pés da criança, e o comprimento, estabelecido através da mensuração com uma régua fixada na prancha. As crianças com mais de dois anos foram medidas na posição vertical com régua antropométrica graduada em centímetros fixa na parede e cursor móvel.

Índice de massa corporal (kg/m²): o IMC foi calculado dividindo-se o peso pela altura elevada ao quadrado.

Circunferência braquial (CB) (cm): a CB foi medida com fita métrica em fibra de vidro flexível e retrátil, circundando a porção média do braço não dominante, estando o braço relaxado. As medidas foram feitas com precisão de 0,1 mm.

Dobra cutânea tricipital (DCT) (mm): a espessura da DCT foi medida em triplicata e feita a média das mensurações da face posterior do braço não dominante, paralelamente ao eixo longitudinal, no ponto que compreende a metade da distância entre a borda superolateral do acrômio e o olécrano (COSTA, 2001), com a utilização de adipômetro científico, marca Cescorf[®].

Dobra cutânea subescapular (DCS) (mm): a espessura da DCS foi medida em triplicata, realizada a média das mensurações, com os braços relaxados ao longo do corpo, obliquamente em relação ao eixo longitudinal, seguindo a orientação dos arcos costais, localizada a dois centímetros abaixo do ângulo inferior da escápula (COSTA, 2001), utilizando-se um adipômetro científico, marca Cescorf[®].

Dosagem de grelina (pg/ml): para a coleta e armazenamento do sangue para determinar a concentração de grelina, os tubos para coleta foram previamente preparados e esterilizados. Devido à instabilidade desse hormônio, foram utilizados 50 µl de aprotinina e 15 µl de EDTA-2Na por mililitro de sangue como inibidores de proteases.

Dosagem de leptina (ng/ml), insulina (µU/ml) e glicose (mg/dl): para a coleta e armazenamento do sangue para determinar a concentração de leptina, insulina e glicose, os tubos foram previamente esterilizados.

4.5 LOGÍSTICA

Diariamente, pela manhã e à tarde, a pesquisadora responsável ou nutricionista treinada realizava uma pesquisa eletrônica nas agendas do laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para identificar as coletas de sangue programadas de crianças que preenchessem os critérios de inclusão. Após a identificação, cada prontuário era pesquisado *on line*, para confirmar o motivo da solicitação do exame e o histórico clínico (dados perinatais, presença de doença, uso de medicações, acompanhamento nutricional, entre outros). A partir dos dados obtidos, eram elaboradas listas diárias das coletas programadas para o turno da manhã, com sala e horários de agendamento.

Pela manhã, a pesquisadora responsável aguardava no laboratório a chegada das crianças pré-selecionadas, momento em que era realizada uma abordagem explicativa do trabalho aos pais e/ou responsáveis, seguida de uma entrevista para confirmar a elegibilidade e a aceitação em participar do estudo.

Na primeira avaliação, após ratificação dos critérios de inclusão e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO 1) pelos pais e/ou responsáveis, era preenchida uma ficha (ANEXO 2) com a avaliação clínica e os dados obtidos no prontuário. Imediatamente a seguir, as crianças eram submetidas à avaliação antropométrica, realizada pela pesquisadora responsável. Após avaliadas, as crianças eram encaminhadas à sala de coleta para realização do exame solicitado e os da pesquisa. Coletava-se sangue venoso no período da manhã. Após a coleta para os exames de rotina, o sangue restante era colocado nos tubos específicos para obtenção de soro (leptina, insulina e glicose) e plasma (grelina), conforme protocolos em anexos (ANEXOS 3 e 4). As amostras eram transportadas até o Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG) em caixa térmica refrigerada. Ao chegar ao LEHG, as amostras para obtenção de plasma (grelina) eram

4 Pacientes e Métodos

imediatamente centrifugadas (centrífuga refrigerada da marca Sigma[®] Laboratory Centrifuges 3k30) a 3.000 rpm em temperatura de 4° C por 10 minutos. A seguir, o plasma era pipetado para microtubo devidamente identificado. Adicionavam-se 10% de ácido clorídrico (HCl), na concentração de 0,1 molar/ml por mililitro de plasma coletado e procedia-se à homogeneização do plasma no agitador de tubos (marca Phoenix[®] Ap 56) e armazenava-se o material em freezer a -80° C. A amostra para obtenção de soro (leptina, insulina e glicose) permanecia em temperatura ambiente por 45 minutos. Após, centrifugava-se a amostra a 3.000 rpm em uma temperatura de 4° C por 15 minutos. O soro era pipetado para microtubo devidamente identificado e então armazenado em freezer a -80° C.

Na segunda avaliação, o resultado dos exames de rotina era verificado no prontuário *on line*. Todas as crianças com valor de hemoglobina inferior a 11 g/dl, que não possuíam hemograma com data prévia de no máximo três meses ou que não realizaram esse exame, foram excluídas. Todas as amostras de plasma ou de soro que apresentavam hemólise durante o preparo foram imediatamente descartadas. Durante o período de coleta de amostras, a OMS (WHO, 2007) alterou o ponto de corte de eutrofia das crianças acima de cinco anos do escore-z de -2,00 e +2,00 para -2,00 e +1,00. As crianças que já haviam sido incluídas e encontravam-se nessa faixa (-2,00 e +2,00) foram excluídas. Assim, nesta etapa foi excluído um total de 62 crianças.

4.6 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

4.6.1 Crianças de zero a cinco anos

Na avaliação dos dados antropométricos das crianças de zero a cinco anos foi utilizado o *software WHO Antro*, 2009, determinando os percentis e escore-z para as relações estatura

4 Pacientes e Métodos

para idade (E/I), índice de massa corporal para idade (IMC/I), circunferência do braço para idade (CB/I), dobra cutânea tricipital para idade (DCT/I) e dobra cutânea subescapular para idade (DCS/I). Para classificação do estado nutricional foi adotado o padrão da OMS, 2006, comparando os índices de E/I e IMC/I, confirmados pela CB/I, DCT/I e DCS/I. A eutrofia foi definida a partir do ponto de corte do escore-z -2,00 e +2,00.

4.6.2 Crianças com mais de cinco anos

Na análise de dados das crianças acima de cinco anos foi utilizado o *software WHO Anthro Plus*, 2009, tendo sido calculados os percentis e o escore-z para as relações E/I e IMC/I. Os dados de CB/I, DCT/I e DCS/I foram avaliados pelo programa Frisancho, 2008 (FRISANCHO 2008). Para classificação do estado nutricional foi adotado o padrão da OMS, 2007, comparando os índices de E/I e IMC/I, confirmados pela CB/I, DCT/I e DCS/I. A eutrofia foi definida a partir do ponto de corte do escore-z -2,00 e +2,00 para E/I e -1,00 e +2,00 para os demais parâmetros antropométricos (figura 10).

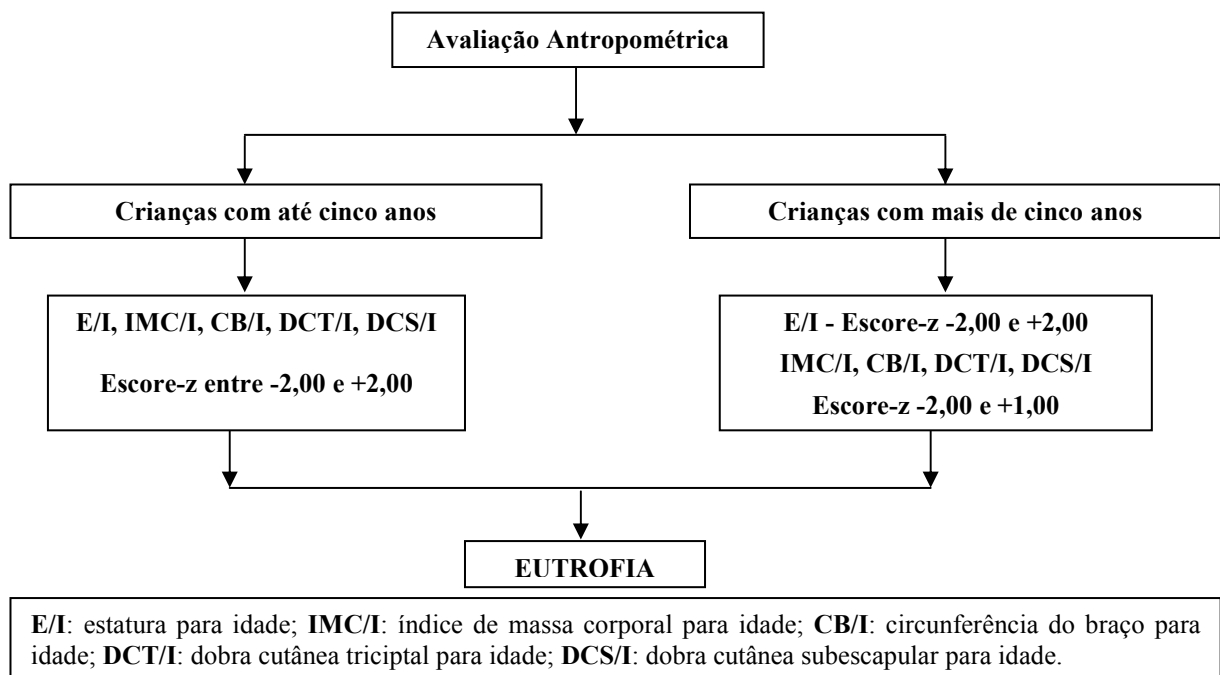


Fig. 10 - Avaliação antropométrica.

4.7 ANÁLISE DOS HORMÔNIOS E DA GLICOSE

A análise da concentração dos hormônios foi realizada no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela pesquisadora responsável e por um pesquisador biólogo, pelo método ELISA, específico para cada hormônio.

O ensaio imunoenzimático ELISA (em inglês, *enzyme linked immunosorbent assay*) foi proposto em 1971 (ENGVALL *et al.*, 1971; VAN WEEMEN & SCHUURS, 1971). A técnica utiliza enzimas ligadas a antígenos ou anticorpos para detecção de anticorpos ou antígenos, respectivamente. Sua adaptação para o uso em placas de microtitulação foi descrita em 1976 e possibilitou seu uso com menores volumes de reagentes, mais estáveis e mais econômicos (VOLLER *et al.*, 1978).

Na técnica ELISA para detecção de anticorpo, o antígeno é adsorvido a uma placa de poliestireno ou polipropileno e a amostra a ser investigada é aí incubada. Lava-se, em seguida, para eliminar o excesso de elementos do soro que não tenham reagido com o antígeno (WHO, 1976). Na operação seguinte, a antiglobulina (anti-humana, se for o caso de paciente) ligada à enzima (uma peroxidase ou fosfatase, por exemplo) é incubada no mesmo lugar da placa (WHO, 1976). Se, na primeira fase do teste, tiver havido formação de imunocomplexo, a antiglobulina será fixada a ele e aí permanecerá depois de nova lavagem do suporte. Adiciona-se, então, o substrato da enzima para que se produza a hidrólise e o fenômeno visível apareça (mudança de cor, por exemplo), indicando um resultado positivo para a pesquisa de anticorpos específicos no soro do paciente (WHO, 1976).

Para a detecção de antígeno, o anticorpo é adsorvido ao suporte e depois lavado, para a remoção do excesso. A amostra onde deverá encontrar-se o antígeno é colocada e incubada. Realiza-se uma nova lavagem e adiciona-se o soro contendo anticorpo específico ligado à

4 Pacientes e Métodos

enzima e incubava-se. Lava-se. Ao juntar-se o substrato, a reação positiva se manifestará, caso haja antígeno na amostra (WHO, 1976).

- **Grelina total (pg/ml)** – Foi utilizado o *kit* comercial *Human Ghrelin (Total) ELISA Kit* (Linco ResearchTM, St Charles – MI, USA). Seguiu-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 5).
- **Grelina acilada (pg/ml)** – Foi utilizado o *kit* comercial *Human Ghrelin (Active) ELISA Kit* (Linco ResearchTM, St Charles – MI, USA). Seguiu-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 6).
- **Grelina desacilada (pg/ml)** – Foi realizada a subtração entre a grelina total e a grelina acilada (ANEXO 7).
- **Leptina (ng/ml)** – Foi utilizado o *kit* comercial *Human Leptin ELISA Kit* (Linco ResearchTM, St Charles – MI, USA). Seguiu-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 8).
- **Insulina (μU/ml)** – Foi utilizado o *kit* comercial *Active Insulin ELISA Kit* (DSL-Diagnostic Systems Laboratories, Inc, Webster-TX, USA). Seguiu-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 9).
- **Glicose (mg/dl)** – Foi utilizado o *kit* comercial GlicosePAP liquiform[®] (marca Labtest Diagnóstica – Minas Gerais, BR). Seguiu-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 10).

4.8 EQUIPE DE TRABALHO

A equipe de trabalho foi composta de uma nutricionista pesquisadora, duas nutricionistas clínicas, um biólogo e dois biomédicos. Foi realizado um treinamento para a

padronização das técnicas de laboratório visando a uniformização dos métodos.

A avaliação antropométrica foi realizada pelas nutricionistas, todas com prática clínica.

4.9 RESPONSABILIDADE NA PESQUISA

A pesquisadora foi responsável pelo contato com os participantes do estudo e pela avaliação antropométrica. A preparação do plasma e do soro foi feita pela própria pesquisadora e/ou por um membro da equipe previamente treinado, tendo lugar no LEHG do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A análise das amostras de plasma para determinação da concentração de leptina, insulina, glicose, grelina total e grelina acilada foi supervisionada pelo biólogo Rafael Lucyck Maurer, do LEHG. Os demais exames bioquímicos foram realizados conforme as rotinas dos laboratórios do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Durante o estudo, não houve interferência quanto à coleta de sangue das crianças. Para participar do estudo, todos assinaram o TCLE (ANEXO 1).

O projeto de pesquisa elaborado para o desenvolvimento deste estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, conforme consta na Resolução do Projeto nº 06-458. A dosagem de insulina e glicose foi realizada após aprovação de emenda no projeto pelo

GPPG do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, conforme previsto no TCLE.

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes sobre pesquisas envolvendo seres humanos, estabelecida pela Resolução nº 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996).

4.11 ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizada dupla digitação para assegurar melhor qualidade dos dados armazenados com a utilização do programa Microsoft Excel, versão 2003. O programa utilizado para análise estatística foi o SPSS (em inglês, *Statistical Package for the Social Sciences*), versão 16.0 (Chicago, IL).

As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico (percentis 25 e 75), conforme apresentassem ou não distribuição normal. A normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis categóricas foram utilizadas as frequências absolutas (n) e relativas (%).

Para a comparação das variáveis assimétricas foram empregados os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. As variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo teste *t* de Student e pela Análise de Variâncias (ANOVA).

As associações entre as variáveis contínuas foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson ou de Spearman, conforme a distribuição apresentada (simétrica ou assimétrica).

4 Pacientes e Métodos

As variáveis que obtiveram valores de $P < 0,20$ nas análises realizadas foram incluídas no modelo de regressão linear múltipla para cada um dos desfechos, sendo que, para aqueles que não apresentavam distribuição normal, foi adotada a transformação logarítmica total. O método de estimação do modelo foi o de *stepwise*.

Foram construídas curvas dos desfechos em relação às faixas etárias e utilizados os percentis 3, 25, 50, 75 e 97.

O nível de significância adotado foi de 0,05.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Foram selecionadas para o estudo 118 crianças conforme os critérios de inclusão. Destas, sete foram excluídas por haver uma diferença superior a 15% entre os valores dosados das duplicatas, permanecendo 111 crianças para análise final.

Na tabela 3, são descritas as características gerais das crianças que foram incluídas no estudo. As faixas etárias foram divididas de forma a contemplar o período recomendado de aleitamento materno (zero a dois anos) e as divisões dos programas de avaliação antropométrica utilizados (até cinco anos e acima de cinco anos).

Tabela 3 - Caracterização da amostra

Variáveis	n = 111
Idade (meses)	60,0 (35,0 – 91,0)
Faixa etária (meses)	
≤ 24	20 (18,0)
25 – 60	37 (33,3)
> 60	54 (48,6)
Sexo	
Masculino	59 (53,2)
Feminino	52 (46,8)
Indicação da coleta de sangue	
Revisão puericultura	64 (57,7)
Cirurgia eletiva	47 (42,3)
Jejum (minutos)	240 (200 – 605)
Hemoglobina (g/dl)	12,2 ± 0,7
Hematócrito (%) – n = 110	36,7 ± 2,1

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, mediana (P25 - P75) ou número absoluto (%) quando indicado.

5 Resultados

A idade mínima foi de 4 meses e a máxima de 128 meses. Entre as crianças avaliadas, 71,2% eram caucasoides.

A mediana de jejum antes da coleta foi de quatro horas, sendo a variação mínima três horas e a máxima 14 horas, de forma a contemplar um tempo mínimo para estabilização da grelina basal (180 minutos) ou o tempo necessário para coleta de sangue para exames de indicação clínica.

5.1 DOSAGENS DOS HORMÔNIOS E GLICOSE NO GRUPO

As concentrações plasmáticas de grelina e os demais valores séricos encontrados nas dosagens do grupo estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4 - Dosagem de hormônios e glicose

Variáveis	n = 111
Grelina (pg/ml)	
Total	1374 (949 – 1875)
Acilada	288 (212 – 450)
Acilada %	24,5 ± 7,9
Desacilada ^(*)	1086 (711 – 1393)
Desacilada %	75,5 ± 7,9
Leptina (ng/ml)	1,53 (1,11 – 2,77)
Insulina (μU/ml)	15,5 (12,1 – 23,5)
Glicose (mg/dl)	88,6 ± 13,1

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ou mediana (P25 - P75).

^(*) Calculada a partir da subtração da grelina total pela grelina acilada.

5 Resultados

Os valores mínimo e máximo para grelina total, grelina acilada e grelina desacilada encontrados foram de 346 a 3.479, de 71 a 1.098, e de 227 a 2.757 pg/ml, respectivamente. Entre os valores de grelina total circulante, determinou-se que, em média, 75,5% era desacilada e 24,5% acilada.

Os valores mínimo e máximo para leptina e insulina descritos foram de 0,1 a 9,1 ng/ml e de 5,0 a 45,0 μ U/ml, respectivamente.

A glicose apresentou valores mínimo e máximo de 70 a 130 mg/dl.

5.2 DOSAGEM DE HORMÔNIOS E GLICOSE POR FAIXA ETÁRIA E SEXO

A tabela 5 apresenta os valores de grelina total, grelina acilada, grelina desacilada, leptina, insulina e glicose por faixa etária.

Tabela 5 - Dosagem de hormônios e glicose por faixa etária

Variáveis	0 – 24 meses (n = 20)	25 – 60 meses (n = 37)	> 60 meses (n = 54)	P
Grelina (pg/ml)				
Total	1919 (1357-2219) ^b	1450 (1095-2092) ^b	1153 (852-1525) ^a	< 0,001 ^(†)
Acilada	304 (269-697) ^b	349 (201-543) ^b	273 (184-367) ^a	0,047 ^(†)
Desacilada ^(*)	1487 (1043-1713) ^b	1173 (827-1638) ^b	904 (624-1143) ^a	< 0,001 ^(†)
Leptina (ng/ml)	1,48 (0,93-2,34)	1,50 (1,23-2,38)	1,99 (1,11-3,52)	0,443 ^(†)
Insulina (μU/ml)	18,1 (13,5-28,6)	17,6 (11,0-23,3)	14,1 (10,3-20,3)	0,399 ^(†)
Glicose (mg/dl)	85,8 \pm 9,9	88,0 \pm 14,3	90,2 \pm 13,2	0,153 ^(††)

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão ou mediana (P25 to P75).

^(*) Calculada a partir da subtração da grelina total pela grelina acilada; ^(†) Teste de Kruskal-Wallis; ^(††) ANOVA-oneway.

^{a, b}. Letras iguais não diferem pelo teste de Mann-Whitney.

5 Resultados

As concentrações de grelina total, acilada e desacilada foram significativamente menores na faixa etária acima de 60 meses.

Não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem de insulina e leptina entre as diferentes faixas etárias.

A tabela 6 apresenta a comparação dos hormônios entre as faixas etárias em ambos os sexos.

Tabela 6 - Dosagens entre as faixas etárias e por sexo

Variáveis	0 – 24 meses	25 – 60 meses	> 60 meses	P
MASCULINO	n = 10	n = 22	n = 27	
Grelina (pg/ml)				
Total	1950 (1576-2922) ^b	1432 (1000-2078) ^{a,b}	1155 (795-1551) ^a	0,007^(†)
Acilada	322 (275-735)	313 (185-617)	280 (179-421)	0,288 ^(†)
Desacilada ^(*)	1649 (1241-2145) ^b	1192 (792-1687) ^{a,b}	913 (515-1231) ^a	0,003^(†)
Leptina (ng/ml)	2,15 (0,93-2,64)	1,50 (1,16-1,63)	1,33 (0,91-2,53)	0,657 ^(†)
Insulina (μU/ml)	23,5 (13,5-33,8)	17,6 (10,4-24,1)	13,5 (5,0-20,6)	0,112 ^(†)
Glicose (mg/dl)	87 ± 7,9	86,2 ± 14,4	92,6 ± 15,2	0,262 ^(††)
FEMININO	n = 10	n = 15	n = 27	
Grelina (pg/ml)				
Total	1587 (1003-2167) ^b	1540 (1184-2160) ^b	1133 (897-1402) ^a	0,021^(†)
Acilada	304 (246-652)	392 (222-523)	272 (185-336)	0,112 ^(†)
Desacilada ^(*)	1343 (780-1609) ^b	1173 (983-1638) ^b	900 (645-1138) ^a	0,013^(†)
Leptina (ng/ml)	1,37 (0,90-2,15) ^a	2,34 (1,21-3,32) ^{a,b}	2,77 (1,31-4,79) ^b	0,039^(†)
Insulina (μU/ml)	16,5 (12,3-21,4)	17,7 (13,4-21,1)	14,1 (12,1-19,8)	0,359 ^(†)
Glicose (mg/dl)	84,1 ± 11,8	90,7 ± 14,1	87,7 ± 10,7	0,411 ^(††)

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, mediana (P25 - P75) e número absoluto (%) quando indicado. ^(†) Teste de Kruskal-Wallis; ^(††) ANOVA-oneway.

^{a, b} Letras iguais não diferem pelo teste de Mann-Whitney.

5 Resultados

Não houve diferença na grelina total e desacilada entre os sexos. Nas meninas, a leptina foi estatisticamente menor nas crianças com menos de dois anos somente quando comparadas com mais de 60 meses.

A leptina foi maior nas meninas na faixa etária acima de cinco anos [2,77 (1,31-4,79) ng/ml *versus* 1,33 (0,91-2,53) ng/ml, $P=0,006$]. As dosagens de grelina total, grelina acilada, grelina desacilada, insulina e glicose não apresentaram diferença significativa entre os sexos.

5.3 ASSOCIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE GRELINA

A tabela 7 apresenta as associações entre as dosagens de grelina total, grelina acilada e grelina desacilada com o escore-z das variáveis antropométricas e idade.

Tabela 7 - Correlações entre as dosagens de grelina, variáveis antropométricas e idade

Variáveis	Idade (n = 111)	IMC/I-Z (n = 111)	E/I-Z (n = 111)	CB/I-Z (n = 111)	DCT/I-Z (n = 111)	DCS/I-Z (n = 111)
	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)
Grelina						
Total	-0,475 (< 0,001)	-0,022 (0,822)	0,052 (0,588)	0,178 (0,061)	0,001 (0,993)	-0,123 (0,200)
Acilada	-0,313 (0,001)	-0,014 (0,888)	0,005 (0,959)	0,153 (0,109)	-0,057 (0,555)	-0,193 (0,042)
Desacilada	-0,484 (< 0,001)	-0,026 (0,783)	0,055 (0,567)	0,176 (0,065)	0,011 (0,911)	-0,091 (0,341)

E/I-Z: escore-z da estatura para idade; IMC/I-Z: escore-z do índice de massa corporal para idade; CB/I-Z: escore-z da circunferência do braço para idade; DCT/I-Z: escore-z da dobra cutânea tricipital para idade; DCS/I-Z: escore-z da dobra cutânea subescapular para idade. (*) Coeficiente de correlação de Spearman.

5 Resultados

A grelina total, a acilada e a desacilada correlacionaram-se inversamente com a idade e a grelina acilada com o escore-z da DCS/I, mas não com as demais variáveis antropométricas.

A tabela 8 apresenta os valores de regressão linear múltipla para as dosagens de grelina após transformação logarítmica.

Tabela 8 - Regressão linear múltipla para os níveis de grelina total, acilada e desacilada (valores sofreram transformação logarítmica)

Variáveis	Modelo de regressão linear	
	β	<i>P</i>
Grelina Total*		
Idade (meses)	-0,442	< 0,001
Grelina Acilada**		
Idade (meses)	-0,471	< 0,001
Escore-z (DCS/I)	-0,217	0,012
Grelina desacilada***		
Idade (meses)	-0,442	< 0,001

*F (1,109) = 26,5; *P* < 0,001; R^2 = 19,5%.

** F (2,108) = 17,2; *P* < 0,001; R^2 = 24,2%.

*** F (1,109) = 26,5; *P* < 0,001; R^2 = 19,5%.

Foi excluída pelo método de estimação *stepwise* a variável circunferência do braço para idade em escore-z das três grelinas.

As associações entre as dosagens de grelina total, grelina acilada e grelina desacilada permaneceram significativas após a análise multivariada (figuras 11, 12 e 13, respectivamente). A grelina acilada apresentou uma relação inversa estatisticamente significativa com o escore-z da DCS.

5 Resultados

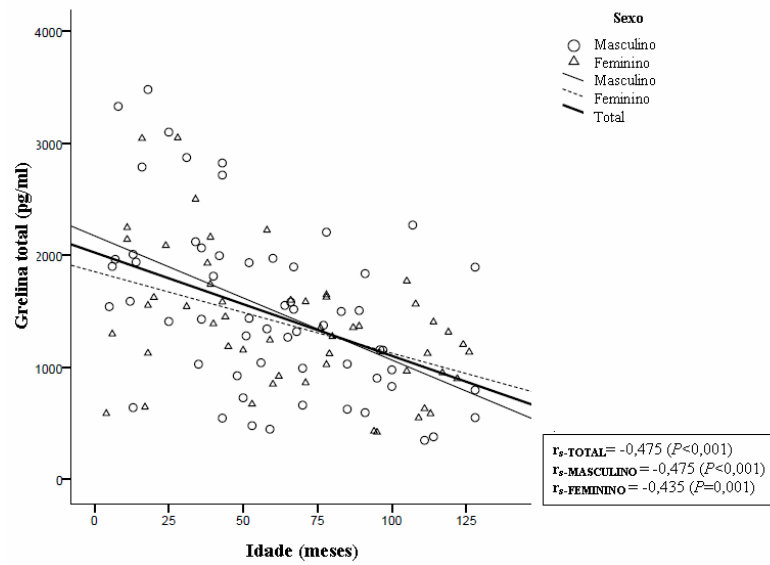


Fig. 11 - Grelina total e idade.

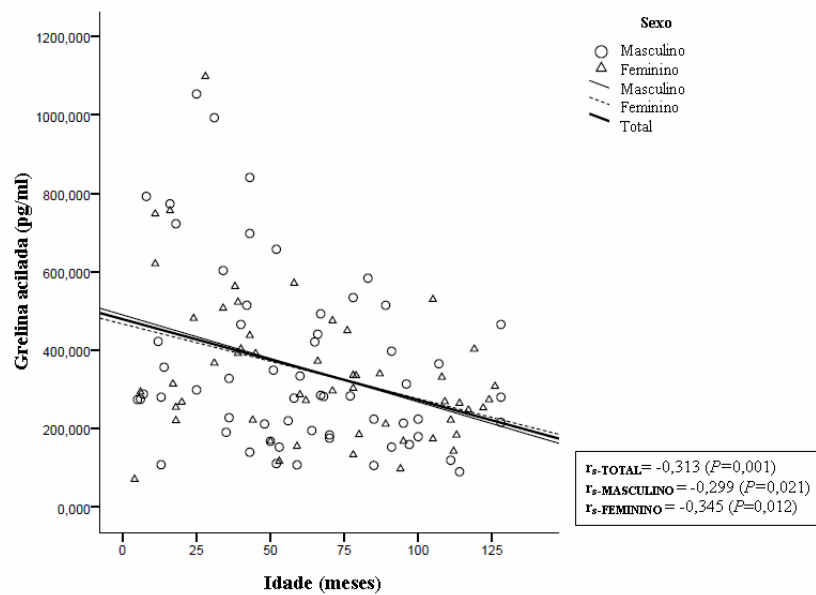


Fig. 12 - Grelina acilada e idade.

5 Resultados

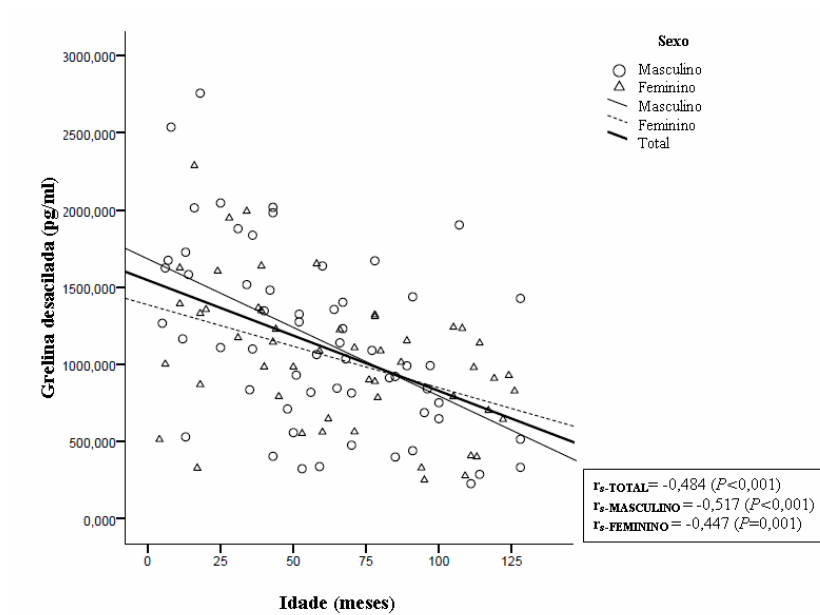


Fig. 13 - Grelina desacilada e idade.

As curvas de percentis para grelina total, grelina acilada e grelina desacilada vêm apresentadas a seguir (figuras 14, 15 e 16, respectivamente).

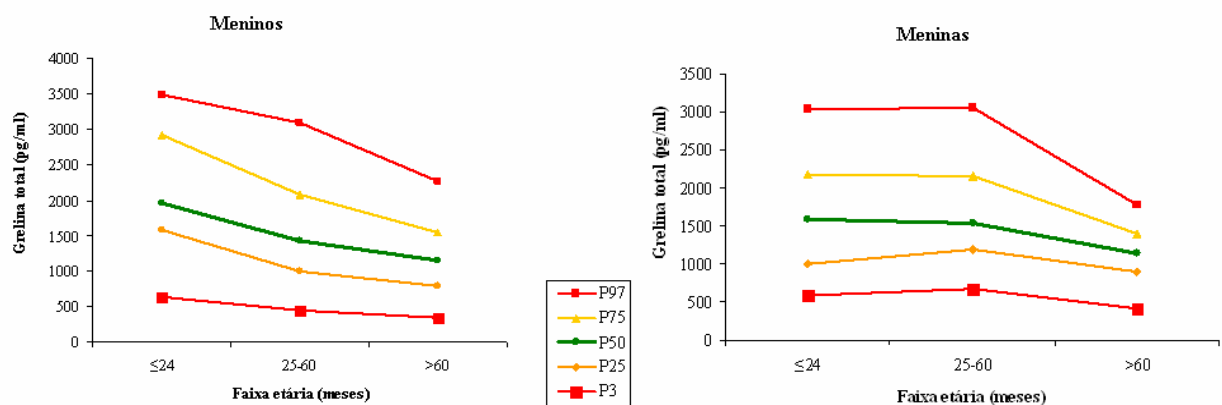


Fig. 14 - Curvas de percentis da grelina total para meninos e meninas.

5 Resultados

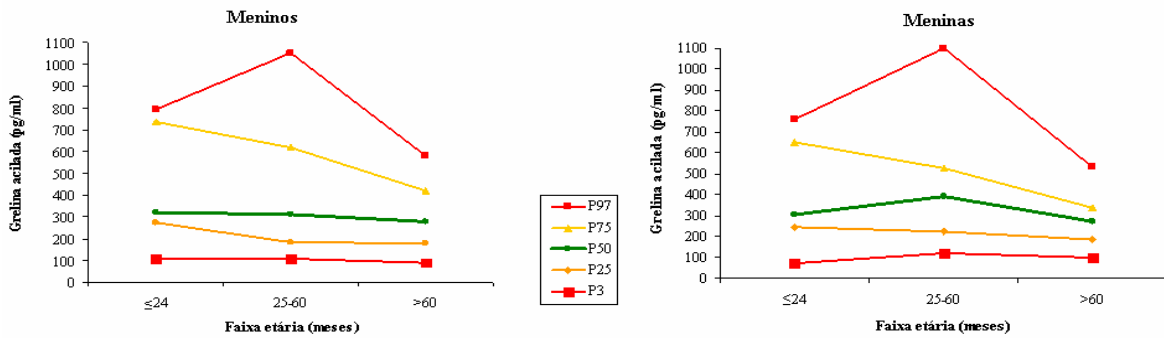


Fig. 15 - Curvas de percentis da grelina acilada para meninos e meninas.

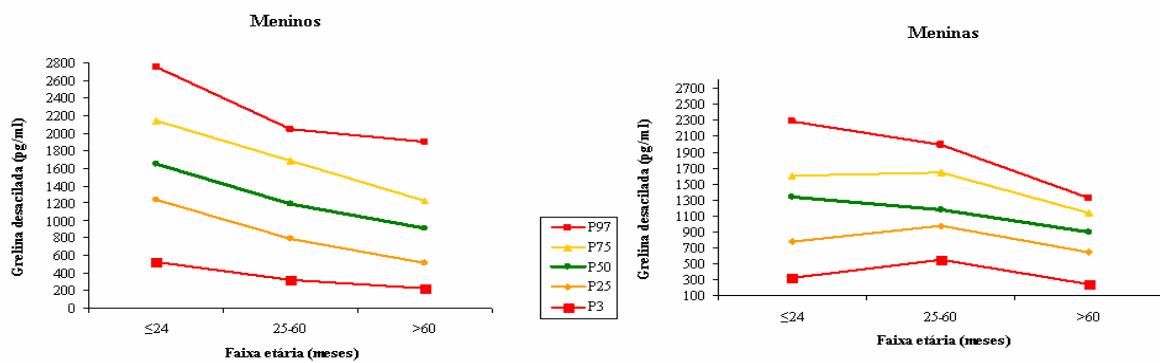


Fig. 16 - Curvas de percentis da grelina desacilada para meninos e meninas.

5.4 ASSOCIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE LEPTINA

Não houve diferença entre a concentração de leptina nas faixas etárias ($P = 0,443$) (tabela 5).

A tabela 9 mostra as associações entre as dosagens de leptina com os parâmetros antropométricos e idade.

Tabela 9 - Associações entre as dosagens de leptina, variáveis antropométricas e idade

Variáveis	Idade (n = 111)	E/I-Z (n = 111)	IMC/I-Z (n = 111)	CB/I-Z (n = 111)	DCT/I-Z (n = 111)	DCS/I-Z (n = 111)
	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)
Leptina	0,190 (0,046)	0,429 (< 0,001)	0,218 (0,022)	0,387 (< 0,001)	0,210 (0,027)	0,305 (0,001)

E/I-Z : escore-z da estatura para idade; IMC/I-Z: escore-z do índice de massa corporal para idade; CB/I-Z: escore-z da circunferência do braço para idade; DCT/I-Z: escore-z da dobra cutânea tricipital para idade; DCS/I-Z: escore-z da dobra cutânea subescapular para idade. (*) Coeficiente de correlação de Spearman.

A leptina correlacionou-se significativamente com a idade e com os escores-z da E/I, do IMC/I, da CB/I, da DCT/I e da DCS/I.

A tabela 10 apresenta os valores de regressão linear múltipla para as dosagens de leptina após transformação logarítmica.

Tabela 10 - Regressão linear múltipla para os níveis de leptina (valores sofreram transformação logarítmica)

Variáveis	Modelo de regressão linear	
	β	P
Idade (meses)	0,207	0,012
Escore-z (IMC/I)	0,415	< 0,001
Escore-z (E/I)	0,189	0,020
Sexo feminino	0,271	0,001

IMC/I: índice de massa corporal para idade; E/I: Estatura para a idade. $F(4,106) = 13,1$; $P < 0,001$; $R^2 = 33\%$
Foram excluídas do modelo as variáveis circunferência do braço para idade, dobra cutânea tricipital para idade e dobra cutânea subescapular para idade em escore-z, pelo método *stepwise*.

5 Resultados

Na análise multivariada, observa-se que a leptina permanece estatisticamente associada com a idade, com o escore z do IMC/I, com o sexo feminino e com o escore-z do E/I, sendo que níveis mais elevados de leptina são encontrados em crianças mais velhas, mais altas, com IMC mais elevado e no sexo feminino (figuras 17, 18, 19 e 20, respectivamente).

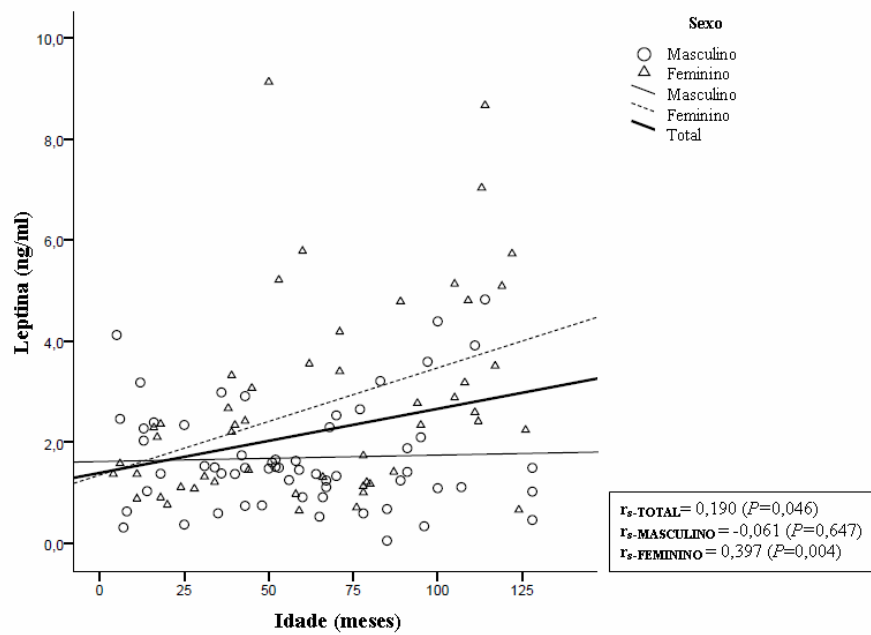


Fig. 17 - Leptina e idade.

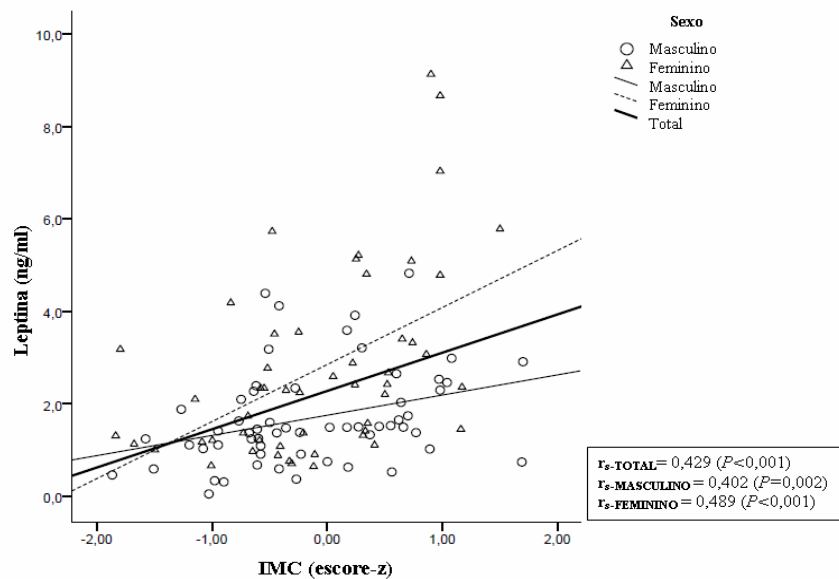


Fig. 18 - Leptina e IMC para idade.

5 Resultados

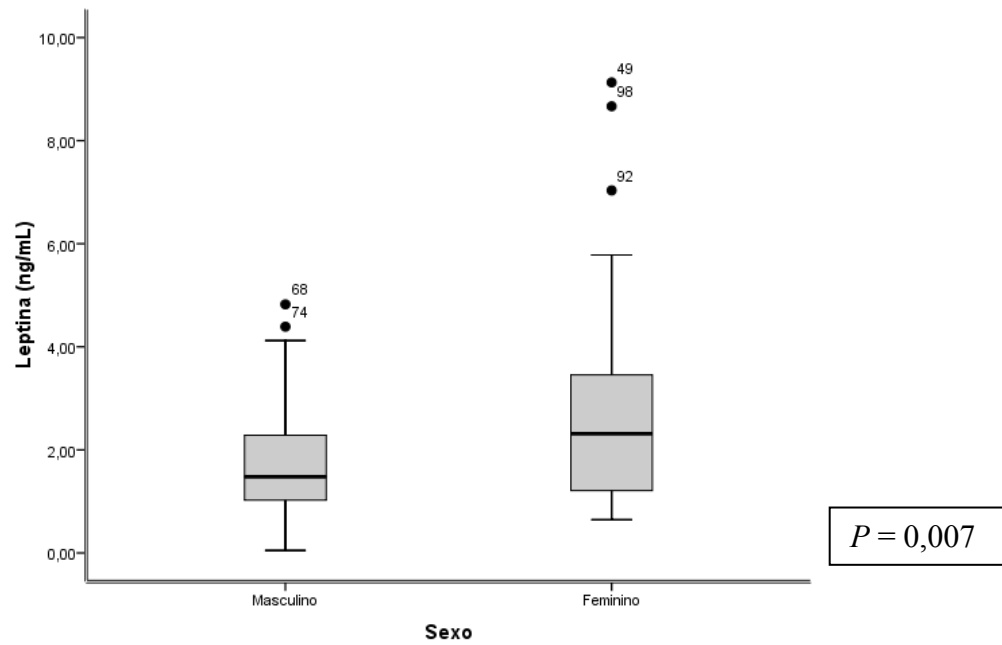


Fig. 19 - Leptina e sexo.

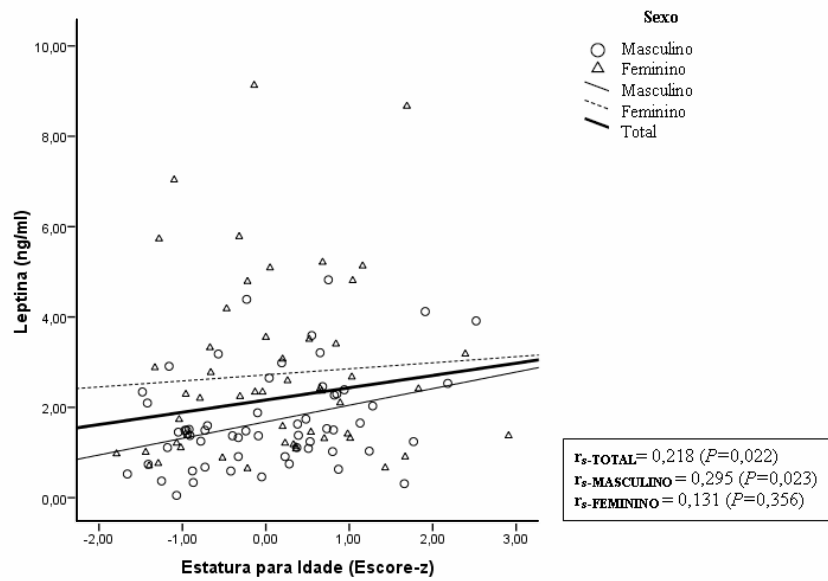


Fig. 20 - Leptina e estatura para a idade.

5 Resultados

As curvas de percentis para leptina estão apresentadas a seguir (figura 21).

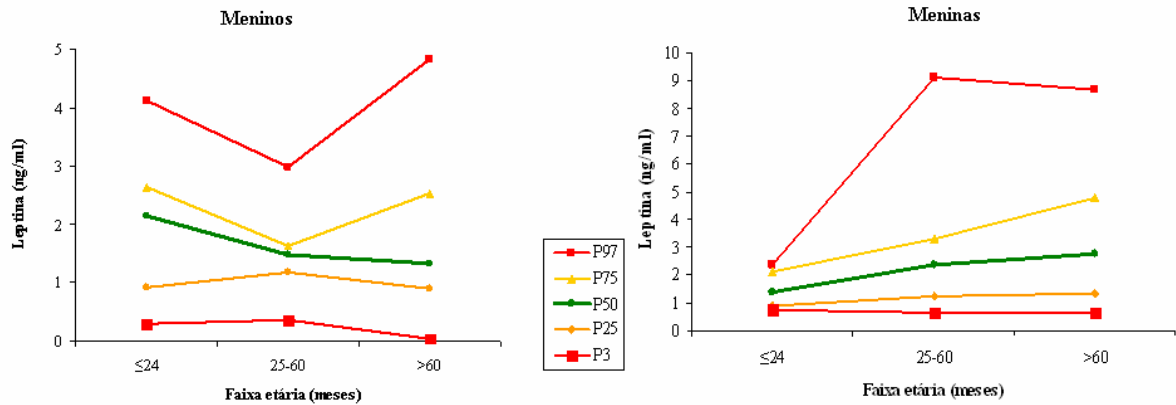


Fig. 21 - Curvas de percentis da leptina para meninos e meninas.

5.5 ASSOCIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA E GLICOSE

Não houve associação estatisticamente significativa da insulina e da glicose com idade, sexo e parâmetros antropométricos.

As curvas de percentis para insulina e glicose estão apresentadas a seguir (figuras 22 e 23, respectivamente).

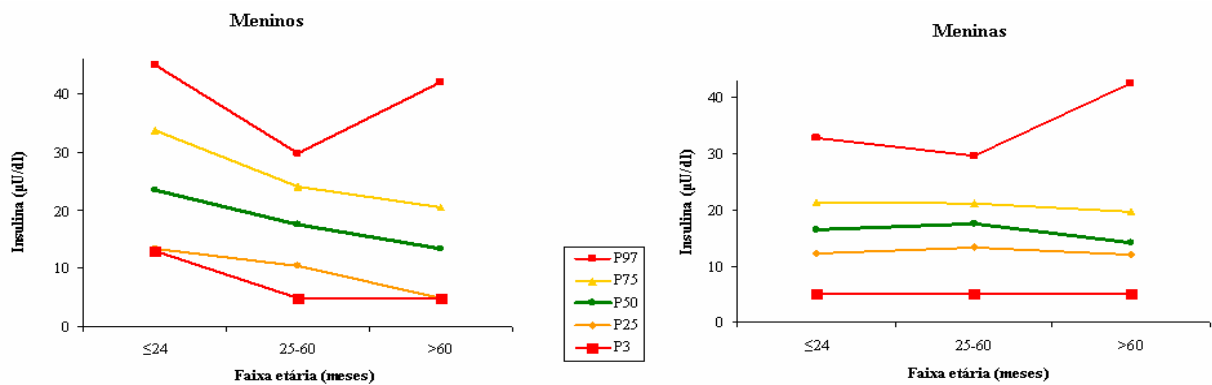


Fig. 22 - Curvas de percentis da insulina para meninos e meninas.

5 Resultados

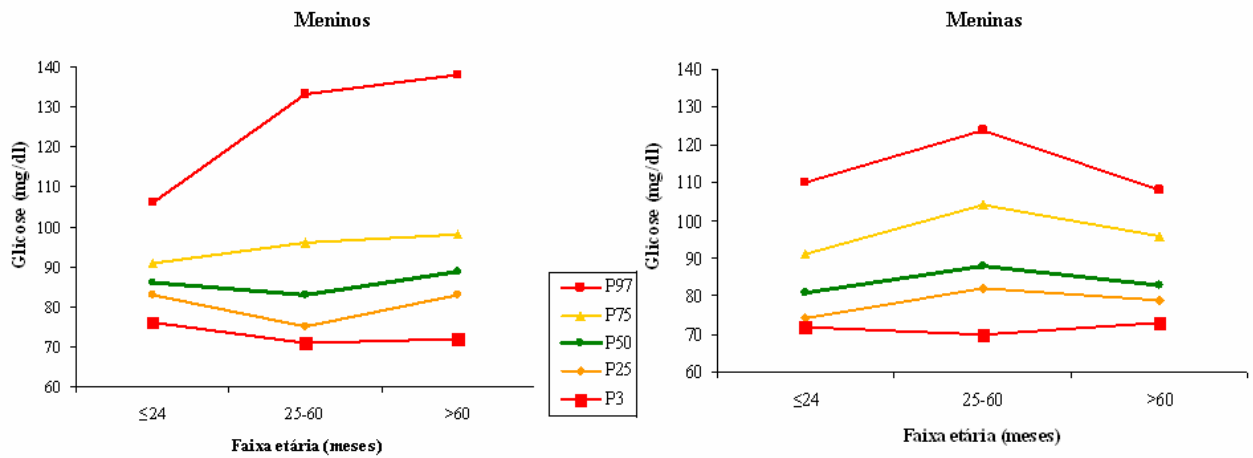


Fig. 23 - Curvas de percentis da glicose para meninos e meninas.

5.6 ASSOCIAÇÕES ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DOS HORMÔNIOS E GLICOSE

A tabela 11 apresenta as associações entre as dosagens executadas na pesquisa.

Tabela 11 - Associação entre as concentrações dos hormônios e glicose

Variáveis	Grelina total	Grelina acilada	Grelina desacilada	Leptina	Insulina	Glicose
	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)
Grelina						
Total	–	0,808 (< 0,001)	0,982 (< 0,001)	-0,237 (0,012)	0,067 (0,486)	-0,136 (0,156)
Acilada	–	–	0,696 (< 0,001)	-0,176 (0,065)	-0,008 (0,933)	-0,174 (0,067)
Desacilada	–	–	–	-0,239 (0,012)	0,078 (0,414)	-0,107 (0,265)
Leptina	–	–	–	–	0,119 (0,213)	-0,013 (0,895)
Insulina	–	–	–	–	–	-0,033 (0,731)
Glicose	–	–	–	–	–	–

r_s : Correlação de Spearman

5 Resultados

Como era esperado houve associação entre as grelinas. Houve associação estatisticamente significativa negativa entre as dosagens de leptina com grelina total ($r_s = -0,237$; $P = 0,012$) e desacetilada ($r_s = -0,239$; $P = 0,012$). Entre as demais dosagens, não houve associação estatisticamente significativa.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo dosou a concentração de grelina total, grelina acilada, leptina, insulina e glicose em crianças eutróficas previamente hígdas. Os principais achados foram uma correlação inversa da grelina com a idade e uma correlação direta da leptina com parâmetros antropométricos e sexo. Não houve correlação da insulina e da glicose com nenhuma das variáveis analisadas.

6.1 ANTROPOMETRIA

Índices antropométricos são utilizados como critério principal para a avaliação do estado nutricional na infância. A aplicação desses critérios, contudo, tornou-se difícil pelo fato da inexistência, nos últimos 30-50 anos, de um consenso para avaliação do crescimento. Isso pode ser especialmente problemático, quando falhas no entendimento dessas variáveis levam a decisões inapropriadas de alimentação, que variam desde suplementação do leite materno até uma demora excessiva na introdução de outros alimentos.

Com base nessas dificuldades, a OMS percebeu grande necessidade de uma mudança nas curvas utilizadas até então. Em 2005 foi lançado o padrão OMS para crianças com até cinco anos de idade. Em 2006 esse padrão foi complementado com dados de perimetria para uma avaliação mais completa. Em 2007, dada a grande necessidade de padronizar a avaliação antropométrica de crianças com mais de cinco anos e sem dados novos para realização de um

padrão de crescimento, a OMS utilizou os dados do NCHS de 1977, reestruturando-os para uma avaliação mais precisa do crescimento nessa faixa etária. Essas novas curvas foram denominadas referência OMS. Em seguimento à referência para crianças mais velhas, a OMS determinou que o ponto de corte de eutrofia para crianças acima de cinco anos seria diferente do adotado para as com menos de 60 meses. Dessa forma, os pontos de corte determinados pela OMS e utilizados neste trabalho são -2,00 a + 2,00 escore-z para crianças com menos de cinco anos e -2,00 a +1,00 para crianças acima de 60 meses.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A faixa etária escolhida foi delineada de forma a abranger desde o período da amamentação até o final da infância, sem grandes comprometimentos da amostra com as mudanças hormonais pertinentes à puberdade. Para uma melhor avaliação dos participantes, eles foram divididos em três faixas etárias: menores de dois anos, dois a cinco anos, maiores de cinco anos. Uma possível limitação do estudo pode ser o reduzido tamanho da amostra na faixa etária que compreende crianças com menos de dois anos. Isto ocorreu devido à grande dificuldade em selecionar crianças saudáveis e eutróficas com coleta de sangue programada.

6.2.1 Hemoglobina e hematócrito

Foram excluídas crianças com hemoglobina $< 11,0$ g/dl, e as com valores entre 11,0 e 11,5 g/dl tiveram os valores de hematócrito para idade observados para confirmação do diagnóstico (WHO, 2001), pois, anemia é uma doença muito prevalente em crianças. O

percentual estimado de anemia para crianças de zero a quatro anos é de 20,1% em países industrializados e de 39,0% em países não industrializados. Para crianças acima de cinco anos o percentual estimado é de 5,9% em países industrializados e de 48,1% em países não industrializados (WHO, 2001). A Unicef estima uma prevalência de 45% de anemia nos pré-escolares brasileiros. Nas crianças que tiveram o sangue coletado para nossa pesquisa 18% foram excluídas por apresentarem anemia.

Os valores de hemoglobina e hematócrito não apresentaram nenhuma associação com as dosagens realizadas. Akarsu *et al.* (2007) demonstraram um decréscimo acentuado nos níveis de grelina em várias fases da anemia ferropriva, que pode levar à perda de apetite com consequente atraso no crescimento e desenvolvimento. As concentrações sérica de leptina e insulina não apresentaram correlação com anemia ferropriva (ISGUVEN *et al.*, 2007). Nossos achados demonstraram que as crianças eutróficas e híginas não apresentam correlação dos níveis dos hormônios dosados com os valores de hemoglobina e hematócrito, estando consistentes com os dados da literatura.

6.2.2 Sulfato ferroso e suplemento vitamínico em doses profiláticas

De acordo com o Departamento de Nutrologia da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), nos casos de alimentação deficiente, em que há risco de carência, vitaminas e ferro devem ser utilizados sob a forma medicamentosa, principalmente nos primeiros anos de vida (WHO, 2001).

Como já foi referido anteriormente, sulfato ferroso e suplemento vitamínico em doses profiláticas são muito utilizados em crianças pequenas, situação que não foi prevalente na nossa amostra onde 89,2% não utilizam nenhum medicamento profilático.

Não foi encontrada nenhuma associação entre o uso desses medicamentos com as dosagens dos hormônios e glicose.

6.2.3 Jejum

Ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos que regulam a secreção de grelina, mas o fator mais importante envolvido em sua secreção é a alimentação (KOJIMA & KANGAWA, 2008). Segundo Cummings *et al.* (2001), a concentração de grelina duplica imediatamente antes e retorna aos níveis basais após uma hora das refeições habituais. A insulina mostrou aumento de três a sete vezes maior 30 a 60 minutos após o consumo de alimentos. A leptina não apresentou mudanças abruptas antes das refeições, mas evidenciou clara variação diurna.

Com base nestes achados, estipulamos um tempo mínimo de jejum de três horas e, para contemplar as crianças com exames de perfil lipídico agendados, o tempo máximo estabelecido foi de 14 horas. No entanto, a variação de tempo de jejum não apresentou nenhuma associação significativa com qualquer dos hormônios dosados nem com a glicose. Com base nestes achados, observa-se que o tempo de jejum não influencia estes hormônios.

6.3 DOSAGEM DA GRELINA

Evidências na literatura atual demonstram que a secreção de grelina aumenta em condições de balanço energético negativo, enquanto diminui no positivo (HOSODA *et al.*, 2006), fundamentando a importância deste estudo na população pediátrica para futuras

comparações com crianças portadoras de patologias que causam alterações de apetite. No presente estudo, destaca-se a originalidade em avaliar mais de uma isoforma da grelina, pois as demais pesquisas, em geral, dosam apenas uma, dificultando as comparações e contribuições no que se refere às mais novas evidências de que mais de uma isoforma de grelina pode fazer parte de um sistema de múltiplos elementos efetores integrantes do eixo cérebro-intestino que modulam o apetite, a digestão, a motilidade intestinal, a adiposidade e a divisão de energia (CHEN *et al.*, 2009b).

As crianças “sabem” o que e quanto precisam comer?

Muito se discute a respeito da autorregulação do apetite de crianças. Alguns profissionais da saúde defendem a idéia de que os organismos saudáveis são capazes de controlar a ingestão calórica de acordo com o gasto energético. Outros, porém, julgam que ações inapropriadas em relação à ingestão calórica em crianças pode causar desnutrição ou obesidade.

A grelina descrita como o primeiro sinal orexígeno da alimentação é um regulador a curto prazo da ingestão alimentar e, a longo prazo, do aumento de peso (DE VRIESE *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a ingestão alimentar inibe a secreção de grelina em adultos, mas não em crianças, podendo esse comportamento refletir um perfil funcional peculiar do sistema grelina na infância (BELLONE *et al.*, 2004).

O papel da grelina no crescimento neonatal ainda não está totalmente elucidado; a hipótese mais provável é que a grelina tenha um efeito anabólico no início da refeição seguido de um balanço energético positivo (SAVASTIO *et al.*, 2006).

O presente estudo avaliou a grelina total, acilada e desacilada em crianças de zero a 10 anos, pois a acilação através da GOAT confere à grelina acilada seu efeito fisiológico principal e bem documentado de ativação de neurônios hipotalâmicos que expressam NPY e

AgRP. Já a grelina desacilada parece desempenhar um papel antagônico, diminuindo o apetite de camundongos (ASAWAKA *et al.*, 2005) e de ratos (CHEN *et al.*, 2005). As diferenças entre as dosagens podem ser de grande importância para fundamentar pesquisas envolvendo o possível uso de análogos da grelina em diferentes condições patológicas em crianças. Perda de peso induzida por restrição calórica e/ou exercícios a longo prazo aumentam a concentração de grelina (KRAEMER & CASTRACANE, 2007; BECK & RICHY, 2009).

A grelina é responsável pela liberação de GHRH que, por sua vez, libera GH. Foi relatado que a grelina aumenta o depósito de tecido adiposo branco através de um mecanismo dependente de GHS-R, o que, na prática, significa que, em períodos de restrição energética, a exposição à grelina acilada pode limitar a utilização de energia em depósitos específicos de tecido adiposo branco, poupando a utilização de lipídios (DAVIES *et al.*, 2009). Esses achados reforçam o importante papel da grelina tanto no crescimento como no metabolismo energético.

O tipo de alimentação nos primeiros meses de vida tem um grande impacto, como obesidade nas faixas etárias subseqüentes, e pode, além disso, ter efeitos a longo prazo. O aleitamento materno exclusivo melhora o perfil lipídico, diminui a pressão arterial e o risco de desenvolver obesidade na vida adulta. Dessa maneira, o modo como uma criança se alimenta altera o eixo cérebro-intestino, gerando diferenças no desenvolvimento a curto e a longo prazos. A concentração de grelina tanto no sangue como no leite materno pode ser de grande importância para determinar paralelos entre os fatores que modulam o balanço energético e o crescimento somático no primeiro ano de vida (SAVINO *et al.*, 2007).

As concentrações de grelina encontradas enfatizam a grande variação de valores apontados na literatura.

Atualmente nós “sabemos” qual a prescrição correta para uma criança saudável?

A ingestão dietética de referência (DRIs) (em inglês, *dietary reference intake*) preconiza os valores de nutrientes que deverão ser utilizados nas dietas de crianças saudáveis. Tais valores são baseados em dados populacionais, mas muito frequentemente são escassos e retirados de trabalhos com limitações. Além do mais, é discutível a validade externa das DRIs uma vez que todas elas foram baseadas em pesquisas dos Estados Unidos e Canadá. É relativamente comum a observação de condutas inadequadas em relação ao consumo alimentar de crianças que podem desencadear processos de baixo peso ou sobrepeso. Uma criança com crescimento normal e dieta com valores inferiores aos das DRIs necessitaria complementar a alimentação? Talvez interferir na autorregulação do apetite altere a concentração de hormônios que são importantes no balanço energético, e isso, a longo prazo, poderia causar problemas de peso e até mesmo doenças. Dessa forma, é de indiscutível importância que sejam estabelecidos valores normais de grelina na infância para servirem de comparação com crianças que apresentam alterações do apetite e desencadeiam processos patológicos. As crianças do nosso estudo já foram utilizadas como controles para comparação com crianças cirróticas em uma tese em elaboração realizada neste Programa de Pós-Graduação (DORNELLES *et al.*, 2010).

Para comparação de nosso estudo, buscamos na literatura trabalhos com 50 crianças ou mais e que selecionaram crianças presumidamente híginas. Esses trabalhos apresentam amostras muito heterogêneas, sendo a comparação deles com o nosso estudo muito difícil (tabela 12). Alguns estudos não utilizam o score-z, recomendado pela OMS, para avaliação nutricional das crianças selecionadas (WHO, 1995). Nosso estudo adotou o padrão mais atual para avaliação nutricional: as curvas da OMS, que avaliou os índices antropométricos E/I e IMC/I. Com esta rigorosa avaliação nutricional, podemos afirmar que todos os participantes da pesquisa são classificados como eutróficos (ANEXO 11).

Tabela 12 - Trabalhos que avaliaram grelina e índices antropométricos em crianças

Autor, ano, país	Grelina dosada	n	Idade	Jejum	IMC-Z
Iniguez, 2002, Chile	Total	107 (85 PIG/22AIG)	12 meses	Jejum de uma noite	N/A
Whatmore, 2003, Reino Unido	Total	121 (65 meninos/56 meninas)	5-19 anos	Sem jejum	(Cole <i>et al.</i> , 1995)
Soriano-Guillén, 2004, Espanha	Total	224	Estágios de Tanner I - V	Jejum (*)	- 2 e + 2
Park, 2005, Coreia	Total	50	7-19 anos	12 h de jejum	N/A(**)
Savino, 2006, Itália	Total	62	1-18 meses	1 hora pós-prandial	N/A(**)
Nosso estudo, 2010, Brasil	Total acilada	111	4 meses – 10 anos	3 – 14horas	- 2 e + 2 (≤ 5 anos) -2 e +1 (> 5 anos)

(*) Número de horas não especificado. (**) Não avaliado.

Devido à heterogeneidade das amostras dos estudos buscados na literatura, os valores de grelina apresentam uma ampla variação no que se refere a valores, unidade de medida e método de detecção (tabela 13).

Após a regressão linear múltipla, a grelina total, a grelina acilada e a grelina desacilada permaneceram correlacionadas com a idade. Da mesma maneira, a grelina acilada permaneceu associada com o escore-z da DCS. Neste modelo foi excluída pelo método *stepwise* a variável CB-Z. Assim, as variáveis idade e DCS-Z podem explicar uma variação de 24,2% nos valores de grelina acilada.

Os métodos de análise bioquímica mais importantes desenvolvidos no final do século passado são denominados ensaios de ligação e consistem em submeter amostras contendo a substância em teste a uma série de processos físicos e químicos com finalidade de determinar o valor encontrado na substância. O primeiro método desenvolvido, no ano de 1959, foi o radioimunoensaio (RIA). Paulatinamente, outros métodos foram sendo descobertos, como o

6 Discussão

ensaio imunoradiométrico (IRMA) (em inglês, *immunoradiometric assay*) e o ELISA, entre outros (STITES *et al.*, 2000). Os testes ELISA são amplamente utilizados no laboratório clínico, não apenas por sua especificidade e sensibilidade, mas também devido à sua possibilidade de automação e menor custo. Com base na especificidade e na sensibilidade associada à facilidade de execução, escolhemos o ELISA como método para realizar as dosagens em nosso trabalho.

A tabela 13 apresenta os resultados de grelina dosados de alguns trabalhos com o método em que foi realizado.

Tabela 13 - Valores dosados de grelina em diversos estudos

Autor, ano, país	Método	Grelina total	Grelina acilada
Iniguez, 2002, Chile	RIA	94,8 pg/ml	–
Whatmore, 2003, Reino Unido	RIA	162 pg/ml	–
Soriano-Guillén, 2004, Espanha	RIA	370 a 894 pg/ml ^(*)	–
Park, 2005, Coreia	RIA	M: 133,2 fmol/ml (450 pg/ml) ^(**) F: 189,6 fmol/ml (640 pg/ml) ^(**)	–
Savino, 2006, Itália	RIA	3026,53 pg/ml	–
Nosso estudo, 2010, Brasil	ELISA	M: 1436 pg/ml F: 1331 pg/ml T: 1374 pg/ml	M: 286 pg/ml F: 300 pg/ml T: 288 pg/ml

^(*) Varia conforme o estágio de Tanner; ^(**) Realizada a conversão para melhor comparação dos valores.

Os valores apresentados mostram grande variação independentemente do método utilizado, o que pode ser explicado pela heterogeneidade das amostras. Whatmore utilizou amostras de crianças de cinco a 19 anos, sem jejum. Iniguez avaliou crianças de 12 meses, com jejum de uma noite. Park subdividiu as crianças por estágios de Tanner e não por idade.

6 Discussão

Savino utilizou crianças de 1 a 18 meses, com 1 hora pós-prandial. Como já foi observado, nosso estudo planejou coletar amostras com 3-14 horas de jejum e as crianças eram todas eutróficas, o que não está totalmente esclarecido em outros trabalhos.

Valores tão discrepantes podem ter sido influenciados pela alimentação, idade e metodologia de coleta. O tipo de nutriente consumido pelo indivíduo pode alterar os níveis circulantes de grelina (FOSTER-SCHUBERT *et al.*, 2008). A grelina é um hormônio muito instável, que se degrada facilmente, sendo necessária a utilização de inibidores de protease e acidificação da amostra para se obter um resultado confiável (ARIYASU *et al.*, 2002). Essa diferença de valores nos estudos citados pode ser consequência da metodologia empregada pelos autores. Whatmore, Iniguez e Savino utilizaram amostras sem tratamento e armazenamento adequado para medições confiáveis.

6.4 DOSAGEM DA LEPTINA

Muitas variáveis podem afetar a dosagem de leptina: sexo, estágio puberal, peso, tipo de amostra (plasma ou soro) e dieta (VENNER *et al.*, 2009). Segundo o CLSI (em inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*), a amostra deve ter critérios de inclusão e exclusão bem definidos para que possa gerar valores de referência confiáveis (NCCLS, 2000).

O aumento da massa gorda leva a aumento da leptina que inibe o centro da saciedade no hipotálamo e influencia, também, outros sistemas neuroendócrinos relacionados à puberdade e fertilidade (LEE, 2009).

A tabela 14 mostra diferentes estudos que avaliam parâmetros antropométricos.

Tabela 14 - Trabalhos que avaliaram leptina e índices antropométricos em crianças

Autor, ano, país	n	Idade	Jejum	IMC-Z
Coutant, 1998, França	82	5 – 13 anos	Uma noite	N/A ^(††)
Viso-González, 2005, Venezuela	166	2 – 15 anos	12 horas	N/A ^(††)
Garcia-Mayor, 1997, Espanha	789	5 – 15 anos	(**)	0,13 ± 0,01 ^(†) 0,63 ± 0,12 ^(†)
Park, 2005, Coreia	50	7 – 19 anos	12 horas	N/A ^(††)
Bjarnason, 1997, Suécia.	107	3 – 15 anos		-2,5 a + 4,8 ^(*)
Nosso estudo, 2010, Brasil	111	4 meses - 10 anos	3 – 14 horas	- 2 e + 2 (≤ 5 anos) -2 e +1 (> 5 anos)

(**) Número de horas de jejum não especificado; (*) Valor de peso para estatura em escore-z; (††) Não avaliado; (†) Valores expressos em média ± DP.

Está claramente demonstrado na literatura que, mesmo sendo o escore-z padrão-ouro para classificação nutricional de crianças, a maioria dos estudos apresentou os valores de IMC em números absolutos (COUTANT *et al.*, 1998; VISO-GONZÁLEZ *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005), o que prejudica uma avaliação precisa devido à variação desses em relação à idade.

Por que a concentração elevada de leptina não inibe o apetite para prevenir a obesidade?

Como a leptina é um hormônio que exerce função de aumentar a saciedade e ratos *knockout* para leptina são gravemente obesos, seria razoável pensar que humanos com sobrepeso ou obesidade teriam valores séricos diminuídos. Contudo, como visto anteriormente, humanos com excesso de peso frequentemente têm a concentração de leptina

6 Discussão

elevada, situação que é conhecida como resistência à leptina e, mesmo que esteja melhor compreendida, não é uma condição simples. O aumento de tecido adiposo corporal consequentemente aumentará a produção de leptina que rapidamente induz a expressão do SOCS3 que inibe a sinalização do receptor da leptina com consequente supressão da leptina na rota JAK-STAT (MYERS *et al.*, 2008). Essa rota, já conhecida, é um indutor de obesidade e pode não ser o início do processo de ganho de peso, mas certamente contribui para a instalação e manutenção da obesidade. Em nossa amostra, algumas crianças apresentaram leptina elevada na ausência de sobrepeso ou obesidade, o que pode sugerir que essa programação da leptina desencadeie um processo de ganho de peso a médio e longo prazos e que esses valores séricos sejam um fator predisponente, que juntamente com o ambiente favorável, acelere o risco de a criança desenvolver obesidade e patologias a ela relacionadas.

A tabela 15 apresenta os valores de leptina encontrados nos estudos selecionados.

Tabela 15 - Valores dosados de leptina em diversos trabalhos

Autor, ano, país	Método	Valores encontrados
Coutant, 1998, França	RIA ^(*)	3,8 ± 0,4 µg/l ^(†)
Viso-González, 2005, Venezuela	ELISA ^(**)	3,33 ± 2,99 µg/l ^(†)
Garcia-Mayor, 1997, Espanha	RIA ^(*)	♂ = 4.38 ± 0.22 µg/l ^(†) ♀ = 5.47 ± 0.28 µg/l ^(†)
Park, 2005, Coreia	RIA ^(*)	♂ = 4,76 ng/ml (0,83-18,48) ♀ = 9,09 ng/ml (2,82-19,31)
Bjarnason, 1997, Suécia	RIA ^(*)	3,2 (1,5 – 13,3) µg/l ^(†)
Nosso estudo, 2010, Brasil	ELISA^(**)	♂ = 1,48 ng/ml (1,02-2,29) ♀ = 2,31 ng/ml (1,20-3,48)

^(*) RIA: radioimunoensaio; ^(**) ELISA: ensaio imunoenzimático;

^(†) Valorem em µg/l são correspondentes aos valores em ng/ml.

Pequenas variações nos valores podem ser esperadas com métodos diferentes, mas as variações maiores podem ser consequência de diferentes estágios puberais e IMC/I que foram incluídos nos estudos selecionados. Alguns trabalhos incluíram crianças com sobrepeso e/ou obesidade (BJARNASON *et al.*, 1997; COUTANT *et al.*, 1998; VISO GONZÁLEZ *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005), além de idade mais elevada, chegando até ao estágio puberal. Valores descritos em crianças eutróficas (GARCIA-MAYOR *et al.*, 1997) são mais elevados do que os nossos, o que pode ser indicativo da presença de adolescentes com estágio puberal mais avançado, já que a idade de inclusão abrange crianças até 15 anos.

O condicionamento aos alimentos (preferências e aversões) é uma prova de que estas respostas podem ser aprendidas e modificadas, conforme foi descrito em pacientes com deficiência de leptina ou fome intensa que gostam de todos os tipos de alimento, mesmo os não apreciados por crianças de mesma idade. A administração de leptina a tais pacientes mudou esse comportamento, tornando-os mais seletivos ao escolher os alimentos (FAROOQI & O'RAHILLY, 2009). Estes achados podem demonstrar que a leptina está envolvida na mediação de propriedades recompensatórias dos alimentos. Na prática, isto pode significar que o apetite tem uma variação individual que pode ser associada a uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento da obesidade. O sabor dos alimentos tem duas funções principais através de respostas centrais: promover ou inibir a ingestão e preparar o organismo para utilizá-los ou responder metabolicamente aos materiais ingeridos (POWER & SCHULKIN, 2008). Por exemplo, um sabor amargo pode diminuir a motilidade gástrica (WICKS *et al.*, 2005).

Alterações da concentração sérica de leptina no período perinatal podem exercer um papel crucial em determinar a ocorrência de sequelas metabólicas a longo prazo (VICKERS *et al.*, 2005). Feto exposto a sobrenutrição ou subnutrição tem como resultado aumento de adiposidade com consequente aumento da concentração de leptina na adolescência e/ou idade

adulta. Os níveis de leptina pré ou neonatal podem modificar a plasticidade dos neurônios e adipócitos, capacitando o indivíduo a adaptar-se para resistir à baixa oferta de nutrientes, contudo, se a oferta aumenta, o indivíduo pode desenvolver síndrome metabólica. O impacto da programação nutricional é emergente e representa um problema de saúde pública relevante (GUILLOTEAU *et al.*, 2009). Neste contexto, podemos especular que em nossa amostra, formada por crianças exclusivamente eutróficas e previamente hígdas, os indivíduos que apresentaram valores elevados podem ter sofrido algum tipo de programação nutricional através de obesidade ou desnutrição materna.

6.5 DOSAGEM DA INSULINA E GLICOSE

Insulina é o peptídio mais importante que regula o metabolismo da glicose. A insulina aumenta a reserva de glicose (sob a forma de glicogênio) no fígado e nos músculos, diminui a lipólise e a gliconeogênese e aumenta a síntese de ácidos graxos pelo tecido adiposo (PORTE *et al.*, 2005). O resultado da ação da insulina é a diminuição da concentração sérica de glicose através da sua conversão em outras formas de reserva de energia (glicogênio e gordura) e do decréscimo da produção de glicose pelo fígado (POWER & SCHULKIN, 2009).

Em um estudo conduzido com crianças de sete a 19 anos, foi demonstrada uma relação direta de leptina com insulina [$r = 0,71$ ($P < 0,05$); $r = 0,44$ ($P < 0,005$)] e uma relação inversa de grelina com insulina [$r = -0,59$ ($P < 0,005$); $r = -0,24$] para meninos e meninas respectivamente (PARK *et al.*, 2005). Em nosso estudo, não foi encontrada nenhuma correlação entre insulina e outros hormônios, o que pode ser devido ao fato de que Park *et al.* incluíram crianças com sobrepeso e/ou obesidade e, em nosso estudo, participaram somente crianças eutróficas (ANEXO 11)

6 Discussão

A glicose não apresentou nenhuma associação em nosso estudo. A média de glicose encontrada foi de $88,6 \pm 13,1$, que está dentro dos limites de normalidade. No entanto, algumas crianças apresentaram valores mais extremos, o que pode ser um reflexo do número de tempo de jejum e da qualidade da alimentação nas refeições que antecederam a coleta.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A grelina total, a grelina acilada e a grelina desacilada correlacionaram-se inversamente com a idade, ou seja, a concentração de grelina parece diminuir com a idade.

A grelina total, grelina acilada e a grelina desacilada não correlacionaram-se significativamente com o sexo e com o tempo em jejum.

A grelina total e a grelina desacilada não correlacionaram-se significativamente com nenhum índice antropométrico. A grelina acilada apresentou uma correlação inversa significativa com a DCS/I-Z, ou seja, crianças com DCS maior parecem ter a concentração de grelina acilada mais baixa.

A grelina total e a grelina desacilada correlacionaram-se inversamente com a leptina.

A leptina correlacionou-se diretamente com a idade, com o sexo feminino e com todos os índices antropométricos, ou seja, a concentração de leptina é mais elevada nas crianças mais velhas, que tenham parâmetros antropométricos mais elevados e meninas.

A insulina e a glicose não apresentaram associação estatisticamente significativa com nenhuma das variáveis analisadas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista dos resultados apresentados, ressalta-se a confiabilidade da análise de dados para futura utilização em pesquisas com a população pediátrica. Mais estudos com crianças eutróficas devem ser conduzidos, no sentido de determinar referência de valores levando em consideração a avaliação de eventos perinatais e nutrição materna.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996;382:250-2.

Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997;99:391-5.

Akarsu S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y, Aygun AD. Plasma ghrelin levels in various stages of development of iron deficiency anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007 Jun;29(6):384-7.

Apter D, Viinikka L, Vihko R. Hormonal pattern of adolescent menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1978 Nov;47(5):944-54.

Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, *et al.* Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology* 2002 Sep;143(9):3341-50.

Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C *et al.* Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest* 2000;23: 493-5.

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N *et al.* Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001;120:337-45.

Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, *et al.* Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*. 2005 Jan;54(1):18-24.

Baldelli R, Otero XL, Camina JP, Gualillo O, Popovic V, Dieguez C *et al.* Growth hormone secretagogues as diagnostic tools in disease states. *Endocrine* 2001;14:95-9.

Beck B & Richy S. Dietary modulation of ghrelin and leptin and gorging behavior after weight loss in the obese Zucker rat. *J Endocrinol* 2009 Jul;202(1):29-34.

9 Referências

- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV *et al.* Structure-function studies on the new growth hormonereleasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 2000;43:4370-6.
- Bellone S, Castellino N, Broglio F, Rapa A, Vivenza D, Radetti G, Bellone J, Gottero C, Ghigo E, Bona G. Ghrelin secretion in childhood is refractory to the inhibitory effect of feeding. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Apr;89(4):1662-5.
- Bjarnason R, Boguszewski M, Dahlgren J, Gelande L, Kriström B, Rosberg S, *et al.* Leptin levels are strongly correlated with those of GH-binding protein in prepubertal children. *Eur J Endocrinol* 1997 Jul;137(1):68-73.
- Bjørbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1998 Mar;1(4):619-25.
- Bjørbaek C & Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:305-31.
- Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Disponível em: http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm.
- Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1319-24.
- Camilleri M, Papathanasopoulos A, Odunsi ST. Actions and therapeutic pathways of ghrelin for gastrointestinal disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009 Jun;6(6):343-52.
- Camurdan MO, Bideci A, Demirel F, Cinaz P. Serum ghrelin, IGF-I and IGFBP-3 levels in children with normal variant short stature. *Endocr J* 2006 Aug;53(4):479-84.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, *et al.* Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996 Jul 20;348(9021):159-61.
- Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJ. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(4):419-25.
- Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F *et al.* Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 2004;150:173-84.

9 Referências

- Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12:318-20.
- Chen CY, Chao Y, Chang FY, Chien EJ, Lee SD, and Doong ML. Intracisternal des-acyl ghrelin inhibits food intake and non-nutrient gastric emptying in conscious rats. *Int J Mol Med* 2005;16:695-9.
- Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, Lee SD, Inui A. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev* 2009 Dec;61(4):430-81b.
- Chen CY, Fujimiya M, Asakawa A, Chang FY, Cheng JT, Lee SD, Inui A. At the cutting edge: ghrelin gene products in food intake and gut motility. *Neuroendocrinology* 2009;89(1):9-17a.
- Chevenne D, Trivin F, Porquet D. Insulin assays and reference values. *Diabetes Metab* 1999 Dec;25(6):459-76.
- Cisternas JR. Fisiologia da Ilhotas de Langerhans. In: Cisternas JR. Tratado de fisiologia aplicado à nutrição. São Paulo: Robe Editorial 2002. p. 791-804.
- Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR, *et al.* The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations: distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes* 2002 Apr;51(4):1005-15.
- Costa R F. Composição corporal: Teoria e prática da avaliação. Brasil. Editora Manole 2001. P 40-1.
- Coutant R, Lahlou N, Bouvattier C, Bougnères P. Circulating leptin level and growth hormone response to stimulation tests in obese and normal children. *Eur J Endocrinol* 1998 Dec;139(6):591-7.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL *et al.* Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001;411:480-4.
- Crawford JD & Osler DC. Body composition at menarche: The Frisch-Revelle hypothesis revisited. *Pediatrics* 1975 Sep;56(3):449-58.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50:1714-9.
- Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:297-304.

9 Referências

Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999 Feb;60(2):216-22.

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T *et al.* Ghrelin, an novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141:4255-61a.

Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K *et al.* Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:477-80b.

Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H *et al.* Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002;51:124-9.

Davies JS, Kotokorpi P, Eccles SR, Barnes SK, Tokarczuk PF, Allen SK *et al.* T. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol Endocrinol* 2009 Jun;23(6):914-24.

De la Cour CD, Norlén P, Håkanson R. Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate Messenger compounds: a microdialysis study. *Regul Pept* 2007 Oct 4;143(1-3):118-26.

De Vriese C, Perret J, Delporte C. Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition* 2010 Jan 14. [Epub ahead of print].

Ding ZY, Xu WN, Du LR. Blood leptin level of 154 Chinese children 0 – 14 years of age. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2003 Jul;41(7):486-92.

Dornelles CTL. Comparação da grelina, leptina, insulina e glicose pré-prandial entre crianças e adolescentes cirróticos e hígidos. [Tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

Dunger DB, Ahmed ML, Ong KK. Early and late weight gain and the timing of puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2006 Jul 25;254-255:140-5.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjørbaek C *et al.* Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999;23:775-86.

Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 1971 Dec 28;251(3):427-34.

9 Referências

- Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 2003;116:101-7.
- Farooqi IS, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2009 Mar;89(3):980S-984S.
- Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Palyha OC, Hreniuk DL, Pong SS *et al.* Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science* 1999;284:2184-8.
- Ferraninni E, Galvan AQ, Gastaldelli A, Camastra S, Sironi AM, Toschi E, *et al.* Insulin: new roles for an ancient hormone. *Eur J Clin Invest* 1999;29(10):842-52.
- Flier JS. Clinical review 94: what's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1407-13.
- Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004;116:337-50.
- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Apr;50(2):216-29.
- Foster-Schubert KE, Overduin J, Prudom CE, Liu J, Callahan HS, Gaylinn BD *et al.* Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 May;93(5):1971-9.
- Friedman JM. The function of Leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 2002;60:S1-14.
- Friedman JM. Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* 2009 May 21;459(7245):340-2.
- Friedman MI. Fuel partitioning and food intake. *Am J Clin Nutr* 1998;67(3 Suppl):513-8.
- Frisancho AR. Anthropometric standards: an interactive nutritional reference of body composition for children and adults. Ann Arbor The University of Michigan Press 2008;149-55.
- Frisch RE & Revelle R. The height and weight of girls and boys at the time of initiation of the adolescent growth spurt in height and weight and the relationship to menarche. *Hum Biol* 1971 Feb;43(1):140-59.
- Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Sep;82(9):2849-55.

9 Referências

- German J, Kim F, Schwartz GJ, Havel PJ, Rhodes CJ, Schwartz MW *et al.* Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology* 2009 Oct;150(10):4502-11.
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P *et al.* The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2988.
- Greenman Y, Golani N, Gilad S, Yaron M, Limor R, Stern N. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol* 2004;60 382-8.
- Gualillo O, Lago F, Dieguez C. Introducing GOAT: a target for obesity and anti-diabetic drugs? *Trends Pharmacol Sci* 2008 Aug;29(8):398-401.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ *et al.* Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res* 1997;48:23-9.
- Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J Physiol Pharmacol* 2009 Oct;60 Suppl 3:17-35.
- Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2001;45(3):219-27.
- Haqq AM, Lien LF, Boan J, Arlotto M, Slentz CA, Muehlbauer MJ *et al.* The Study of the Effects of Diet on Metabolism and Nutrition (STEDMAN) weight loss project: Rationale and design. *Contemp Clin Trials* 2005 Dec;26(6):616-25.
- Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med* 2001; 226(11):963-77.
- Hernsdorff HH, Monteiro JB. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem? *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004 Dec;48(6):803-11.
- Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, *et al.* Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 1999 Oct 27;282(16):1568-75.
- Holt SH, Miller JC, Petocz P. An insulin index of foods: the insulin demand generated by 1000-kj portions of common foods. *Am J Clin Nutr* 1997;66(5):1264-76.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, and Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:909-13.

9 Referências

Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by posttranslational processing. *J Biol Chem* 2003;278:64-70.

Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci*. 2006;100(5):398-410.

Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI *et al*. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996;273:974-7.

Howard BV. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 1999;84(1A):28J-32J.

Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjørbaek C, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med* 2004 Jul;10(7):734-8.

Iñiguez G, Ong K, Peña V, Avila A, Dunger D, Mericq V. Fasting and post-glucose ghrelin levels in SGA infants: relationships with size and weight gain at one year of age. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Dec;87(12):5830-3.

Inui A. Ghrelin: an Orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:551-60.

Isguven P, Arslanoglu I, Erol M, Yildiz M, Adal E, Erguven M. Serum levels of ghrelin, leptin, IGF-I, IGFBP-3, insulin, thyroid hormones and cortisol in prepubertal children with iron deficiency. *Endocr J* 2007;54(6):985-90.

Janeckova R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res* 2001; 50(5):443-59.

Jenkins DJ, Jenkins AL, Wolever TM, Vuksan V, Rao AV, Thompson LU, *et al*. Low glycaemic index: lente carbohydrates and physiological effects of altered food frequency. *Am J Clin Nutr* 1994;59(Suppl 3):706-9.

Kennedy GC. The role of fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc London Biol Sci* 1953; 140(901):578-96.

Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA *et al*. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 2009 Jul;15(7):741-5.

Kojima M, Hosoda H, Date Y. Ghrelin is a growthhormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-60.

- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:118-22.
- Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. *Physiol Rev* 2005 Apr;85(2):495-522.
- Kojima M, Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ* 2008;46:89-115.
- Kojima M & Kangawa K. Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ* 2010;50:185-205.
- Korbonits M & Grossman AB. Ghrelin: update on a novel hormonal system. *Eur J Endocrinol* 2004;151(Suppl 2):S67–S70.
- Kraemer RR, Castracane VD. Exercise and humoral mediators of peripheral energy balance: ghrelin and adiponectin. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007 Feb;232(2):184-94.
- Lee BM & Wolever TMS. Effect of glucose, sucrose and fructose on plasma glucose and insulin responses in normal humans: comparison with white bread. *Eur J Clin Nutr* 1998;52(12):924-8.
- Lee YS. The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: lessons from experiments of nature. *Ann Acad Med Singapore* 2009 Jan;38(1):34-11.
- Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009 Sep;50(3):957-69.
- Méier U & Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004 Sep;50(9):1511-25.
- Mietlicki EG, Nowak EL, Daniels D. The effect of ghrelin on water intake during dipsogenic conditions. *Physiol Behav* 2009 Jan 8;96(1):37-43.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004;428:569-74.
- Mitchell SE, Nogueiras R, Morris A, Tovar S, Grant C, Cruickshank M, *et al.* Leptin receptor gene expression and number in the brain are regulated by leptin level and nutritional status. *J Physiol* 2009 Jul 15;587(Pt 14):3573-85.
- Moreno-Aliaga MJ, Stanhope KL, Havel PJ. Transcriptional regulation of the leptin promoter by insulin-stimulated glucose metabolism in 3t3-l1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:544-8.

9 Referências

- Myers MG, Cowley MA, Münzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 2008;70:537-56.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001;409:194-8.
- NCCLS. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition. Wayne, PA: NCCLS document C28-A2: 2000.
- Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol* 2004;60:153-60.
- Nogueiras R & Tschop M. Biomedicine. Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. *Science* 2005;310:985-6.
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006 Apr 5;295(13):1549-55.
- Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, Kojima M. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Aug 14;386(1):153-8.
- Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology* 2005 Feb;146(2):845-50.
- Park HS, Lee KU, Kim YS, Park CY. Relationships between fasting plasma ghrelin levels and metabolic parameters in children and adolescents. *Metabolism* 2005 Jul;54(7):925-9.
- Pi-Sunyer FX. Glycemic index and disease. *Am J Clin Nutr* 2002;76(1):290-8.
- Porte D Jr, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 2005 May;54(5):1264-76.
- Power ML & Schulkin J. Anticipatory physiological regulation in feeding biology: cephalic phase responses. *Appetite* 2008 Mar-May;50(2-3):194-206.
- Qi X, Reed J, Englander EW, Chandrashekar V, Bartke A, Greeley GH Jr. Evidence that growth hormone exerts a feedback effect on stomach ghrelin production and secretion. *Exp Biol Med* 2003;228:1028-32.

9 Referências

- Raben A & Astrup A. Leptin is influenced both by predisposition to obesity and diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24(4):450-9.
- Romero CEM & Zanesco A. The role of leptin and ghrelin on the genesis of obesity. *Rev. Nutr Campinas* 2006 jan/fev;19(1):85-91.
- Sakata I, Yang J, Lee CE, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Elmquist JK et al. Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009 Jul;297(1):E134-41.
- Sánchez J, Oliver P, Palou A, Picó C. The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology* 2004 Nov;145(11):5049-55.
- Sandoval DA & Davis SN. Leptin: metabolic control and regulation. *J Diabetes Complications* 2003 Mar-Apr;17(2):108-13. Review.
- Savastio S, Bellone S, Baldelli R, Ferraris M, Lapidari A, Zanetta F *et al.* Role of ghrelin in the regulation of appetite in children. *Minerva Pediatr* 2006 Feb;58(1):21-6.
- Savino F, Grassino EC, Fissore MF, Guidi C, Liguori SA, Silvestro L, *et al.* Ghrelin, motilin, insulin concentration in healthy infants in the first months of life: relation to fasting time and anthropometry. *Clin Endocrinol(Oxf)* 2006 Aug;65(2):158-62.
- Savino F, Fissore MF, Liguori SA, Grassino EC, Guidi C, Oggero R, Silvestro L, Miniero R. Serum ghrelin concentration, fasting time and feeding in infants. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2007 Sep;20(9):1027-33.
- Savino F, Liguori SA. Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. *Clin Nutr* 2008 Feb;27(1):42-7.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404(6778):661-71.
- Schwartz MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;222(11):978-81.
- Scott EC, Johnston FE. Critical fat, menarche, and the maintenance of menstrual cycles: a critical review. *J Adolesc Health Care* 1982 Jun;2(4):249-60.
- Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 2004 Feb;53 Suppl 1:S152-8.
- Shiyya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS *et al.* Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:240-4.

9 Referências

Small CJ & Bloom SR. Gut hormones and the control of appetite. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:259-63.

Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ *et al.* Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 1997;18:621-45.

Smith RG, Leonard R, Bailey AR, Palyha O, Feighner S, Tan C *et al.* Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine* 2001;14:9-14.

Soares JB & Moreira AFL. Ghrelin, des-acyl-ghrelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle. *Peptides* 2008;29:1255-70.

Soriano-Guillén L, Barrios V, Chowen JA, Sánchez I, Vila S, Quero J, Argente J. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr* 2004 Jan;144(1):30-5.

Stites DP, Terr AT, Parslow TG. Testes Laboratoriais Imunológicos. *Imunologia Médica*. p163-97; 2000.

Strauss S. Clara M. Davis and the wisdom of letting children choose their own diets. *CMAJ* 2006 Nov 7;175(10):1190.

Suviolahti E, Ridderstrale M, Almgren P, Klannemark M, Melander O, Calrsson E, *et al.* Pro-opiomelanocortin gene is associated with serum leptin levels in lean but not in obese individuals. *Int Obes Relat Metab Disord* 2003 Oct;27(10):1204-11.

Tanaka M, Naruo T, Nagai N, Kuroki N, Shiiya T, Nakazato M *et al.* Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J Psychiatr Res* 2003;37:17-22a.

Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tatebe Y, Nagai N, Shiiya T *et al.* Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 2003;28:829-35b.

Tanner JM. A history of the study of human growth. Cambridge, Cambridge University Press, 1981.

Tannous dit El Khoury D, Obeid O, Azar ST, Hwalla N. Variations in postprandial ghrelin status following ingestion of high-carbohydrate, high-fat, and high-protein meals in males. *Ann Nutr Metab* 2006;50(3):260-9.

Taubes G. Insulin resistance. Prosperity's plague. *Science* 2009 Jul 17;325(5938):256-60.

Teff KL, Elliott SS, Tschöp M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M *et al.* Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Jun;89(6):2963-72.

9 Referências

- Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001;50:707-9.
- Ukkola O. Peripheral regulation of food intake: new insights. *J Endocrinol Invest* 2004;27:96-8.
- Van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci* 2004;7:493-4.
- Van der Spuy ZM. Nutrition and reproduction. *Clin Obstet Gynaecol* 1985 Sep;12(3):579-604.
- Van Weemen BK & Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *Febs Letters*, 15:232-6, 1971.
- Venner AA, Doyle-Baker PK, Lyon ME, Fung TS. A meta-analysis of leptin reference ranges in the healthy paediatric prepubertal population. *Ann Clin Biochem* 2009 Jan;46(1):65-72.
- Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005 Oct;146(10):4211-6.
- Viso González ME, Solano L, Sánchez A, Portillo Z, Llovera D. Serum leptin in eutrophic and overweight Venezuelan children and adolescents. *Arch Latinoam Nutr* 2005 Mar;55(1):47-54.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978 Jun;31(6):507-20.
- Volp ACP, Rezende FAC, Alfenas RCG. Insulina: mecanismo de ação e a homeostase metabólica. *Rev Bras Nutr Clin* 2008;23(2):158-64.
- Walker M. Obesity, insulin resistance, and its link to non-insulindependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1995;44(9 Suppl 3):18-20.
- Whatmore AJ, Hall CM, Jones J, Westwood M, Clayton PE. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Nov;59(5):649-54.
- WHO Anthro for personal computers, version 3, 2009: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: (<http://www.who.int/childgrowth/software/en/>). Acesso em 05/06/2009.
- WHO AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: (<http://www.who.int/growthref/tools/en/>). Acesso em 05/06/2009.

WHO Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. (WHO Technical Reports Series;854). World Health Organization, Geneva, 1995.

WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization, 2006.

WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization, 2007.

WHO. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva, WHO, 2001.132 p.

WHO. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bulletin of the World Health Organization, 54:129-39, 1976.

Wicks D, Wright J, Rayment P, Spiller R. Impact of bitter taste on gastric motility. Eur J Gastroenterol Hepatol 2005 Sep;17(9):961-5.

Willet W, Manson J, Liu S. Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes. Am J Clin Nutr 2002;76(Suppl):274S-80.

Woods SC, Chavez M, Park CR, Riedy C, Kaiyala K, Richardson RD, *et al.* The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain. Neurosci Biobehav Rev 1996;20(1):139-44.

World Health Organization. A growth chart for international use in maternal and child health care. Guidelines for primary health personnel. Geneva: World Health Organization, 1978.

World Health Organization Working Group on Infant Growth. An evaluation of infant growth. Geneva: World Health Organization, 1994.

World Health Organization. Training Course on Child Growth Assessment. Geneva, WHO, 2008.

Wynne K, Stanley S, Bloom S. The gut and regulation of body weight. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:576-2582.

Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. Cell 2008 Feb 8;132(3):387-96.

9 Referências

Zhang W, Lin TR, Hu Y, Fan Y, Zhao L, Stuenkel EL, Mulholland MW. Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol* 2004 Sep 15;559(Pt 3):729-37.

Zhang YY, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature* 1994; 372(6505):425-32.

10 Artigo

GHRELIN, LEPTIN, INSULIN AND GLUCOSE IN

HEALTHY CHILDREN AGED 4-128 MONTHS

GHRELIN, LEPTIN, INSULIN AND GLUCOSE IN HEALTHY CHILDREN AGED 4-128 MONTHS

*Maria Inês A. Wilasco⁽¹⁾, Helena A. S. Goldani⁽²⁾, Cristina T. L. Dornelles⁽³⁾,
Rafael L. Maurer⁽⁴⁾, Carlos O. Kieling⁽⁵⁾, Marilene P. Garrido⁽⁶⁾, Themis R. Silveira⁽⁷⁾

- ⁽¹⁾ Clinical Dietitian, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Email: ineswilasco@terra.com.br
- ⁽²⁾ MD, PhD, Department of Pediatrics, Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Medical. Email: hgoldani@hcpa.ufrgs.br
- ⁽³⁾ Clinical Dietitian, MSc, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. E-mail: cleal@hcpa.ufrgs.br
- ⁽⁴⁾ Biologist, MSc, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. E-mail: rmaurer@hcpa.ufrgs.br
- ⁽⁵⁾ MD, MSc, Pediatric Gastroenterology Unit and Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: ckieling@hcpa.ufrgs.br
- ⁽⁶⁾ Biologist, PhD, Professor of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology. E-mail: marilene Garrido@puers.br
- ⁽⁷⁾ MD, PhD. Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Department of Pediatrics, Univeridade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: themisrs@terra.com.br

Short title: Ghrelin, leptin and insulin in healthy children.

Key words: ghrelin, leptin, insulin, children, healthy children

Financial disclosure: no conflict of interest is declared by all authors.

***Corresponding author:** Maria Inês A. Wilasco. Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brazil. Tel: (55 51) 3359 8847, fax: (55-51) 3359 8183 E-mail: ineswilasco@terra.com.br

ABSTRACT

Objective: this study aimed to assess the plasma ghrelin, acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, serum leptin, insulin and glucose; and compare with age groups, gender and anthropometric parameters in healthy children aged 4-128 months.

Methods: Data from 111 children aged 4 months to 10 years were studied. All participants underwent a clinical evaluation to rule out any unhealthy condition and all have body mass index (BMI)-for-age values within -2.0 and +2.0 SD limits for children under 5 years and within -2.0 and +1.0 SD limits for children over 5 years. Children were separated in 3 age groups: 0-24 months, 25-60 months and over 60 months. Blood samples were collected to assay ghrelin, leptin, insulin and glucose.

Results: Total and acyl ghrelin, leptin, insulin were detected in all samples with a median (25-75 centile) concentration in the whole group of 1.374 (949-1.875) pg/mL, 288 (212-450) pg/mL, 1.53 (1.11-2.77) ng/mL and 15.5 (12.1-23.5) μ U/mL, respectively. Mean (SD) serum Glucose concentration was 88.6 ± 13.1 mg/dL. Ghrelin showed an inverse correlation with age ($r_s = -0.475$, $P < 0.001$). Leptin was directly correlated with BMI ($r_s = 0.429$, $P < 0.001$) and girls ($r_s = 0.39$; $P = 0.004$). Insulin and glucose did not correlate with any variable of the study.

Conclusions: this study showed that plasma ghrelin was negatively correlated with age in healthy children and leptin was correlated with gender and BMI. This might be useful to provide data in healthy children to further comparison with children with chronic diseases that affect appetite and feeding behavior.

INTRODUCTION

Ghrelin is a peptide hormone with a potent orexigenic effect, mainly produced in the stomach. It is transported to the hypothalamus via the vagus nerve, where participates in neuroendocrine processes that control appetite and the secretion of growth hormone and is part of complex gut-brain axis that modulates appetite, digestion, gut motility, adiposity and energy partition (1-5). Serum leptin may reflect body fat mass in adults and children (6-9), and might be considered as a reliable marker of fat, body mass and energy balance (10). Nutritional programming can be related to alterations of serum leptin due to overnutrition or undernutrition during the perinatal period and this may determinate metabolic changes during adolescence and adulthood (11, 12). Insulin is an anabolic hormone produced in the pancreas and is one of the hormones responsible for regulating food intake and energy expenditure, and acts in the hypothalamus where interacts with neurotransmitters involved in the mechanisms that control satiety and hunger (13). Leptin and insulin have inhibitory effects on food intake and increase energy expenditure (14)

Ghrelin, leptin and insulin are hormones related to regulation of food intake and, consequently, body weight control. Many hormones are involved in food intake and energy balance, but only few studies were done in well-nourished children (15, 16). Normal values of these hormones are subject to a great variability and a standardized database is needed. Thus, this study aimed to assess the plasma ghrelin, acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, serum leptin, insulin and glucose; and compare with age groups, gender and anthropometric parameters in healthy children aged 0-10 years.

SUBJECTS AND METHODS

This study was approved by the Research Ethical Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Informed and written consent was obtained from all subjects' parents.

From December 2006 to March 2009, 111 healthy subjects aged 4 months to 10 years were eligible to participate in this study. Subjects were enrolled from Pediatric outpatient specialty clinics of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Southern of Brazil.

Inclusion criteria were healthy patients who had been scheduled for blood sampling as routine medical check up or as standard assessment prior to eligible minimal surgeries such as insertion of otologic ventilation tubes, excision of benign nevus, surgery to correct inguinal hernia and hypospadias. Exclusion criteria were as follows: birth at gestational age lower than 37 weeks for children aged under 2 years; gestational age lower than 28 weeks for children aged under 3 years; current use of any restricted diet; any chronic or acute disease; use of any medication except for iron and oral vitamins currently recommended as routine practice; impossibility to anthropometry assessment; body mass index (BMI)-for-age values out of -2.0 and +2.0 SD limits for children under 5 years (17) and out of -2.0 and +1.0 SD limits for children over 5 years (18); and lack of appropriate fasting period prior to blood collection.

Children were separated in 3 age groups: 0-24 months, 25-60 months and over 60 months. The first group represents infants who were more likely to be breastfed whereas the second and the third were conveniently separated to further comparison with anthropometry reference curves (17, 18).

Anthropometry assessment

Anthropometry was measured by the same researcher following the WHO training course on child growth assessment (19). The variables were presented as z-scores for height

for age ratio (H/A), BMI for age ratio (BMI/A), triceps skinfold thickness-for-age ratio (TSF/A), subscapular skinfold thickness-for-age ratio (SSF/A), mid upper arm circumference-for-age ratio (MUAC/A) according to WHO standards (17). WHO *Antho* software version 3.0 was used for children under 5 years of age (20). WHO *AnthoPlus* software was used for 5 to 19-year growth reference data 2007 (21). Frisancho 2008 (22) was used to calculate MUAC/A, TSF/A, and SSF/A for children above 5 years.

Blood samples and hormone assays

Peripheral blood samples were collected from all patients following a fasting period of 3-14 hours. Plasma and serum samples were stored at -80° C until measurement. To ghrelin determinations the blood was taken into tubes containing EDTA-2Na (1.25 mg/mL) and aprotinin (500 U/mL). The tubes were centrifuged immediately, acidified and stored. To leptin, insulin and glucose determinations the blood was taken into serum tubes, centrifuged and stored. Total ghrelin, acyl ghrelin and leptin concentrations were assessed by ELISA commercial kit (Linco Research, St Charles-MI, USA). Insulin were assessed using ELISA commercial kit (Diagnostics Systems Laboratories, INC Webster-TX, USA) and glucose were measured using glucose oxidase method GlicosePAP liquiform[®] (Labtest Diagnóstica – Lagoa Santa-MG, Brazil).

Statistical analysis

The program used for statistical analysis was SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 16.0 (Chicago, IL). Continuous variables were expressed as mean \pm SD or median and interquartile range (25th and 75th centiles). Normal distribution of variables was checked by Kolmogorov-Smirnov test. Variables with normal distribution were compared by Student's *t* test and analysis of variance (ANOVA). Variables with asymmetric distribution

were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests. Correlation between continuous variables was assessed by Pearson or Spearman correlation coefficient test. Multiple linear regression analysis was used to associate total ghrelin with age, acyl ghrelin with age and Z-SSF/A, desacyl ghrelin with age, leptin with age, Z-BMI/A, Z-H/A and gender. The following comparisons were excluded by stepwise model: total ghrelin with Z-MUAC/A, acyl ghrelin Z-with MUAC/A, des-acyl ghrelin with Z-MUAC/A; leptin with Z-MUAC/A, leptin with Z-TSF , and leptin with Z-SSF.

RESULTS

Overall median age (25-75th centiles) of subjects was 60.0 (35.0-91.0) months. The majority of the subjects were over 60 months of age and gender was equally distributed. The youngest child was 4 months old and the oldest was 128 months old. Only 10% of children were currently on iron and vitamin medications. Median (25-75th centiles) fasting time was 240 (200-605) min. Mean (\pm SD) hemoglobin and hematocrit values were 12.2 ± 0.7 g/dL and $36.7 \pm 2.1\%$, respectively. Values of total ghrelin, acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, leptin, insulin and glucose were described on table 1.

In regard of z-score of anthropometry results according to gender distribution, Z-BMI/A, Z-MUAC/A, Z-TSF/A, Z-SSF/A values were within -2.0 and +2.0 SD for children under 5 years and within -2.0 and +1.0 SD for children over 5 years. The z-score of Z-H/A was within -2.0 and +2.0 SD (table 2).

The values of total ghrelin, acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, leptin, insulin and glucose in the 3 age groups separated by gender are presented on table 3. The concentrations of total ghrelin and des-acyl ghrelin were significantly lower in boys above 60 months when

compared with boys under 24 months of age. The concentrations of total ghrelin and des-acyl ghrelin were significantly lower in girls above 60 months when compared with girls from the other 2 groups. Leptin values were not significantly different among the 3 age groups in boys. Leptin was higher in girls aged above five years when compared with girls under 2 years [2.77 (1.31-4.79) ng/mL vs 1.37 (0.90-2.15) ng/mL, $P = 0.039$]. Insulin and glucose were not significantly different among the 3 age groups in boys and girls.

There was a significant negative correlation between total ghrelin values and age ($r_s = -0.475$; $P < 0.001$). There was no correlation between total ghrelin levels and BMI ($r_s = -0.02$; $P = 0.822$). There was no correlation between leptin levels and age in the whole group ($r_s = 0.190$; $P = 0.046$), but a weak significant positive correlation in girls ($r_s = 0.39$; $P = 0.004$) and a moderate correlation between leptin and BMI ($r_s = 0.43$; $P \leq 0.001$) (figure 1). Values of leptin were significantly lower in boys (1.48 vs 2.31; $P = 0.007$) (figure 2).

The values of total ghrelin, acyl ghrelin, leptin and insulin in boys and girls separated in the 3 age groups are presented on table 4 according to percentile distribution.

DISCUSSION

This study assessed fasting concentration of total ghrelin, acyl ghrelin, leptin, insulin and glucose in 111 well-nourished healthy children. The two main findings of the study were an inverse correlation between ghrelin and age and a direct correlation between leptin with anthropometric parameters and gender. Insulin and glucose did not correlate with any variable of the study.

Ghrelin has already been studied throughout newborn to adulthood; nevertheless only few studies have shown a range of normal values at different ages (6, 15, 16, 23). Therefore,

the following points highlight the strength of our study. First, it was made in a very selected healthy well-nourished population, following a rigorous selection criteria which did not include overweight and/or obese children as has been done by others (6, 7, 24, 25). Second, we collected blood samples with a specific fasting period whereas others did without a fasting period (23). Third, this is the first study to determine more than one ghrelin isoform in addition simultaneously with leptin, insulin and glucose.

In this study, a significant fall in ghrelin levels was found according to age. A similar trend has been reported in a group of 121 healthy children aged 5-19 years (23), in whom samples were taken without fasting. The difference between that study and our data is likely to be related to the non-fasting conditions under which their samples were taken. In regard of gender distribution, ghrelin levels have been found higher in boys than girls (6). The difference between those studies and ours is likely due to the heterogeneity of the samples. It's not yet fully clarified the mechanisms that regulate the secretion of ghrelin, but one of the most important factors that regulate its secretion seems to be related to feeding (2).

It is well known that ghrelin plays a role in the regulation of long-term energy balance and body weight control. Our observation of a negative correlation between ghrelin concentration and age could support the hypothesis that in infancy, ghrelin may exert a strong growth hormone releasing action to promote body growth. It has already been found a significant ghrelin increase after birth peaking during the first two years of life, then a decrease until the end of puberty (15).

A recent study showed that during periods of energy insufficiency, exposure to acyl ghrelin may limit energy utilization in specific white adipose tissue depots by lipid retention dependent on GH secretagogue receptors (26). In accordance with this finding, ghrelin concentration has been found low in obese patients (27, 28). In our study, we selected only subjects with scores under +1.00 for children aged above 5 years and under +2 for children

under 5 years (17, 18) that means, overweighted and obese subjects were not included in our study.

Leptin may be affected by many variables including gender, pubertal stage, weight, diet and the analysis technique (29). A study that recruited well-nourished children has shown higher leptin values than ours and this might indicate inclusion of advanced pubertal stage in children up to 15-years (16) whilst our population was under 10 years old. It has been described that deficient leptin patients like all types of food, even those which are usually not appreciated by children at the same age. The administration of leptin in these patients changed this behavior making them more selective to food (30). These findings may indicate that leptin is involved in the reward properties of food, thus this may mean that appetite has individual variation and might be associated with a higher susceptibility to obesity.

We identified a positive correlation between serum leptin with gender and anthropometric parameters (Z-BMI, Z-H/A, Z-MUAC, Z-TSF and Z-SSF). This is in accordance with other studies where leptin values showed parallel changes in nutritional status and energy storage across a broad range of nutritional status, from starvation to obesity (9, 31). Furthermore, a significant correlation between all anthropometric parameters is consistent with the literature, since these parameters reflect higher adipose tissue. In the multivariate analysis leptin was significantly associated with age, female gender, Z-BMI/A and Z-H/A. It means that higher leptin is detected in older, taller, higher BMI and female children.

Insulin increases glycogen form storage of glucose in liver and muscle, decreases lipolysis and gluconeogenesis, and increases fatty acid synthesis by adipose tissue (32). The net result is to lower blood glucose concentration by increasing the conversion of glucose to glycogen and fat and decreasing the production of glucose from the liver (33).

Our study had some limitations as we had a small amount of patients aged 0-2 years. Furthermore, we did not evaluate tanner stages although some might have been started puberty as maximum age was 10 years old. Nevertheless, we believe this is not a major limitation to the results we found.

In conclusion, we have shown that plasma ghrelin was negatively correlated with age in healthy well-nourished children. Leptin was correlated with gender and BMI. This study could be useful to provide data for database standardization of ghrelin, leptin and insulin in healthy children. Moreover, this study might be helpful to further comparison with children with chronic diseases that affect appetite and feeding behavior

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the financial support received from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE), Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

REFERENCES

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y. Ghrelin is a growthhormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-60.
2. Kojima M, Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ* 2008;46:89-115.
3. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: From Gene to Physiological Function. *Results Probl Cell Differ*. 2009 Oct 27.
4. Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, Lee SD, Inui A. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev*. 2009 Dec;61(4):430-81.
5. De Vriese C, Perret J, Delporte C. Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition*. 2010 Jan 14.
6. Park HS, Lee KU, Kim YS, Park CY. Relationships between fasting plasma ghrelin levels and metabolic parameters in children and adolescents. *Metabolism*. 2005 Jul;54(7):925-9.
7. Viso González ME, Solano L, Sánchez A, Portillo Z, Llovera D. Serum leptin in eutrophic and overweight Venezuelan children and adolescents. *Arch Latinoam Nutr* 2005 Mar;55(1):47-54.
8. Considine R, Sinha M, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-5.
9. Nagy TR, Gower BA, Trowbridge CA, et al. Effects of gender, ethnicity, body composition, and fat distribution on serum leptin concentrations in children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2148-52.
10. Schwartz MW & Morton GJ. Obesity: keeping hunger at bay. *Nature*. 2002 Aug 8;418(6898):595-7.
11. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005 Oct;146(10):4211-6.
12. Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J Physiol Pharmacol* 2009 Oct;60 Suppl 3:17-35.
13. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404(6778):661-71.
14. Zhang YY, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature* 1994; 372(6505):425-32.

15. Soriano-Guillén L, Barrios V, Chowen JA, Sánchez I, Vila S, Quero J, Argente J. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr*. 2004 Jan;144(1):30-5.
16. Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Sep;82(9):2849-55.
17. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization, 2006.
18. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization, 2007.
19. World Health Organization. Training Course on Child Growth Assessment. Geneva, WHO, 2008.
20. WHO Anthro for personal computers, version 3, 2009: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>.
21. WHO AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/growthref/tools/en/>.
22. Frisancho AR. Anthropometric standards: an interactive nutritional reference of body composition for children and adults. Ann Arbor The University of Michigan Press 2008;149-55.
23. Whatmore AJ, Hall CM, Jones J, Westwood M, Clayton PE. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Nov;59(5):649-54.
24. Bjarnason R, Boguszewski M, Dahlgren J, Gelander L, Kriström B, Rosberg S, et al. Leptin levels are strongly correlated with those of GH-binding protein in prepubertal children. *Eur J Endocrinol* 1997 Jul;137(1):68-73.
25. Coutant R, Lahlou N, Bouvattier C, Bougnères P. Circulating leptin level and growth hormone response to stimulation tests in obese and normal children. *Eur J Endocrinol* 1998 Dec;139(6):591-7.
26. Davies JS, Kotokorpi P, Eccles SR, Barnes SK, Tokarczuk PF, Allen SK et al. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol Endocrinol*. 2009 Jun;23(6):914-24.
27. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001;50:707-709.

28. Haqq AM, Lien LF, Boan J, Arlotto M, Slentz CA, Muehlbauer MJ, Rochon J, Gallup D, McMahon RL, Bain JR, Stevens R, Millington D, Butler MD, Newgard CB, Svetkey LP. The Study of the Effects of Diet on Metabolism and Nutrition (STEDMAN) weight loss project: Rationale and design. *Contemp Clin Trials*. 2005 Dec;26(6):616-25.
29. Venner AA, Doyle-Baker PK, Lyon ME, Fung TS. A meta-analysis of leptin reference ranges in the healthy paediatric prepubertal population. *Ann Clin Biochem* 2009 Jan;46(1):65-72.
30. Farooqi IS, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2009 Mar;89(3):980S-984S.
31. Büyükgebiz B, Öztürk Y, Yılmaz S, Arslan N, 2003. Serum leptin concentration in children with mild-to-moderate proteinenergy malnutrition. *Pediatr Int*, 45: 550-554.
32. Porte D Jr, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 2005 May;54(5):1264-76.
33. Power ML & Schulkin J. Anticipatory physiological regulation in feeding biology: cephalic phase responses. *Appetite* 2008 Mar-May;50(2-3):194-206.

Table 1 - Demographic data of subjects

Variables	n = 111
Age (months)	60.0 (35.0 – 91.0)
Age groups (months)	
≤ 24 ^(a)	20 (18.0)
25 – 60	37 (33.3)
61 - 128	54 (48.6)
Gender	
Male	59 (53.2)
Female	52 (46.8)
Indication to blood collection	
Medical check up	64 (57.7)
eligible minimal surgery ^(b)	47 (42.3)
Iron and vitamin prophylaxis	
None	99 (89.2)
Iron	10 (9.0)
Iron + vitamin	2 (1.2)
Fasting time (min)	240 (200 – 605)
Hemoglobin (mg/dL)	12.2 ± 0.7
Hematocrit (%) – n = 110	36.7 ± 2.1
Ghrelin (pg/mL)	
Total ghrelin	1374 (949 – 1875)
Acyl ghrelin	288 (212 – 450)
Acyl ghrelin %	24.5 ± 7.9
Des- acyl ghrelin ^(c)	1086 (711 – 1393)
Des- acyl ghrelin %	75.5 ± 7.9
Leptin (ng/mL)	1.53 (1.11 – 2.77)
Insulin (μU/mL)	15.5 (12.1 – 23.5)
Glucose (mg/dL)	88.6 ± 13.1

Data were expressed as mean ± (SD), median (P25-P75) or total number (%); ^a: Minimum age: 4 months; ^(b) Eligible minimal surgeries: insertion of otologic ventilation tubes, excision of benign nevus, hypospadias, inguinal hernia; ^(c) Calculated subtracting acyl ghrelin from total ghrelin.

Table 2 - Anthropometric features of the sample

Variables	Gender	H/A-Z	BMI/A-Z	MUAC/A-Z	TSF/A-Z	SSF/A-Z
Total n = 111	M (n = 59)	0.03 ± 1.00	-0.14 ± 0.80	-0.16 ± 0.75	0.07 ± 0.62	-0.08 ± 0.60
	F (n = 52)	0.11 ± 1.00	-0.10 ± 0.80	0.32 ± 0.48	0.10 ± 0.66	-0.04 ± 0.64
≤ 24 months^(a) n = 20	M (n = 10)	0.79 ± 0.89	-0.15 ± 0.75	0.25 ± 0.68	0.36 ± 0.81	-0.18 ± 0.93
	F (n = 10)	0.16 ± 1.38	-0.13 ± 0.65	0.31 ± 0.57	0.38 ± 0.83	0.49 ± 0.67
25-60 months n = 37	M (n = 22)	-0.34 ± 0.78	0.13 ± 0.73	0.23 ± 0.56	0.19 ± 0.45	0.00 ± 0.58
	F (n = 15)	-0.04 ± 0.80	0.30 ± 0.72	0.56 ± 0.44	0.40 ± 0.74	-0.14 ± 0.85
61-128 months n = 54	M (n = 27)	0.05 ± 1.05	-0.35 ± 0.84	-0.63 ± 0.65	-0.12 ± 0.62	-0.12 ± 0.48
	F (n = 27)	0.17 ± 1.06	-0.30 ± 0.84	0.18 ± 0.43	-0.17 ± 0.40	-0.18 ± 0.33

H/A-Z: z-scores of height for age; **BMI-Z:** z-scores of body mass index for age; **TSF-Z:** z-scores for triceps skinfold for age; **MUAC-Z:** z-scores of middle upper arm circumference for age; **SSF-Z:** z-scores of subscapular skinfold for age; **M:** male; **F:** female; ^a: Minimum age: 4 months

Tabela 3 - Hormones and glucose among age groups and gender

Variables	< 24 months ^(*)	25 - 60 months	61 - 128 months	P
MALE	n = 10	n = 22	n = 27	
Ghrelin (pg/mL)				
Total ghrelin	1950 (1576-2922) ^b	1432 (1000-2078) ^{a,b}	1155 (795-1551) ^a	0.007 ^(†)
Acyl ghrelin	322 (275-735)	313 (185-617)	280 (179-421)	0.288 ^(†)
Des-acyl ghrelin ^(*)	1649 (1241-2145) ^b	1192 (792-1687) ^{a,b}	913 (515-1231) ^a	0.003 ^(†)
Leptin (ng/mL)	2.15 (0.93-2.64)	1.50 (1.16-1.63)	1.33 (0.91-2.53)	0.657 ^(†)
Insulin (μU/mL)	23.5 (13.5-33.8)	17.6 (10.4-24.1)	13.5 (5.0-20.6)	0.112 ^(†)
Glucose (mg/dL)	87 ± 7.9	86.2 ± 14.4	92.6 ± 15.2	0.262 ^(††)
FEMALE	n = 10	n = 15	n = 27	
Ghrelin (pg/mL)				
Total ghrelin	1587 (1003-2167) ^b	1540 (1184-2160) ^b	1133 (897-1402) ^a	0.021 ^(†)
Acyl ghrelin	304 (246-652)	392 (222-523)	272 (185-336)	0.112 ^(†)
Des-acyl ghrelin ^(*)	1343 (780-1609) ^b	1173 (983-1638) ^b	900 (645-1138) ^a	0.013 ^(†)
Leptin (ng/mL)	1.37 (0.90-2.15) ^a	2.34 (1.21-3.32) ^{a,b}	2.77 (1.31-4.79) ^b	0.039 ^(†)
Insulin (μU/mL)	16.5 (12.3-21.4)	17.7 (13.4-21.1)	14.1 (12.1-19.8)	0.359 ^(†)
Glucose (mg/dL)	84.1 ± 11.8	90.7 ± 14.1	87.7 ± 10.7	0.411 ^(††)

Data were expressed as mean (± SD) or median (P25 - P75). ^(*) Minimum age: 4 months.

^(**) Calculated subtracting acyl ghrelin from total ghrelin. ^(†) Kruskal-Wallis test, ^(††) ANOVA-one-way.

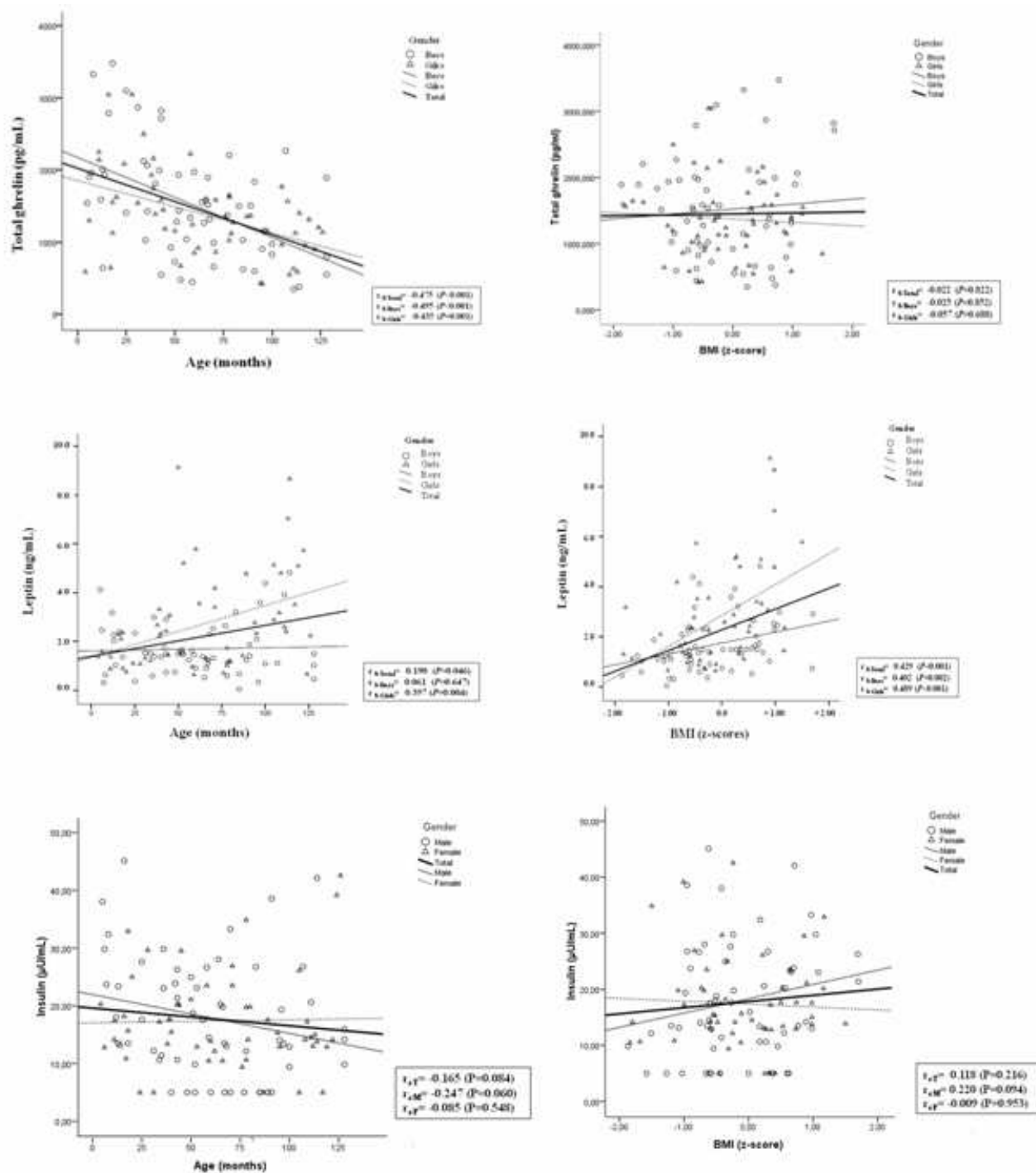
^{a, b}, Equal letters mean no significant difference by Mann-Whitney U test.

Table 4 - Percentile distribution of total ghrelin, acyl ghrelin, leptin and insulin in boys and girls

Total ghrelin (pg/mL)		P3	P25	P50	P75	P97
≤ 24 months*	M	638	1576	1950	2922	1576
	F	585	1003	1587	2167	1003
25-60 months	M	445	1000	1432	2078	1000
	F	669	1184	1540	2160	1184
61 -128 months	M	346	795	1155	1551	795
	F	418	897	1135	1402	897
Acyl ghrelin (pg/mL)		P3	P25	P50	P75	P97
≤ 24 months*	M	108	275	322	735	792
	F	71	246	304	652	756
25-60 months	M	107	185	313	617	1053
	F	117	222	392	523	1098
61-128 months	M	90	179	280	421	583
	F	98	185	272	336	529
Leptin (ng/mL)		P3	P25	P50	P75	P97
≤ 24 months*	M	0.31	0.93	2.15	2.64	4.12
	F	0.76	0.90	1.37	2.14	2.36
25-60 months	M	0.37	1.17	1.49	1.63	2.98
	F	0.65	1.21	2.34	3.32	9.13
61-128 months	M	0.05	0.91	1.33	2.53	4.82
	F	0.66	1.31	2.77	4.79	8.67
Insulin (μU/mL)		P3	P25	P50	P75	P97
≤ 24 months*	M	13.1	13.5	23.5	33.8	45.1
	F	5.0	12.3	16.5	21.4	32.9
25-60 months	M	5.0	10.4	17.6	24.1	29.8
	F	5.0	13.4	17.6	21.1	29.7
61-128 months	M	5.0	5.0	13.5	20.6	42.1
	F	5.0	12.1	14.1	19.8	42.6

P: percentile ; **M:** male; **F:** female; *minimum age: 4 months

10 Artigo: Ghrelin, leptin, insulin and glucose in healthy children aged 4-128 months



r_s = Spearman's correlation coefficient; T = total group; M = male; F = female

Figure 1 - Correlations between hormones and glucose with age and BMI.

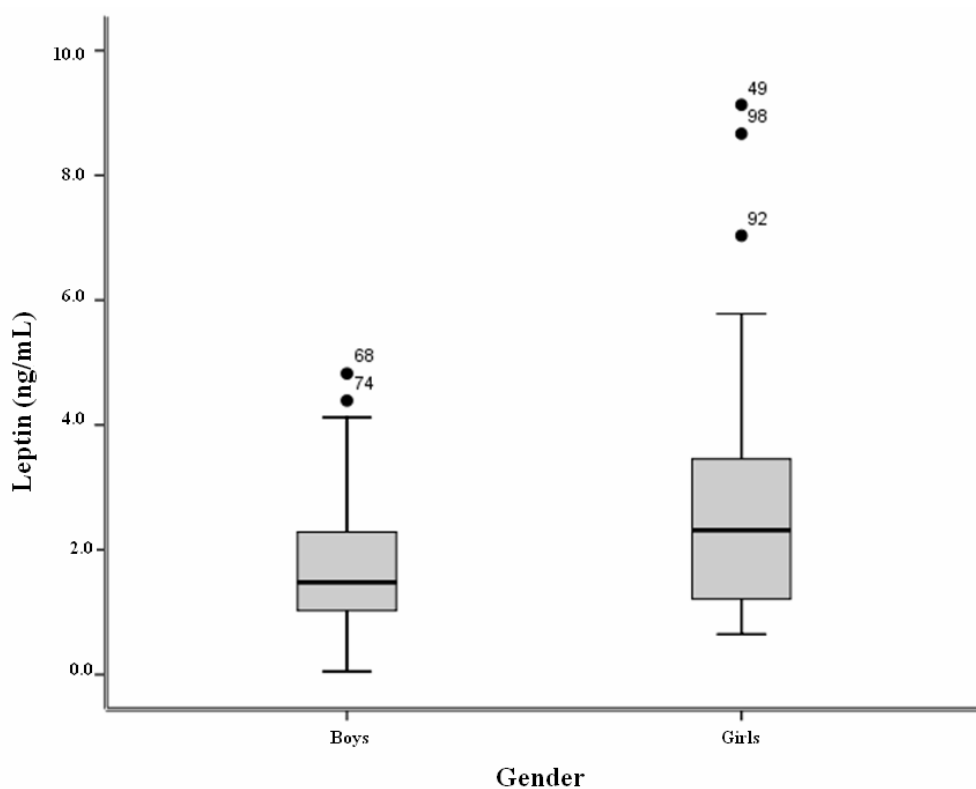


Figure 2 - Leptin levels in boys and girls. There was a significant difference between girls and boys ($P = 0.007$; Student's t test).

11 ANEXOS

ANEXO 1

Termo de consentimento livre e esclarecido

Nome do estudo

Avaliação dos níveis plasmáticos de grelina e leptina em crianças eutróficas.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Pesquisadores responsáveis: Dra. Themis Reverbel da Silveira e Nutricionista Maria Inês de Albuquerque Wilasco

Telefones para contato: Dra. Themis (51-2101 8350) e Nutricionista Maria Inês (51- 9808 1209)

1. Justificativa e objetivo deste estudo:

A GRELINA é um hormônio que aumenta o apetite e a LEPTINA diminui o apetite. Pelo exame de sangue podemos saber se esses hormônios estão diminuídos ou não no organismo.

A proposta deste estudo é medir no sangue a quantidade dos hormônios envolvidos na fome, verificar peso, comprimento ou estatura, circunferência do braço, prega cutânea tricipital e subescapular.

2. Procedimento:

Será coletado 2 ml de sangue para dosagem dos hormônios das crianças em acompanhamento ambulatorial do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que necessitarão fazer coleta de sangue para o seu devido tratamento ou revisão de saúde. Não será realizada coleta adicional. Também será verificado peso, comprimento ou estatura, circunferência do braço, prega cutânea tricipital e prega subescapular.

3. Possíveis riscos e desconfortos:

Os riscos e desconfortos são aqueles associados à coleta de sangue de rotina: dor ou sintomas locais de desconforto.

4. Possíveis benefícios deste estudo:

O entendimento dos hormônios que agem no controle da fome poderá, no futuro, beneficiar outros indivíduos, atuando na prevenção da desnutrição e obesidade.

5. Direito de desistência:

A participação no estudo é inteiramente voluntária, podendo desistir de participar em qualquer momento, sem prejuízos no atendimento médico e nutricional.

6. Confidencialidade:

As informações e identidade das crianças e dos pais serão consideradas, confidenciais e utilizadas apenas com finalidade científica.

7. Perguntas:

Uma das pesquisadoras responsável discutiu as informações e ofereceu-se para responder perguntas e/ou dúvidas. No decorrer do estudo, poderei contatá-la no fone: 2101 7611.

8. Consentimento:

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa.

Autorizo o armazenamento do sangue coletado por até 5 anos.

Só serão realizadas outras pesquisas, após aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa.

() SIM () NÃO

ASSINATURA DO(A) RESPONSÁVEL PELA CRIANÇA: _____

Assinatura do(a) participante (acima 7 anos): _____

Assinatura do investigador responsável: _____

Porto Alegre, ____ / ____ / ____

ANEXO 2

Ficha com a avaliação clínica e os dados obtidos no prontuário

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Ficha nº: _____ G/L: _____

Nome do paciente: _____ Inclusão ()

Nome do responsável: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Telefones de contato: _____

Motivo do exame: _____ ()

Data da avaliação: ____ / ____ / ____ . Idade: _____ . Idade OMS: _____

REGISTRO: _____ . Sexo: () M. () F () Sexo OMS: ()

Grupo racial: () caucasiano () ã caucasiano () Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

Motivo do exame: _____ ()

Hemoglobina: _____ . Hematócrito: _____ . Eosinófilo perc: _____ .

Medicação: _____ ()

Hora da coleta: _____ : _____ . Última refeição: _____ : _____ . Jejum: _____ .

Grelina: _____ Leptina: _____ .

Idade Gestacional: _____ Peso do nascimento: _____ . Comprimento Nasc: _____ .

Peso: _____ . Comprimento: _____ . Estatura: _____ .

	Percentil	Escore-Z
P/E		
P/I		
E/I		

Classificação estado nutricional: _____

CB: _____ cm _____ CB_Z: _____ CB_P: _____

PCT: _____ mm _____ PCT_Z: _____ PCT_P: _____

PCS: _____ mm _____ PCS_Z: _____ PCS_P: _____

IMC: _____ Kg/m² _____ IMC_Z: _____ IMC_P: _____

Critérios de exclusão:

Sim Não

Processo infeccioso agudo nos últimos 7 dias (1) (2)

Doença Hepática ou Doença Crônica (1) (2)

Dieta para controle do peso nos últimos 30 dias (1) (2)

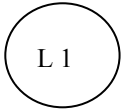
Idade gestacional ≤ 37 semanas (1) (2)

Uso de medicamentos (1) (2)

Recebimento de sangue ou hemoderivados nos últimos 30 dias (1) (2)


ANEXO 3

**Protocolo de coleta e armazenamento soro
(leptina, insulina e glicose)**

1º	Escrever SORO no tubo de vidro (com a caneta apropriada) e tampá-lo com a tampa branca para facilitar a identificação. Utilizar somente materiais esterilizados em autoclave. Fazer esse procedimento em vários tubos e com antecedência para agilizar as coletas.
2º	Identificar o tubo de vidro com nome do paciente, nº do prontuário, data e hora da coleta.
3º	Colocar o sangue coletado (\pm 1,5 ml) e tampar o tubo.
4º	Colocar no isopor com gelo reciclável (gel).
5º	Deixar na bancada por 30 – 45 min até reter o coágulo (fica uma massa gelatinosa em cima).
6º	Colocar na centrífuga refrigerada (4° C) por 15 min a 1.500 xg ou 3.000 RPM. *Vai ficar em duas fases: <u>Em cima</u> SORO <u>Em baixo</u> elementos figurados (hemácias/leucócitos/plaquetas) *Cada 1 ml de sangue gera \pm 500 de soro.
7º	Pipetar o sobrenadante (SORO) e transferir para o microtubo.
8º	Preencher a etiqueta retangular a lápis. Enrolar com durex. <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> Maria da Silva Silveira 12345/6 01/02/06 </div> Preencher a etiqueta redonda a lápis com L e o nº seqüencial do paciente. Colar na parte superior do microtubo. <div style="text-align: center; margin: 10px auto;">  </div>
9º	Colocar o microtubo direto no freezer a – 80° C

ANEXO 4

Protocolo de coleta e armazenamento do plasma (grelina)

1º	<p>Preparar os tubos de vidro:</p> <p>Para 1,0 ml de sangue: colocar: 50 µl de Aprotinina + 15 µl de EDTA 2Na</p> <p>Para 1,5 ml de sangue: colocar: 75 µl de Aprotinina + 22,5 µl de EDTA 2Na</p> <p>Escrever GRE e 1,0/1,5 (com a caneta apropriada) em cada tubo e tampá-los com a tampa marrom para facilitar a identificação. Levar ao agitador por alguns segundos. Utilizar somente materiais esterilizados em autoclave. Fazer vários tubos com antecedência para agilizar a coleta.</p>
2º	Identificar o tubo com nome do paciente, nº do prontuário, data e hora da coleta.
3º	Colocar o sangue coletado e tampar o tubo.
4º	Fazer movimentos de inversão, gentilmente, por oito vezes (para misturar o sangue com o anticoagulante).
5º	Colocar no isopor com gelo reciclável (gel).
6º	<p>Colocar na centrífuga refrigerada (4º C) por 10 min a 1.500 xg ou 3.000 RPM.</p> <p>*Vai ficar em duas fases:</p> <p><u>Em cima</u>: PLASMA</p> <p><u>Em baixo</u>: elementos figurados (hemácias/leucócitos/plaquetas)</p> <p>*Cada 1 ml de sangue gera ± 500 de plasma.</p> <p>*Verificar a quantidade de soro e adicionar o HCl (1 mol/L) 100 µl/ml de sangue.</p> <p>Ex: 500 µl de soro adicionar 50 µl HCl</p> <p>600 µl de soro adicionar 60 µl HCl</p> <p>700 µl de soro adicionar 70 µl HCl</p>
7º	Pipetar o sobrenadante (PLASMA) e transferir para o microtubo.
8º	Adicionar o HCl conforme a quantidade de plasma que foi pipetada.
9º	Agitar ou colocar no Vortex alguns segundos.
10º	<p>Preencher a etiqueta retangular a lápis. Enrolar com durex.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> <p>Maria da Silva Silveira 12345/6 01/02/06</p> </div> <p>Preencher a etiqueta redonda a lápis com G e o nº seqüencial do paciente. Colar na parte superior do microtubo.</p> <div style="text-align: center; margin: 10px auto;">  </div>
11º	Colocar o microtubo direto no freezer a – 80°C.

ANEXO 5

Procedimento do teste grelina total

1. Fazer o desenho da placa, conforme anexo 12.
2. Diluir os padrões.
Identificar 5 microtubos: 100 pg/ml – 200 pg/ml – 500 pg/ml – 1.000 pg/ml – 2.000 pg/ml
No 100 adicionar 0,980 ml de tampão de ensaio (TE) + 0,020 ml de padrão 5 ng/ml, para obter o padrão 100 pg/ml.
No 200 adicionar 0,960 ml de TE + 0,040 ml de padrão 5 ng/ml, para obter o padrão 200 pg/ml.
No 500 adicionar 0,900 ml de tampão de ensaio (TE) + 0,100 ml de padrão 5 ng/ml, para obter o padrão 500 pg/ml.
No 1000 adicionar 0,800 ml de tampão de ensaio (TE) + 0,200 ml de padrão 5 ng/ml, para obter o padrão 1.000 pg/ml.
No 2.000 adicionar 0,600 ml de tampão de ensaio (TE) + 0,400 ml de padrão 5 ng/ml, para obter o padrão 2.000 pg/ml.
Identificar 2 microtubos: QC1 – QC2
Reconstitua a Grelina Humana QC1 e a Grelina Humana QC2 com 0,5 ml de água destilada para cada e inverte vagarosamente até completa dissolução.
Colocar nos tubos respectivos.
Colocar os microtubos no agitador por 10 segundos cada um.
3. Misture o conteúdo total da Grelina Humana com o Detector de Anticorpo e o antígeno a uma proporção de 1:1. Inverte gentilmente. Deixar em uma temperatura $\leq 20^{\circ}$ C até utilização (não congelar).
4. Diluir os dois frascos de tampão de lavagem (TL) em 900 ml de água destilada.
5. Lavar a placa três vezes com 300 μ L de TL em cada poço da placa. Remover o TL e bater a placa em papel absorvente.
6. Adicionar 20 μ L de solução matriz (SM) aos brancos, controles de qualidade (QC1 e QC2) e Padrões (100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000).
7. Adicional 30 μ L de Tampão de Ensaio (TE) em cada poço de branco e amostras
8. Adicionar 10 μ L de TE em cada Padrão e Controle de Qualidade.
9. Adicionar 20 μ L dos Padrões Grelina nos poços específicos.
10. Adicionar 20 μ L do QC1 e QC2 nos poços específicos.
11. Adicionar 20 μ L de cada amostra em cada poço previamente determinado no desenho da placa.
12. Adicionar 50 μ L da solução previamente preparada com o anticorpo que está na geladeira.
13. Colocar papel selante na placa e levar ao *shaker* por duas horas a uma velocidade de 400 a 500 rpm.
14. Retirar o papel selante e retirar toda a solução que está na placa batendo-a em papel absorvente.
15. Lavar a placa três vezes com 300 μ L de TL em cada poço da placa. Remover o TL e bater a placa em papel absorvente.
16. Adicionar 100 μ L de Solução de enzima (SE) em cada poço. Cobrir a placa e levar ao shaker em temperatura ambiente e velocidade moderada por 30 minutos.
17. Retirar o selante, bater a placa em papel absorvente para remover os resíduos.
18. Lavar a placa seis vezes com 300 μ L de TL em cada poço da placa. Remover o TL e bater a placa em papel absorvente.
19. Adicionar 100 μ L de Solução de Substrato (SS) em cada poço, cobrir com o selante e levar ao *shaker* por aproximadamente 20-25 minutos. Os padrões devem ficar azuis com intensidade proporcional ao aumento da concentração de grelina.
20. Remova o selante e adicione 100 μ L de solução de Parada (SP) e agite manualmente para misturar. A cor azul deve aparecer no lugar da amarela após a acidificação. Leia em leitora de ELISA a uma absorbância de 450 a 590 nm em no máximo cinco minutos. Certifique-se que não haja bolhas de ar nos poços.
21. Para determinar a concentração da grelina deve-se plotar a média das absorbâncias das amostras no eixo Y e média da leitura dos padrões no eixo X do gráfico. A curva resposta deve ser ajustada em uma sigmóide 4- ou 5-parâmetros. Calcular os valores usando qualquer programa de computador que tenha função logística 4- ou 5-parâmetros.

ANEXO 6

Procedimento do teste grelina ativa (acilada)

1. Fazer o desenho da placa, conforme anexo 12.
2. Diluir os padrões.
Identificar 6 microtubos: 25 pg/ml – 50 pg/ml – 100 pg/ml – 200 pg/ml – 500 pg/ml – 1.000 pg/ml
No 25 adicionar 0,9875 ml de tampão de ensaio (TE) + 0,0125 ml de padrão 2 ng/ml, para obter o padrão 25 pg/ml.
No 50 adicionar 0,975 ml de TE + 0,025 ml de padrão 2 ng/ml, para obter o padrão 50 pg/ml.
No 100 adicionar 0,950 ml de tampão de ensaio (TE) + 0,050 ml de padrão 2 ng/ml, para obter o padrão 100 pg/ml.
No 200 adicionar 0,900 ml de TE + 0,100 ml de padrão 2 ng/ml, para obter o padrão 200 pg/ml.
No 500 adicionar 0,750 ml de tampão de ensaio (TE) + 0,250 ml de padrão 2 ng/ml, para obter o padrão 500 pg/ml.
No 1.000 adicionar 0,500 ml de TE + 0,500 ml de padrão 2 ng/ml, para obter o padrão 1.000 pg/ml.
Identificar 2 microtubos: QC1 – QC2
Reconstitua a Grelina Humana QC1 e a Grelina Humana QC2 com 0,5 ml de água destilada para cada e inverte vagarosamente até completa dissolução.
Colocar nos tubos respectivos.
Colocar os microtubos no agitador por 10 segundos cada um.
3. Misture o conteúdo total da Grelina Humana com o Detector de Anticorpo e o antígeno a uma proporção de 1:1. Inverte gentilmente. Deixar em uma temperatura ≤ 20 °C até utilização (não congelar).
4. Diluir os dois frascos de tampão de lavagem (TL) em 900 ml de água destilada.
5. Lavar a placa três vezes com 300 μ L de TL em cada poço da placa. Remover o TL e bater a placa em papel absorvente.
6. Adicionar 20 μ L de solução matriz (SM) aos brancos, controles de qualidade (QC1 e QC2) e Padrões (100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000).
7. Adicional 30 μ L de Tampão de Ensaio (TE) em cada poço de branco e amostras
8. Adicionar 10 μ L de TE em cada Padrão e Controle de Qualidade.
9. Adicionar 20 μ L dos Padrões Grelina nos poços específicos.
10. Adicionar 20 μ L do QC1 e QC2 nos poços específicos.
11. Adicionar 20 μ L de cada amostra em cada poço previamente determinado no desenho da placa.
12. Adicionar 50 μ L da solução previamente preparada com o anticorpo que está na geladeira.
13. Colocar papel selante na placa e levar ao *shaker* por duas horas a uma velocidade de 400 a 500 rpm.
14. Retirar o papel selante e retirar toda a solução que está na placa batendo-a em papel absorvente.
15. Lavar a placa três vezes com 300 μ L de TL em cada poço da placa. Remover o TL e bater a placa em papel absorvente.
16. Adicionar 100 μ L de Solução de enzima (SE) em cada poço. Cobrir a placa e levar ao shaker em temperatura ambiente e velocidade moderada por 30 minutos.
17. Retirar o selante, bater a placa em papel absorvente para remover os resíduos.
18. Lavar a placa seis vezes com 300 μ L de TL em cada poço da placa. Remover o TL e bater a placa em papel absorvente.
19. Adicionar 100 μ L de Solução de Substrato (SS) em cada poço, cobrir com o selante e levar ao *shaker* por aproximadamente 12 - 15 minutos. Os padrões devem ficar azuis com intensidade proporcional ao aumento da concentração de grelina.
20. Remova o selante e adicione 100 μ L de solução de Parada (SP) e agite manualmente para misturar. A cor azul deve aparecer no lugar da amarela após a acidificação. Leia em leitora de ELISA a uma absorbância de 450 a 590 nm em no máximo cinco minutos. Certifique-se que não haja bolhas de ar nos poços.
21. Para determinar a concentração da grelina deve-se plotar a média das absorbâncias das amostras no eixo Y e média da leitura dos padrões no eixo X do gráfico. A curva resposta deve ser ajustada em uma sigmóide 4- ou 5-parâmetros. Calcular os valores usando qualquer programa de computador que tenha função logística 4- ou 5-parâmetros.

ANEXO 7

Cristina Toscani Leal Dornelles

De: mkojima@lsi.kurume-u.ac.jp
Enviado em: quinta-feira, 4 de junho de 2009 20:17
Para: Cristina Toscani Leal Dornelles
Assunto: Re: ENC: Measurement of ghrelin (M Kojima)

Dear Cristina,

Thank you for your mail on ghrelin and I appreciate that you have an interest for ghrelin research.

1. Can we use the total ghrelin minus acylated ghrelin to obtain desacyl ghrelin?

Yes, you can calculate des-acyl ghrelin concentration from total ghrelin and acyl ghrelin. In addition, you can measure directly des-acyl ghrelin by using des-acyl ghrelin specific ELISA, which you can purchase from commercial companies.

2. What is the clinical relevance of desacyl ghrelin to children?

I doubt the physiological functions of des-acyl ghrelin, because we can not detect any direct action of des-acyl ghrelin on the ghrelin receptor. Of course, des-acyl ghrelin plays as a parallel indicator for acyl ghrelin concentration. Thus, I recommend to measure acyl ghrelin concentration in your clinical studies.

Sincerely,

Masayasu Kojima, M.D., Ph.D.
Professor of Molecular Genetics, Institute of Life Science, Kurume University,
Hyakunen-kohen 1-1, Kurume, Fukuoka 839-0864
Tel: 81-942-37-6313 Fax: 81-942-31-5212
E-mail: mkojima@lsi.kurume-u.ac.jp

25/06/2009

ANEXO 8

Protocolo Elisa – leptina (0,5 ng/ml – 100 ng/ml)

→ Retirar todos os reagentes do freezer e geladeira e deixar a temperatura ambiente antes do ensaio.

1. Diluir o tampão concentrado de lavagem (*Wash Buffer*) em 900 ml de H₂O destilada. Diluir os dois frascos.
 2. Adicionar 300 ml do tampão de lavagem em cada poço da placa. Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
 3. Desprezar o tampão de lavagem na pia e bater com a placa em papel toalha para retirar os resíduos. Bater diversas vezes. Cuidar para não deixar secar a placa.
 4. Adicionar 75 µL do tampão de ensaio (*Assay Buffer*) em cada poço.
 5. Adicionar, em duplicata, 25 µL do tampão do ensaio nos brancos. Cada branco terá 100 µL do tampão.
 6. Adicionar, em duplicata, 25 µL dos padrões de leptina humana em ordem crescente de concentração.
 7. Adicionar 25 µL de QC1 e 25 µL de QC2 nos poços apropriados em duplicata.
 8. Adicionar 25 µL dos soros (amostras) nos poços restantes.
- ## FAZER TUDO ISTO EM 1 HORA!!! ##
9. Cobrir a placa com o selador e incubar a temperatura ambiente por 2 horas no *shaker* em velocidade moderada. O protocolo fala em 400 a 500 RPM. Eu acho muito.
 10. Remover o selador e bater a placa para retirar o líquido.
 11. Lavar a placa 3 vezes com o tampão de lavagem, 300 µL por poço.
 12. Adicionar 100 µL de detector de anticorpo (*Detection Antibody*) em cada poço. Cobrir a placa e incubar por 30 minutos no *shaker* em temperatura ambiente.
 13. Remover o selador e bater a placa para retirar o líquido.
 14. Adicionar 100 µL de solução enzimática (*Enzyme Solution*) em cada poço. Cobrir a placa e incubar por 30 minutos no *shaker* em temperatura ambiente.
 15. Remover o selador e bater a placa para retirar o líquido.
 16. Lavar 5 vezes com o tampão de lavagem, 300 µL por poço. Bater a placa.
 17. Adicionar 100µL de solução substrato (*Substrate Solution*) em cada poço, cobrir a placa e agitar no *shaker* por 5 minutos.
 18. Remover o selador e adicionar 100 µL de solução preparada (*Stop Solution*) em cada poço e agitar manualmente até misturar todo produto.
 19. Ler em 450 nm e 590 nm dentro de 5 minutos.
 20. Para determinar a concentração da leptina deve-se plotar a média das absorbâncias das amostras no eixo Y e a média da leitura dos padrões no eixo X. A curva resposta deve ser ajustada em uma sigmóide 5-parâmetros. Calcular os valores usando qualquer programa de computador que tenha função logística 5-parâmetros.

ANEXO 9**Protocolo insulina – Elisa**

1. Retirar o kit ELISA Active Insulina do refrigerador e deixar até atingir a temperatura ambiente;
2. Retirar o soro dos pacientes para descongelar;
3. Reconstituir os padrões de insulina com água deionizada. Adicionar 1 mL ao padrão A e 0,5 mL aos padrões B-F;
4. Reconstituir os controles de insulina com 0,5 mL de água deionizada;
5. Preparar a solução de lavagem diluindo o concentrado de lavagem em 1500 mL de água deionizada;
6. Preparar a solução de conjugado anticorpo-enzima de acordo com o número de poços utilizados. Diluir 1 parte de conjugado para 50 partes de tampão de ensaio;
7. Para a realizar o Ensaio Regular: utilizar 25 µL dos padrões A-E, controles e amostras em duplicatas nas cavidades apropriadas;
8. Para o Ensaio com Limite Estendido: pipetar 10 µL dos padrões A e C-F, controles e amostras em duplicatas nas cavidades apropriadas;
9. Adicionar 100 µL de solução conjugado anticorpo-enzima em cada cavidade;
10. Incubar a placa em agitador orbital a 200 RPM por 1 hora a temperatura ambiente;
11. Aspirar e lavar 5x a placa com solução de lavagem adicionando 400 µL em cada cavidade;
12. Após o término das lavagens, inverter a placa e bater em papel absorvente;
13. Pipetar 100 µL de solução de TMB a cada cavidade;
14. Cobrir a placa e incubar em agitador orbital a velocidade de 200 RPM/10 min em temperatura ambiente;
15. Adicionar 100 µL de solução de parada (ácido sulfúrico 0,2 M) em cada cavidade;
16. Ler, dentro de 30 minutos, em leitor de microplacas ajustado para 450 nm com filtro de referência de 600 ou 620 nm.
17. Calcular as médias dos padrões, controles e amostras;
18. Plotar o log das médias de leitura de absorbância no eixo *-y versus* o log das concentrações no eixo *-x*, usando um ajuste de curva linear.

ANEXO 10**Protocolo método cinético – glicose**

→ Retirar o padrão e a solução reagente da geladeira e deixar a temperatura ambiente antes do ensaio.

1. Retirar as amostras que serão dosadas do freezer .
2. Identificar os tubos de vidro com o número correspondente ao das amostras.
3. Identificar em triplicata tubos BR para o branco e P para o padrão.
4. Adicionar 10 μ L, em triplicata do padrão nos tubos P.
5. Adicionar 10 μ L de cada amostra no tubo correspondente.
6. Adicionar 1 ml da solução reagente em todos os tubos (BR, P, e amostras).
7. Agitar os tubos de vidro, um a um, no agitador por alguns segundos cada.
8. Colocar as amostras em banho-maria a 37°C por 15 minutos.
9. Após a retirada do banho-maria as amostras devem ser lidas em até 30 minutos.
10. Adicionar o conteúdo dos tubos de ensaio nas cubetas, previamente limpas.
11. Dosar em espectrofotômetro no comprimento de onda de 505 nm as absorvâncias do teste e padrão acertando o zero com o branco.
12. Após a leitura devem-se calcular os resultados.

Glicemia (mg/dl) = (Absorbância da amostra – Absorbância do branco)/Absorbância do padrão) x 100
OU
Fator de calibração = 100/Absorbância do padrão
Glicemia = Absorbância da amostra x Fator

ANEXO 11

Dados antropométricos por faixa etária e sexo

Variáveis	Sexo	Peso (kg)	Estatura (cm)	IMC/I (kg/m ²)	CB/I (cm)	DCT/I (mm)
Total	M (n = 59)	18,4 ± 6,99	107,0 ± 20,1	15,7 ± 1,3	16,9 ± 1,90	8,3 ± 1,69
n = 111	F (n = 52)	19,9 ± 8,43	110,1 ± 22,8	15,7 ± 1,4	17,4 ± 2,17	9,4 ± 1,73
≤ 24 meses n = 20	M (n = 10)	9,8 ± 0,99	76,6 ± 4,86	16,6 ± 1,15	14,9 ± 0,79	9,0 ± 1,49
	F (n = 10)	9,5 ± 1,96	76,6 ± 8,12	15,9 ± 0,96	14,7 ± 0,96	8,9 ± 1,31
25-60 meses n = 37	M (n = 22)	15,5 ± 1,96	99,4 ± 7,01	15,6 ± 0,99	16,3 ± 0,67	8,12 ± 0,84
	F (n = 15)	15,9 ± 2,49	100,4 ± 6,22	15,9 ± 1,07	16,9 ± 0,88	9,39 ± 1,55
> 60 meses n = 54	M (n = 27)	24,1 ± 6,05	124,5 ± 11,5	15,3 ± 1,31	18,1 ± 2,00	8,16 ± 2,20
	F (n = 27)	25,9 ± 6,80	127,9 ± 12,7	15,5 ± 1,63	18,7 ± 1,92	9,54 ± 1,96

M: masculino; F: feminino; IMC: índice de massa corporal; CB: circunferência do braço; DCT: dobra cutânea tricipital.

Dados antropométricos em escore-z por sexo e faixa etária

Variáveis	Sexo	E/I-Z	IMC/I-Z	CB/I-Z	DCT/I-Z	DCS/I-Z
Total	M (n = 59)	0,03 ± 1,00	-0,14 ± 0,80	-0,16 ± 0,75	0,07 ± 0,62	-0,08 ± 0,60
n = 111	F (n = 52)	0,11 ± 1,00	-0,10 ± 0,80	0,32 ± 0,48	0,10 ± 0,66	-0,04 ± 0,64
≤ 24 meses n = 20	M (n = 10)	0,79 ± 0,89	-0,15 ± 0,75	0,25 ± 0,68	0,36 ± 0,81	-0,18 ± 0,93
	F (n = 10)	0,16 ± 1,38	-0,13 ± 0,65	0,31 ± 0,57	0,38 ± 0,83	0,49 ± 0,67
25-60 meses n = 37	M (n = 22)	-0,34 ± 0,78	0,13 ± 0,73	0,23 ± 0,56	0,19 ± 0,45	0,00 ± 0,58
	F (n = 15)	-0,04 ± 0,80	0,30 ± 0,72	0,56 ± 0,44	0,40 ± 0,74	-0,14 ± 0,85
> 60 meses n = 54	M (n = 27)	0,05 ± 1,05	-0,35 ± 0,84	-0,63 ± 0,65	-0,12 ± 0,62	-0,12 ± 0,48
	F (n = 27)	0,17 ± 1,06	-0,30 ± 0,84	0,18 ± 0,43	-0,17 ± 0,40	-0,18 ± 0,33

M: masculino; F: feminino; E/I-Z: escore-z da estatura para idade; IMC/I-Z: escore-z do índice de massa corporal; CB/I-Z: escore-z da circunferência do braço; DCT/I-Z: escore-z da dobra cutânea tricipital; DCS/I-Z: escore-z da dobra cutânea subescapular.

ANEXO 12

Quadro ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

DATA:

EXECUTORES:

TESTE ELISA:

COMPRIMENTO DE ONDA:

OBSERVAÇÕES

BANCO DE DADOS

GL	Idade	Sexo	G. racial	Ind. Col.	Hb	Ht	Medic.	Jejum	Gre. Tot.	Gre. Acil.	Gre. Desac.	Lep.
3	89	F	Cauc.	Cirur.	12,9	38,2	N/U	480	1364,730	211,569	1153,161	4,785
4	107	M	Cauc.	Cirur.	11,1	34,2	N/U	210	2268,674	365,393	1903,281	1,109
5	67	M	N/Cauc.	Rev.	11,7	35,8	N/U	200	1515,971	284,867	1231,104	1,109
6	62	F	Cauc.	Cirur.	11,2	35,0	N/U	180	918,441	271,624	646,817	3,550
9	95	M	Cauc.	Rev.	13,8	41,4	N/U	480	901,138	213,848	687,290	2,096
10	91	M	Cauc.	Rev.	12,2	37,6	N/U	390	593,476	152,842	440,634	1,411
11	97	M	Cauc.	Rev.	11,6	35,0	S.F.	480	1151,360	159,500	991,860	3,590
13	95	F	N/Cauc.	Cirur.	11,1	33,6	N/U	480	418,072	167,632	250,440	2,338
15	44	F	Cauc.	Rev.	11,2	34,4	N/U	305	1449,531	221,926	1227,605	1,451
16	100	M	Cauc.	Cirur.	13,1	39,9	N/U	180	827,267	179,328	647,939	1,089
17	59	M	N/Cauc.	Rev.	12,5		N/U	270	445,244	107,498	337,746	1,451
18	71	F	Cauc.	Cirur.	11,2	34,5	N/U	745	859,924	296,337	563,587	4,183
19	79	F	Cauc.	Rev.	12,2	37,1	N/U	230	1119,497	335,020	784,477	1,209
20	4	F	Cauc.	Cirur.	11,1	33,6	N/U	220	584,551	70,849	513,702	1,370
21	43	F	Cauc.	Rev.	12,0	36,4	N/U	720	1581,886	437,451	1144,435	2,418
22	78	F	Cauc.	Rev.	12,4	37,9	N/U	720	1022,200	133,350	888,850	1,733
23	40	M	N/Cauc.	Rev.	11,4	35,7	S.F.	245	1812,077	465,404	1346,673	1,370
24	52	M	N/Cauc.	Rev.	12,2	38,8	N/U	300	1435,83	110,686	1325,144	1,652
31	87	F	Cauc.	Rev.	13,2	39,5	N/U	180	1353,63	339,673	1013,957	1,411
32	43	M	Cauc.	Rev.	11,7	36,9	S.F.	240	544,293	139,753	404,540	1,491
34	34	F	N/Cauc.	Cirur.	11,4	34,6	N/U	840	2499,365	507,196	1992,169	1,209
37	78	F	N/Cauc.	Cirur.	12,0	36,4	N/U	815	1645,258	336,016	1309,242	1,129
42	53	F	Cauc.	Rev.	12,1	37,6	N/U	360	669,04	116,883	552,157	5,211

GL	Idade	Sexo	G. racial	Ind. Col.	Hb	Ht	Medic.	Jejum	Gre. Tot.	Gre. Acil.	Gre. Desac.	Lep.
47	40	F	N/Cauc.	Rev.	11,2	35,3	N/U	200	1386,604	402,973	983,631	2,338
52	109	F	Cauc.	Rev.	12,6	38,9	N/U	840	546,533	268,909	277,624	4,806
55	111	M	N/Cauc.	Rev.	12,6	37,6	N/U	615	346,160	119,240	226,920	3,914
57	11	F	N/Cauc.	Rev.	11,2	34,4	N/U	222	2245,163	620,320	1624,843	1,370
59	36	M	Cauc.	Cirurg.	12,1	36,9	N/U	840	2064,499	227,863	1836,636	2,984
65	60	F	N/Cauc.	Rev.	11,1	33,9	N/U	600	847,235	286,390	560,845	5,780
66	70	M	Cauc.	Rev.	11,9	35,5	N/U	605	660,179	183,869	476,310	1,330
75	128	M	Cauc.	Rev.	12,2	36,7	N/U	840	548,773	215,886	332,887	1,491
76	64	M	Cauc.	Rev.	13,7	40,8	N/U	190	1550,750	194,914	1355,836	1,370
80	56	M	Cauc.	Cirurg.	12,6	38,1	N/U	840	1038,719	219,924	818,795	1,250
81	96	M	Cauc.	Cirurg.	12,3	36,9	N/U	230	1154,630	313,610	841,020	0,336
82	31	F	Cauc.	Rev.	12,4	37,0	N/U	840	1540,009	367,311	1172,698	1,317
83	117	F	N/Cauc.	Rev.	12,6	38,3	N/U	230	948,649	247,799	700,850	3,509
86	128	M	N/Cauc.	Rev.	12,6	38,1	N/U	770	794,987	280,170	514,817	1,021
87	113	F	Cauc.	Rev.	12,1	36,2	N/U	180	583,780	183,590	400,190	7,034
90	111	F	Cauc.	Cirurg.	13,7	41,4	N/U	190	629,103	221,926	407,177	2,591
93	35	M	Cauc.	Rev.	12,9	34,3	S.F.	235	1025,902	190,546	835,356	0,592
94	94	F	Cauc.	Cirurg.	11,3	33,7	N/U	200	427,137	97,517	329,620	2,771
96	91	M	Cauc.	Rev.	11,0	33,5	N/U	240	1835,000	397,317	1437,683	1,880
98	51	M	N/Cauc.	Cirurg.	12,0	35,9	N/U	840	1279,02	348,876	930,144	1,595
99	119	F	Cauc.	Rev.	11,2	33,7	N/U	775	1312,258	403,070	909,188	5,087
101	58	M	N/Cauc.	Cirurg.	11,9	36,8	N/U	315	1341,242	277,590	1063,652	1,629
103	50	M	N/Cauc.	Rev.	12,9	38,9	N/U	340	725,666	167,730	557,936	1,477
104	38	F	Cauc.	Cirurg.	12,4	36,6	N/U	350	1928,663	562,740	1365,923	2,673
105	71	F	Cauc.	Rev.	12,5	37,7	N/U	215	1582,739	475,220	1107,519	3,403
110	24	F	Cauc.	Rev.	12,0	36,8	N/U	840	2085,263	481,024	1604,239	1,106
111	52	M	Cauc.	Cirurg.	11,5	33,6	N/U	190	1932,52	657,289	1275,231	1,511

GL	Idade	Sexo	G. racial	Ind. Col.	Hb	Ht	Medic.	Jejum	Gre. Tot.	Gre. Acil.	Gre. Desac.	Lep.
113	48	M	Cauc.	Rev.	11,4	34,0	N/U	225	922,726	211,789	710,937	0,748
116	17	F	Cauc.	Rev.	11,0	33,5	N/U	270	642,433	314,135	328,298	2,100
119	85	M	N/Cauc.	Cirur.	12,1	36,8	N/U	310	623,702	224,050	399,652	0,676
122	53	M	Cauc.	Cirur.	12,3	36,8	N/U	185	476,858	152,842	324,016	1,494
127	114	M	Cauc.	Cirur.	12,6	37,5	N/U	180	377,189	90,005	287,184	4,824
129	18	M	Cauc.	Cirur.	12,4	37,4	N/U	185	3478,894	722,247	2756,647	1,376
130	76	F	Cauc.	Rev.	12,5	38,6	S.F.	285	1349,507	449,844	899,663	0,707
131	114	F	Cauc.	Rev.	12,3	37,7	N/U	840	1402,316	264,553	1137,763	8,667
134	65	M	Cauc.	Cirur.	13,7	41,4	N/U	245	1266,524	420,998	845,526	0,525
135	13	M	Cauc.	Rev.	11,1	35,3	N/U	220	637,991	107,900	530,091	2,03
136	85	M	N/Cauc.	Cirur.	12,6	37,9	N/U	190	1027,396	105,978	921,418	< 0,125
137	25	M	N/Cauc.	Cirur.	12,1	37,7	N/U	200	1407,365	298,640	1108,725	0,37
138	89	M	Cauc.	Cirur.	11,9	35,5	N/U	790	1505,104	514,379	990,725	1,241
139	112	F	N/Cauc.	Rev.	12,0	38,1	N/U	265	1122,196	142,340	979,856	2,41
144	67	M	N/Cauc.	Cirur.	13,0	38,5	N/U	198	1894,930	492,723	1402,207	1,241
145	59	F	N/Cauc.	Rev.	12,8	37,4	N/U	190	1240,760	154,904	1085,856	0,645
146	6	F	N/Cauc.	Cirur.	13,4	41,7	N/U	190	1295,654	293,199	1002,455	1,578
147	18	F	N/Cauc.	Cirur.	12,1	36,8	N/U	225	1123,73	254,303	869,427	0,902
151	66	F	N/Cauc.	Cirur.	11,7	37,9	N/U	210	1596,837	372,009	1224,828	1,309
153	68	M	Cauc.	Cirur.	11,9	37,0	N/U	180	1317,230	281,845	1035,385	2,295
159	80	F	N/Cauc.	Rev.	13,2	40,8	N/U	840	1272,236	184,923	1087,313	1,174
163	8	M	Cauc.	Rev.	12,3	38,2	N/U	240	3328,889	792,043	2536,846	0,629
165	58	F	Cauc.	Rev.	12,4	38,3	N/U	220	2222,544	570,880	1651,664	0,97
166	78	F	Cauc.	Cirur.	12,2	38,5	N/U	200	1624,809	303,022	1321,787	1,004
167	31	M	Cauc.	Rev.	12,9	36,9	N/U	240	2871,631	992,743	1878,888	1,528
171	25	M	Cauc.	Rev.	11,2	33,9	N/U	800	3098,470	1053,250	2045,220	2,34
172	83	M	Cauc.	Cirur.	13,8	41,5	N/U	205	1496,579	583,410	913,169	3,209

GL	Idade	Sexo	G. racial	Ind. Col.	Hb	Ht	Medic.	Jejum	Gre. Tot.	Gre. Acil.	Gre. Desac.	Lep.
175	36	M	N/Cauc.	Cirurg.	11,9	34,8	N/U	310	1427,474	327,860	1099,614	1,38
176	42	M	Cauc.	Rev.	12,0	35,2	N/U	195	1995,210	514,379	1480,831	1,74
182	7	M	Cauc.	Rev.	11,3	31,9	S.F.	190	1962,107	288,205	1673,902	0,31
183	12	M	Cauc.	Cirurg.	12,2	35,3	S.F.	210	1587,447	422,264	1165,183	3,18
184	6	M	Cauc.	Rev.	11,1	32,9	S.F + P.V	180	1899,164	274,790	1624,374	2,46
188	50	F	Cauc.	Cirurg.	12,7	37,7	N/U	200	1150,874	167,700	983,174	9,13
189	16	M	Cauc.	Rev.	11,9	35,9	N/U	200	2786,960	773,080	2013,880	2,39
191	66	M	Cauc.	Cirurg.	12,3	36,4	N/U	200	1580,430	440,670	1139,760	0,91
194	5	M	Cauc.	Rev.	11,5	34,2	S.F + P.V	200	1540,009	273,880	1266,129	4,12
196	28	F	Cauc.	Cirurg.	11,5	33,5	N/U	815	3046,742	1098,060	1948,682	1,08
198	20	F	Cauc.	Rev.	12,2	35,9	N/U	290	1623,010	267,510	1355,500	0,76
200	11	F	Cauc.	Rev.	11,8	36,4	N/U	420	2140,401	747,680	1392,721	0,88
205	126	F	Cauc.	Cirurg.	12,9	38,2	N/U	180	1134,920	307,670	827,250	2,24
206	18	F	Cauc.	Cirurg.	11,5	36,0	N/U	240	1550,750	220,530	1330,220	2,36
207	45	F	Cauc.	Rev.	12,7	36,5	N/U	760	1183,790	391,810	791,980	3,07
209	43	M	Cauc.	Cirurg.	12,5	37,7	S.F.	185	2822,670	840,310	1982,360	0,740
210	43	M	Cauc.	Cirurg.	12,4	37,4	S.F.	190	2714,940	697,530	2017,410	2,910
215	100	M	Cauc.	Rev.	12,5	36,2	N/U	690	975,500	224,050	751,450	4,390
216	77	M	Cauc.	Cirurg.	13,6	40,4	N/U	225	1373,510	283,290	1090,220	2,650
217	14	M	N/Cauc.	Rev.	11,1	35,4	S.F.	185	1938,240	356,550	1581,690	1,030
218	13	M	Cauc.	Rev.	11,5	32,9	N/U	200	2006,680	280,170	1726,510	2,270
222	105	F	N/Cauc.	Cirurg.	12,3	37,2	N/U	205	1769,630	529,430	1240,200	5,130
223	124	F	Cauc.	Rev.	13,5	39,6	N/U	180	1202,970	273,880	929,090	0,660
226	39	F	N/Cauc.	Cirurg.	11,6	34,6	N/U	780	2160,190	522,510	1637,680	2,200
227	34	M	Cauc.	Rev.	12,1	36,3	N/U	825	2119,530	603,080	1516,450	1,500
228	128	M	Cauc.	Rev.	11,4	34,5	N/U	180	1892,660	465,490	1427,170	0,460

GL	Idade	Sexo	G. racial	Ind. Col.	Hb	Ht	Medic.	Jejum	Gre. Tot.	Gre. Acil.	Gre. Desac.	Lep.
231	60	M	Cauc.	Rev.	12,2	36,0	N/U	825	1971,440	333,990	1637,450	0,910
233	39	F	Cauc.	Rev.	13,7	39,2	N/U	700	1739,360	391,810	1347,550	3,320
234	105	F	N/Cauc.	Rev.	12,1	35,6	N/U	210	964,510	173,610	790,900	2,880
235	122	F	N/Cauc.	Rev.	12,4	35,6	N/U	215	896,710	252,890	643,820	5,730
237	70	M	Cauc.	Rev.	12,5	35,9	N/U	230	990,020	175,760	814,260	2,530
238	16	F	Cauc.	Rev.	11,4	33,8	N/U	185	3042,770	755,570	2287,200	2,290
239	78	M	Cauc.	Cirur.	14,1	39,3	N/U	720	2204,900	534,020	1670,880	0,590
240	108	F	Cauc.	Rev.	12,7	36,1	N/U	240	1564,280	331,120	1233,160	3,180

F: feminino; M: masculino; Cauc: caucasóide; N/Cauc: não caucasóide; Ind.Ex: indicação para exames clínicos;
Rev: revisão de saúde; Cirur: pequenos procedimentos cirúrgicos; Med: uso de medicação profilática;
N/U: não utiliza; S.F.: sulfato ferroso; S.F.+P.V.: sulfato ferroso e polivitamínico; Gre tot: grelina total
Gre Acil: grelina acilada; Gre Desac: grelina desacilada; Lep: leptina.

GL	Glic.	Insu.	Peso (kg)	C ou E (cm)	E/I-Z	CB	CB-Z	DCT	DCT-Z	DCS	DCS-Z	IMC	IMC-Z
3	94	17,56	25,90	122,0	-0,22	19,0	0,56	8,40	-0,31	7,00	0,17	17,5	0,98
4	98	26,76	26,55	134,5	0,37	17,0	-1,52	4,30	-1,78	4,70	-0,39	14,7	-0,95
5	88	13,50	16,00	107,5	-1,18	15,0	-1,36	5,60	-0,98	4,80	-0,26	13,9	-1,20
6	83	12,13	18,00	110,0	0,00	18,0	1,00	10,50	0,49	6,40	0,09	14,9	-0,25
9	93	14,03	20,80	119,0	-1,42	16,5	-1,47	8,30	0,02	5,20	-0,15	14,7	-0,75
10	129	38,57	20,70	120,0	-0,94	17,0	-1,11	7,30	-0,18	4,80	-0,30	14,4	-0,95
11	87	13,39	27,50	131,0	0,55	19,0	-0,48	8,00	-0,06	5,50	-0,03	16,0	0,17
13	100	12,90	23,35	126,0	-0,04	17,5	-0,15	7,60	-0,59	6,30	-0,05	14,7	-0,58
15	91	20,13	18,05	103,0	0,54	18,0	1,28	11,30	1,18	7,30	0,80	17,0	1,16
16	83	12,90	26,15	132,0	0,51	17,5	-1,20	7,00	-0,44	5,10	-0,20	15,0	-0,58
17	96	14,51	15,90	105,0	-1,05	16,0	-0,37	8,50	0,44	5,10	-0,27	14,4	-0,61
18	92	26,90	17,80	112,5	-0,47	16,5	-0,11	8,30	-0,25	5,20	-0,28	14,1	-0,84
19	96	14,14	20,80	120,0	0,23	17,0	0,01	9,40	0,04	6,70	0,16	14,4	-0,59
20	72	20,25	5,61	60,0	-0,94	12,5	-0,80	7,90	-1,05	6,60	-0,74	15,6	-0,73
21	105	20,25	17,00	103,0	0,65	16,5	0,32	9,50	0,49	5,80	-0,21	16,0	0,52
22	77	19,75	18,10	112,5	-1,04	17,0	0,01	8,20	-0,31	5,50	-0,18	14,3	-0,69
23	106	5,00	14,50	98,5	-0,09	16,0	0,08	8,10	0,17	5,80	0,12	14,9	-0,44
24	133	5,00	19,65	110,5	1,13	17,5	0,86	9,40	0,81	6,10	0,54	16,1	0,62
31	82	5,00	26,30	128,0	0,98	17,5	-0,02	9,00	-0,16	6,10	-0,06	16,1	0,33
32	85	10,64	15,00	98,0	-0,73	16,5	0,37	8,00	0,12	6,50	0,73	15,6	0,17
34	124	17,23	11,50	90,0	-1,07	16,0	0,33	9,70	0,75	5,10	-0,91	14,2	-1,00
37	86	10,64	18,80	120,0	0,36	16,5	-0,21	6,30	-0,95	4,50	-0,51	13,1	-1,68
42	84	12,90	18,60	109,0	0,68	17,0	0,31	10,30	0,67	7,80	0,99	17,7	0,27
47	87	15,47	13,90	97,5	-0,13	17,0	0,80	7,20	-0,66	4,80	-1,22	14,6	-0,55

GL	Glic.	Insu.	Peso (kg)	C ou E (cm)	E/I-Z	CB	CB-Z	DCT	DCT-Z	DCS	DCS-Z	IMC	IMC-Z
52	79	17,23	32,75	139,5	1,04	20,0	0,43	10,00	-0,09	7,10	0,08	16,8	0,34
55	95	20,61	37,30	149,5	2,52	23,0	0,42	13,40	0,63	8,40	0,69	16,7	0,24
57	72	14,14	10,67	81,5	2,91	15,0	0,65	6,80	-0,81	6,50	-0,01	16,5	-0,21
59	97	23,03	16,00	97,0	0,19	17,0	0,95	10,00	1,11	6,80	0,86	17,0	1,08
65	107	13,87	20,50	108,5	-0,32	19,0	1,58	12,00	1,68	8,10	1,75	17,4	1,50
66	138	5,00	20,10	113,0	-0,33	18,0	-0,09	9,50	0,54	6,30	0,44	15,7	0,37
75	94	15,97	30,65	135,0	-0,97	21,0	-0,51	10,00	-0,01	7,80	0,33	16,8	0,02
76	90	28,03	17,45	110,0	-0,40	17,0	-0,3	8,00	0,09	5,80	0,25	14,4	-0,68
80	85	17,56	15,80	104,5	-0,78	15,5	-0,67	8,10	0,24	4,80	-0,90	14,5	-0,60
81	103	19,32	21,65	122,5	-0,87	17,0	-1,26	6,50	-0,53	4,00	-0,76	14,4	-0,98
82	70	5,00	14,50	95,5	1,01	16,0	0,45	9,60	0,77	5,90	-0,15	15,9	0,31
83	81	5,00	30,85	140,5	0,52	19,5	-0,11	11,20	-0,01	6,20	-0,41	15,6	-0,46
86	87	14,19	40,40	147,0	0,80	23,0	0,12	10,50	0,08	8,10	0,39	18,7	0,89
87	77	14,99	30,70	128,5	-1,10	22,0	0,87	13,10	0,41	8,30	0,16	18,5	0,98
90	108	14,51	30,25	136,0	0,26	20,0	0,25	10,50	-0,06	7,30	-0,03	16,4	0,05
93	83	11,40	13,00	92,5	-0,88	15,5	-0,19	7,50	-0,19	5,10	-0,67	15,1	-0,42
94	103	15,31	22,00	122,0	-0,66	18,0	0,04	11,00	0,25	5,80	-0,19	14,8	-0,52
96	108	5,00	21,70	124,5	-0,10	16,8	-1,19	6,20	-0,56	4,40	-0,51	14,0	-1,27
98	81	18,73	15,40	102,5	-0,70	17,0	0,52	9,00	0,64	5,90	0,38	14,7	-0,50
99	80	12,90	35,00	138,5	0,05	22,5	0,82	14,30	0,51	8,60	0,14	18,2	0,73
101	83	26,64	17,40	110,5	0,38	15,5	-0,70	6,90	-0,39	4,90	-0,52	14,3	-0,77
103	101	24,96	15,50	102,0	-0,24	15,0	-0,88	7,90	0,09	4,70	-0,96	14,9	-0,36
104	90	13,39	16,40	101,0	1,03	17,0	0,87	9,80	0,71	6,40	0,25	16,1	0,53
105	96	23,51	23,15	119,0	0,84	18,0	0,61	10,00	0,25	5,80	-0,08	16,3	0,65
110	81	5,00	11,00	83,0	-1,02	14,5	-0,31	9,50	0,92	7,30	0,87	16,0	0,41

GL	Glic.	Insu.	Peso (kg)	C ou E (cm)	E/I-Z	CB	CB-Z	DCT	DCT-Z	DCS	DCS-Z	IMC	IMC-Z
111	72	9,84	16,20	101,0	-0,92	17,0	0,55	8,40	0,36	5,10	-0,41	15,9	0,45
113	82	5,00	16,60	104,0	0,28	17,0	0,64	8,50	0,39	5,20	-0,37	15,3	0,00
116	80	10,86	9,66	82,0	0,89	15,0	0,48	9,50	0,98	7,00	0,57	14,4	-1,15
119	102	5,00	20,00	117,5	-0,73	16,0	-1,4	5,80	-0,69	4,50	-0,42	14,5	-0,61
122	72	23,11	16,80	102,0	-0,95	16,0	-0,22	8,90	0,60	6,10	0,55	16,1	0,66
127	97	42,11	34,45	140,0	0,75	21,0	-0,24	13,00	0,57	7,00	0,37	17,6	0,71
129	87	13,52	10,97	80,0	-0,91	16,0	0,96	9,40	0,99	7,30	0,96	17,1	0,77
130	103	9,39	17,60	109,0	-1,40	16,5	-0,21	8,70	-0,16	6,20	-0,27	14,8	-0,31
131	73	13,77	39,65	146,0	1,69	22,0	0,87	14,20	0,59	11,10	0,69	18,6	0,98
134	89	20,25	17,40	104,5	-1,66	16,5	-0,57	8,10	0,13	4,00	-0,80	16,0	0,56
135	85	23,36	11,25	80,0	1,28	15,5	0,71	9,50	0,87	7,60	0,95	17,6	0,64
136	88	5,00	19,25	116,5	-1,07	16,5	-1,18	6,00	-0,60	4,50	-0,42	14,2	-1,03
137	84	17,60	11,00	84,5	-1,25	16,0	0,67	8,20	0,31	6,70	0,66	15,7	-0,27
138	74	5,00	23,70	127,0	0,53	18,0	-0,70	8,30	0,10	4,30	-0,56	14,7	-0,66
139	104	13,01	35,70	146,0	1,83	21,0	0,57	10,30	-0,10	7,80	0,08	16,7	0,24
144	92	5,00	20,00	122,0	1,77	16,5	-0,57	6,00	-0,76	3,80	-0,96	13,4	-1,58
145	90	10,49	17,60	108,0	-0,22	17,0	0,12	10,40	0,63	5,60	-0,37	15,1	-0,12
146	89	12,78	7,60	66,0	0,20	14,0	0,21	11,00	0,95	8,50	0,89	17,4	0,35
147	96	15,66	11,50	83,0	1,67	15,5	0,81	9,50	1,00	7,50	0,95	15,5	-0,11
151	94	10,49	17,20	115,5	0,70	16,0	-0,26	7,80	-0,39	4,50	-0,55	12,9	-1,84
153	78	13,01	23,00	117,5	0,85	18,0	0,21	11,00	0,89	6,40	0,49	16,7	0,98
159	77	19,79	20,00	120,5	0,33	16,5	-0,21	8,00	-0,37	5,10	-0,31	13,8	-1,09
163	81	32,40	9,33	73,0	0,87	15,6	0,98	10,50	1,00	5,30	-1,54	17,5	0,18
165	78	23,53	14,35	100,0	-1,79	17,0	0,16	8,50	-0,13	5,00	-0,93	14,4	-0,65
166	82	34,86	16,20	110,5	-1,44	17,0	-0,01	8,50	-0,22	4,50	-0,51	13,3	-1,50
167	88	12,21	15,00	94,5	0,73	16,5	0,75	8,70	0,52	6,00	0,17	16,4	0,55

GL	Glic.	Insu.	Peso (kg)	C ou E (cm)	E/I-Z	CB	CB-Z	DCT	DCT-Z	DCS	DCS-Z	IMC	IMC-Z
171	75	27,63	10,90	83,5	-1,48	15,5	0,23	8,00	0,18	6,60	0,59	15,6	-0,28
172	82	26,73	24,85	125,0	0,65	18,5	-0,31	9,00	0,34	5,00	-0,17	15,9	0,30
175	76	29,81	14,55	97,5	0,39	16,0	0,21	7,50	-0,19	5,10	-0,67	15,3	-0,24
176	71	23,86	17,00	102,0	0,48	17,0	0,77	8,20	0,22	5,80	0,14	16,3	0,70
182	87	23,70	8,80	74,0	1,66	14,0	-0,41	7,30	-0,98	5,90	-0,93	16,1	-0,90
183	85	18,02	8,95	74,5	-0,57	15,0	0,31	8,40	0,19	6,20	-0,23	16,1	-0,51
184	91	29,81	9,00	69,0	0,68	15,5	1,14	11,50	1,22	8,40	0,89	18,9	1,04
188	74	21,09	17,80	103,5	-0,14	17,5	0,74	10,20	0,68	6,00	-0,05	16,6	0,90
189	84	45,10	10,70	83,0	0,94	15,0	0,19	8,00	0,15	5,60	-0,57	15,5	-0,62
191	72	19,79	19,45	114	0,23	17,0	-0,30	8,30	0,19	5,00	-0,15	15,0	-0,23
194	92	38,02	8,44	71,0	1,91	14,0	-0,16	9,50	0,14	7,50	0,22	16,7	-0,42
196	82	29,67	12,40	91,5	0,36	15,5	0,22	7,70	-0,18	5,50	-0,54	15,0	-0,41
198	82	25,01	9,45	79,0	-1,29	15,0	0,32	8,80	0,62	7,20	0,78	15,1	-0,33
200	74	17,40	8,20	72,0	-0,52	14,2	0,01	9,00	0,54	7,20	0,50	15,8	-0,43
205	84	42,55	32,25	140,0	-0,31	21,0	0,17	9,90	-0,35	5,80	-0,62	16,5	-0,24
206	85	32,93	12,00	83,0	0,67	16,0	1,20	9,80	1,14	8,40	1,47	17,4	1,17
207	104	29,52	17,20	106,0	0,20	16,5	0,27	7,50	-0,53	5,00	-0,97	16,5	0,86
209	75	26,27	16,00	95,00	-1,41	16,7	0,53	6,40	-0,89	6,10	0,41	17,7	1,69
210	75	21,37	16,35	96,00	-1,16	17,0	0,75	8,30	0,28	6,20	0,49	17,7	1,70
215	85	9,42	24,70	128,00	-0,23	17,9	-1,05	6,30	-0,69	4,90	-0,29	15,1	-0,54
216	72	5,00	23,00	119,00	0,04	18,8	0,05	9,20	0,44	5,50	0,11	16,2	0,60
217	76	13,16	10,18	82,00	1,24	14,0	-0,66	6,50	-0,98	5,00	-1,35	15,1	-1,08
218	106	13,50	9,89	79,00	0,82	14,0	-0,61	9,70	0,98	6,20	-0,16	15,8	-0,64
222	83	5,00	31,40	138,10	1,16	20,5	0,59	8,90	-0,35	6,40	-0,16	16,5	0,25
223	103	39,16	33,70	150,00	1,43	18,5	-0,65	9,50	-0,56	5,00	-0,85	14,9	-1,01
226	86	17,66	14,20	94,10	-0,79	17,0	0,85	10,50	0,99	6,60	0,39	16,0	0,50

GL	Glic.	Insu.	Peso (kg)	C ou E (cm)	E/I-Z	CB	CB-Z	DCT	DCT-Z	DCS	DCS-Z	IMC	IMC-Z
227	97	10,64	15,35	98,00	0,81	16,5	0,64	7,20	-0,38	5,20	-0,58	16,0	0,27
228	106	9,84	28,00	141,00	-0,05	18,5	-1,33	6,50	-0,92	4,80	-0,61	14,1	-1,87
231	79	5,00	17,00	108,50	-0,33	16,0	-0,38	6,90	-0,37	5,10	-0,27	14,4	-0,58
233	88	17,66	14,75	94,90	-0,67	16,0	0,12	6,70	-0,99	5,00	-0,99	16,4	0,74
234	76	26,09	25,00	123,30	-1,33	20,0	0,43	7,20	-0,79	6,00	-0,27	16,4	0,22
235	75	14,14	27,30	131,20	-1,28	19,0	-0,28	7,90	-0,73	5,90	-0,48	15,8	-0,48
237	87	33,26	26,50	126,00	2,18	20,3	0,99	9,90	0,63	8,20	0,99	16,7	0,97
238	110	18,20	8,90	76,00	-0,96	15,0	0,52	7,00	-0,51	5,90	-0,36	15,4	-0,36
239	82	12,13	18,60	117,00	-0,42	17,5	-0,54	8,40	0,24	4,70	-0,26	13,6	-1,51
240	81	14,14	29,90	147,00	2,39	18,5	-0,09	9,00	-0,32	4,80	-0,62	13,4	-1,80

Ins.: insulina; Glic.: glicose; C ou E: comprimento ou estatura; E/I-Z: escore-z da estatura para a idade;
 CB: circunferência do braço; CB-Z: escore-z da CB; DCT: dobra cutânea tripectral; DCT-Z escore-z da DCT;
 DCS: dobra cutânea subescapular; DCS-Z: escore-z da DCS; IMC: índice de massa corporal;
 IMC-Z: escore-z do IMC.