

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

**COMPARAÇÃO DE GRELINA, LEPTINA, INSULINA E
GLICOSE ENTRE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
CIRRÓTICOS E HÍGIDOS**

CRISTINA TOSCANI LEAL DORNELLES

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil
2010

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

**COMPARAÇÃO DE GRELINA, LEPTINA, INSULINA E
GLICOSE ENTRE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
CIRRÓTICOS E HÍGIDOS**

CRISTINA TOSCANI LEAL DORNELLES

Orientador: Prof. Dra. Themis Reverbel da Silveira

A apresentação da tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

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

ESTA DISSERTAÇÃO / TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

28/04/2010

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dra. Irene Kazue Miura

Departamento de Hepatologia e Pediatria
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

Prof. Dra. Denize Righetto Ziegler

Escola de Alimentos
Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS

Prof. Dra. Elza Daniel de Mello

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelas angústias e preocupações que passaram, pelo amor e carinho. Em especial, à minha mãe, que nunca mediu esforços para oportunizar meus estudos.

Ao meu esposo, meus irmãos e sobrinhos, como um estímulo...

AGRADECIMENTOS

À professora Themis Reverbel da Silveira, minha orientadora, que me permitiu avançar no tempo através da arte de viver e conviver no mundo da ciência!

À professora Helena Ayako Sueno Goldani, pelo reconhecimento do meu trabalho na equipe de gastropediatria, incentivo e apoio que deram início a um projeto “grelina”...

Às queridas colegas e amigas, Maria Inês de Albuquerque Wilasco, pelo companheirismo, amizade, participação e dedicação na pesquisa. Um apoio incondicional, sem direito ao esquecimento!

Michelle Garcia Maksud, Fernanda Odrzywolek Rodrigues e Luciane Beitler da Cruz pela disponibilidade, amizade, dedicação e participação na pesquisa nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Ao meu esposo, Admir Junior Toscani Dornelles, pelo amor incondicional, pela compreensão da minha busca incansável do conhecimento e pelo apoio dedicado no dia-a-dia.

Aos meus pais, Talia Mary Toscani Leal e Carlos de Souza Leal, por serem meus primeiros orientadores, por oportunizarem e incentivarem meus estudos, pelo amor e carinho incondicionais.

À equipe da Gastropediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Carlos Oscar Kieling, pelo auxílio preciso no diagnóstico para captação das crianças atendidas no ambulatório e pelas análises do banco de dados; Cristina Targa Ferreira, pelo incentivo e exemplo de atuação profissional; Jorge Luís dos Santos, pelas críticas e sugestões de forma científica e afeita que fundamentaram uma construção; Sandra Maria Gonçalves Vieira, pela orientação, avaliação clínica dos pacientes e participação no projeto.

Ao amigo e biólogo Rafael Lucyk Maurer, pela serenidade e paciência sempre demonstradas nos ensinamentos das técnicas de laboratório.

A toda à equipe do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Thaís Ortiz, pelas críticas e sugestões que muito contribuíram com a pesquisa.

À amiga e colega de mestrado Cristiane Zilz, pela gentileza de oportunizar meios de acesso ao prontuário *on line*, permitindo uma agilização na pesquisa.

A toda à equipe da zona 14 do Hospital de Clínicas, especialmente à colega Kátia Simone Delgado, que viabilizaram nossa participação nas coletas de sangue, e aos coletadores Mauro, Valentina, Marisa e Rosane, que sempre prestaram um atendimento de excelência.

Aos amigos Paula Ferrugem e Álvaro Macedo Laureado pelo apoio e participação no trabalho.

À amiga Marilene Porawski Garrido que, sempre solícita, auxiliou no entendimento dos complicados processos da homeostase energética.

Ao Professor Dr. Masayasu Kojima, pela gentileza e disponibilização de informações sobre grelina, inclusive de dados ainda não publicados.

Ao FIPE e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização da pesquisa.

À Ceres Oliveira e à Vânia Naomi Hirakata, pela disponibilidade e pelo apoio na análise estatística, dividindo comigo uma parcela dos seus conhecimentos.

Aos colegas do Serviço de Nutrição do Hospital de Clínicas, em especial as “colegas de sala”, Bibiana de Almeida Rubin e Luiza Maria Martins Padilha pelo apoio e compreensão, obrigada!

À querida professora Maria do Horto Motta, pela revisão de linguagem e padronização técnica do texto, o meu muito obrigada!

Aos Professores Boaventura Antônio dos Santos, Cristina Targa Ferreira, Ingrid Dalira Schweigert Perry, pela gentileza em participar da banca examinadora do exame de qualificação, e às Irene Kazue Miura, Denize Righetto Ziegler e Elza Daniel de Mello, integrantes da banca de defesa desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 REGULAÇÃO DA FOME E DO APETITE	5
2.2 SINAIS METABÓLICOS GASTROINTESTINAIS	6
2.2.1 Grelina	7
2.2.1.1 Grelina e funções fisiológicas	12
2.2.1.2 Grelina e regulação do apetite e peso corporal.....	13
2.2.1.3 Grelinemia em cirróticos	15
2.3 SINAIS METABÓLICOS ADIPOCITÁRIOS	16
2.3.1 Leptina	17
2.3.1.1 Leptina e funções fisiológicas	20
2.3.1.2 Leptina e estado nutricional.....	21
2.3.1.3 Leptinemia em cirróticos	23
2.4 NEUROMODULADORES DA FOME E DO APETITE	24
2.5 INSULINA E GLICOSE	25
2.5.1 Mecanismo de ação	26
2.5.2 Modulação hormonal e homeostase	27
2.5.3 Resistência à insulina.....	28
2.5.4 Insulinemia e glicemia em cirróticos.....	29
2.6 CIRROSE	30
2.6.1 Definição	31
2.6.2 Epidemiologia e etiologia.....	31
2.6.3 Desnutrição e anorexia-caquexia.....	32
2.6.4 Avaliação e diagnóstico nutricional	35

SUMÁRIO

3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVO GERAL	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5 PACIENTES E MÉTODOS	43
5.1 DELINEAMENTO	44
5.2 POPULAÇÃO	44
5.3 AMOSTRA	45
5.3.1 Cálculo do tamanho da amostra	45
5.3.2 Critérios de inclusão	46
5.3.3 Critérios de exclusão	46
5.3.4 Coleta de dados	47
5.4 VARIÁVEIS ESTUDADAS	47
5.5 LOGÍSTICA	52
5.5.1 Avaliação Antropométrica	53
5.5.2 Análise dos hormônios e glicose	56
5.6 EQUIPE DE PESQUISA	58
5.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	59
5.8 ANÁLISES DOS DADOS	60
6 RESULTADOS	62
6.1 COMPARAÇÃO ENTRE CIRRÓTICOS E CONTROLES	63
6.2 GRELINEMIA NOS CIRRÓTICOS	68
6.3 LEPTINEMIA NOS CIRRÓTICOS	71
6.4 INSULINEMIA E GLICEMIA NOS CIRRÓTICOS	74
6.5 INGESTÃO ALIMENTAR NOS CIRRÓTICOS	75
7 DISCUSSÃO	78
7.1 COMPARAÇÃO ENTRE CIRRÓTICOS E CONTROLES	79
7.2 GRELINEMIA NOS CIRRÓTICOS	84
7.3 LEPTINEMIA NOS CIRRÓTICOS	90
7.4 INSULINEMIA E GLICEMIA NOS CIRRÓTICOS	92
7.5 INGESTÃO ALIMENTAR NOS CIRRÓTICOS	93
8 CONCLUSÕES.....	97
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
10 PAPER - GHRELIN AND LEPTIN LEVELS IN CIRRHOTIC CHILDREN AND ADOLESCENTS: RELATIONSHIP WITH CIRRHOSIS SEVERITY AND UNDERNUTRITION STATE	
ABSTRACT	116
INTRODUCTION	117
PATIENTS AND METHODS	118
RESULTS	121
DISCUSSION	124
ACKNOWLEDGMENTS	126
REFERENCES	127
11 ANEXOS	136

LISTA DE SIGLAS

AB	_	Atresia biliar
ACTH	-	<i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
AgRP	-	<i>Argouti-Related Protein</i>
AMB	-	Área muscular do braço
AMPK	-	<i>Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
ANOVA	-	Análise de Variância
ARC	-	<i>Acuate Núcleos</i>
BD	-	Bilirrubina direta
BMI	-	<i>Body Mass Index</i>
BT	_	Bilirrubina total
CART	_	<i>Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript</i>
CB	_	Circunferência do braço
CMB	_	Circunferência muscular do braço
CRH	_	<i>Corticotropin Release Hormone</i>
DCT	_	Dobra Cutânea Tricipital

LISTA DE SIGLAS

DCS	_	Dobra cutânea subescapular
DEXA	_	<i>Dual Energy X-Ray Absormetry</i>
DP	-	Desvio-Padrão
EDTA	_	Etilenodiaminotetracetato
EI	_	Estatuta para idade
ELISA	_	<i>Enzime-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	_	Estados Unidos da América
GH	_	<i>Growth Hormone</i>
GHSR	_	<i>Growth Hormone Realease Hormone</i>
GHS-R1a	_	<i>Ghrelin Hormone Secretagogue Receptor-1a</i>
GLP-1	_	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
GOAT	_	<i>Ghrelin O-Acyltransferase</i>
GPPG	_	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCl	_	Ácido Clorídrico
HOMA-IR	-	<i>Homeostasis Model Assessment- Insulin Resistance</i>
IGF-1	-	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IGFBP-3	-	<i>Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3</i>
IMC/I	-	Índice de massa corporal para idade
INR	-	<i>International Normalized Ratio</i>
Kcal	-	Kilocaloria
LEHG	-	Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia
MELD	-	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
NPY		Neuropeptídio Y
OMS	-	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SIGLAS

PE	–	Peso para estatura
PELD	–	<i>Pediatric End-Stage Liver Disease</i>
PI	–	Peso para idade
POMC	–	<i>Pro-Opiomelanocortin</i>
RDA	–	<i>Recommended Dietary Allowances</i>
RDI	–	Recomendação diária de ingestão
RI	–	Resistência insulínica
SNC	–	Sistema Nervoso Central
SPSS	–	<i>Statistical Package For Social Sciences</i>
TGF- β	–	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
UNOS	–	<i>United Network For Organ Sharing</i>
WHO	–	<i>World Health Organization</i>
α -MSH	–	<i>α-Melanocyte Stimulating Hormone</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação gastrointestinal da homeostase energética.....	6
Figura 2 – Peptídios hipotalâmicos neurais envolvidos na regulação do apetite.....	10
Figura 3 – Funções fisiológicas da grelina	12
Figura 4 – Lista de adipocinas e suas funções	16
Figura 5 – Leptina interfere no estado nutricional e na resposta imune	22
Figura 6 – Regulação hipotalâmica do apetite pela grelina e leptina.....	24
Figura 7 – Ação da leptina e insulina.....	28
Figura 8 – Fluxograma de seleção dos pacientes com cirrose	45
Figura 9 – Diagrama de avaliação e classificação do estado nutricional dos cirróticos.....	55
Figura 10 – Relação da grelina total e acilada com a idade nos cirróticos.....	69
Figura 11 – Grelina acilada entre cirróticos, controles e classificação de Child-Pugh	70
Figura 12 – Relação da grelina desacilada com o escore PELD/MELD ≥ 15	70
Figura 13 – Relação ente leptina, idade e parâmetros antropométricos	71
Figura 14 – Relação dos níveis de leptina com o escore-z da EI	73
Figura 15 – Relação dos níveis de leptina com o sexo.....	73
Figura 16 – Glicemia e idade nos cirróticos	74
Figura 17 – Glicemia e ingestão percentual da RDI nos cirróticos.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Ações metabólicas relevantes da leptina	20
Quadro 2 – Causas da cirrose em crianças e adolescentes	32
Quadro 3 – Gravidade da doença hepática de acordo com a classificação Child-Pugh (1973).....	48
Quadro 4 – Equação do PELD	49
Quadro 5 – Equação do MELD	49
Quadro 6 – Estudos conduzidos com hepatopatas crônicos	79
Quadro 7 – Efeitos fisiológicos da grelina	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais da amostra.....	64
Tabela 2 – Dados antropométricos	65
Tabela 3 – Classificação do estado nutricional	66
Tabela 4 – Concentração de grelina, leptina, insulina e glicose.....	67
Tabela 5 – Regressão linear múltipla* para grelina** pelo método <i>stepwise</i>	69
Tabela 6 – Regressão linear múltipla* para leptina** pelo método <i>stepwise</i>	73
Tabela 7 – Regressão linear múltipla* para glicose** pelo método <i>stepwise</i>	75
Tabela 8 – Ingestão alimentar nos cirróticos.....	77
Tabela 9 – Estudos com grelina plasmática em jejum nos hepatopatas crônicos	90
Tabela 10 – Estudos com leptina sérica em jejum nos hepatopatas crônicos.....	93

RESUMO

Introdução e objetivo: Anorexia e desnutrição são causas importantes de desnutrição nas crianças e adolescentes com cirrose. A grelina e a leptina são hormônios envolvidos na homeostase energética, possuem efeitos antagônicos e estão associadas com anorexia em cirróticos. O objetivo deste estudo é avaliar as concentrações de grelina, leptina, insulina e glicose, e o estado nutricional entre crianças e adolescentes cirróticos e hígidos.

Métodos: Estudo transversal prospectivo, realizado com 39 crianças e adolescentes com cirrose (66,7% atresia biliar) idade entre 2,5 e 188 meses, sendo 51,3% do sexo feminino e 51,3% eram Child-Pugh A; 41%, B e 7,7%, C respectivamente, e 39 controles hígidos pareados por sexo e idade. As concentrações de grelina, leptina, insulina e glicose foram dosadas pelo método de ELISA. Amostras de sangue foram coletadas pelo menos após 3 horas de jejum. A gravidade da doença hepática foi avaliada pela classificação de Child-Pugh e pelo escore PELD e/ou MELD. A avaliação antropométrica foi realizada pelos índices de estatura para idade, prega cutânea tricípital e a classificação foi determinada de acordo com os padrões WHO 2009 e Frisancho 2008.

Resultados: A grelina apresentou correlação inversa com a idade. Os valores medianos (percentil 25-75) de grelina acilada foram significativamente menores nos cirróticos do que nos controles [140,3 (93,9-269,7) pg/ml *versus* 277,8 (209,9-557,8) pg/ml, $P=0,003$]. Os valores medianos da grelina total e desacilada dos cirróticos foram 913,4 pg/ml (760,8-1443,7) e 1397,8 pg/ml (815,27-2.047) respectivamente. Os valores medianos da leptina, insulina e glicose não foram significativamente diferentes entre os cirróticos e os controles ($P=0,421$; $P=0,908$; $P=0,851$). A grelina acilada foi associada com a gravidade e classificação de Child-Pugh, e a grelina desacilada com o escore PELD ≥ 15 . A leptina apresentou correlação positiva com os parâmetros antropométricos, hematócrito e hemoglobina. Os cirróticos desnutridos apresentaram níveis diminuídos de leptina quando comparados aos cirróticos bem nutridos ($P=0,023$).

Conclusões: A concentração diminuída de grelina acilada e aumentada de grelina total e desacilada relacionaram-se com a gravidade da doença hepática, enquanto os níveis séricos de leptina com desnutrição em crianças e adolescentes cirróticos. A insulina e a glicose não apresentaram associação com as variáveis estudadas.

Palavras chave: cirrose, anorexia, desnutrição, grelina, leptina, crianças

ABSTRACT

Introduction and Objective: Anorexia and undernutrition state are a problem of paramount importance in children and adolescents with cirrhosis. Ghrelin and leptin are the main hormones involved in the control of food intake and body weight, having antagonistic effects and being associated with anorexia in cirrhotic patients. This study aimed to investigate the relationship between fasting ghrelin, leptin, insulin and glucose concentrations; and the nutritional status in pediatric cirrhotic patients, comparing with sex- and age-matched healthy controls.

Methods: Cross-sectional study evaluated 39 children with cirrhosis (biliary atresia as etiology in 66.7%) aged between 2.5 and 188 months, 51.3% female were evaluated, 51.3% were Child-Pugh A; 41%, B and 7.7%, C. Other 39 healthy children matched for sex and age, taken as controls, were also evaluated. Blood samples were collected at least after 3-hours fasting. Fasting total ghrelin, acyl ghrelin, leptin, insulin and glucose levels were measured using a commercial ELISA kit. Severity of liver disease was assessed by Child-Pugh classification, and PELD or MELD score. Anthropometric parameters including, body fat mass and height for age were determined and classified according to WHO 2009 and Frisancho 2008 standard reference.

Results: Plasma ghrelin levels showed an inverse correlation with age. Median values (25-75 centile) of acylated ghrelin were significantly lower in cirrhotics than in healthy controls [142 (93-278) pg/ml vs 275 (208-481) pg/ml, $P=0.001$]. Median values of leptin, insulin and glucose were not significantly different between cirrhotics and controls ($P=0.421$; $P=0.908$; $P=0.851$). Ghrelin levels were associated with the severity of Child-Pugh classification and PELD or MELD scores ≥ 15 . Ghrelin levels did not associate with gender and causes of cirrhosis. Leptin levels were correlated positively with anthropometric parameters, hematocrit and hemoglobin. Undernourished cirrhotic patients had lower leptin levels than well-nourished ($P=0.023$).

Conclusion: Plasma acyl ghrelin concentration are lower and total and desacyl ghrelin were higher and associated with cirrhosis severity, whereas leptin was associated with undernourishment in children and adolescents with cirrhosis. Insulin and glucose were not associated with any variable.

Keywords: Cirrhosis, anorexia, undernourishment, ghrelin, leptin, children

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A anorexia é um problema de fundamental importância em pacientes com doença hepática avançada, contribuindo significativamente para a desnutrição (PLAETH, 2002; TSIAOUSI *et al.*, 2008). Em crianças e adolescentes, os acréscimos energéticos necessários para promover o crescimento, aliados à inapetência característica, tornam a desnutrição um problema ainda mais difícil de ser combatido.

A desnutrição é uma condição comum em cirróticos à medida que a doença avança. Os mecanismos de desnutrição na cirrose ainda não estão completamente elucidados, sabe-se, porém, que ingestão alimentar insuficiente e hipermetabolismo contribuem para um balanço energético negativo (HARDY & KLEINMAN, 2007; SCHIFF *et al.*, 2007).

Grelina, leptina e insulina são hormônios fundamentais no balanço energético. A grelina atua na liberação do hormônio do crescimento (GH) (em inglês, *growth hormone*) e na estimulação do apetite, sendo um sinal de fome para o sistema nervoso central (SNC), com ação independente de seu efeito estimulante do GH (KOJIMA & KANGAWA, 2005; CHEN *et al.*, 2009a). Além dessas, possui também outras funções, como modulação do sistema imunológico através de efeitos anti-inflamatório e antioxidante, importantes na proteção contra a lesão hepática (DIXIT *et al.*, 2004; IŞERI *et al.*, 2008). A leptina suprime o apetite e

transmite sinais de saciedade para o cérebro. WANG *et al.* (2009) sugerem que ela pode mediar a fibrose hepática, porém a maneira pela qual as rotas de leptina e grelina contribuem para a anorexia-caquexia ainda não está bem esclarecida. Em cirróticos adultos, a resistência periférica à insulina e a hiperglicemia já estão bem caracterizadas; em crianças e adolescentes, no entanto, há necessidade de mais estudos.

O conhecimento sobre a relação específica da homeostase energética na regulação do apetite em crianças e adolescentes com cirrose é de suma importância, em razão de suas contribuições à ingestão alimentar e ao peso corporal, relacionando-se com a perspectiva das suas atuações terapêuticas na anorexia-caquexia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REGULAÇÃO DA FOME E DO APETITE

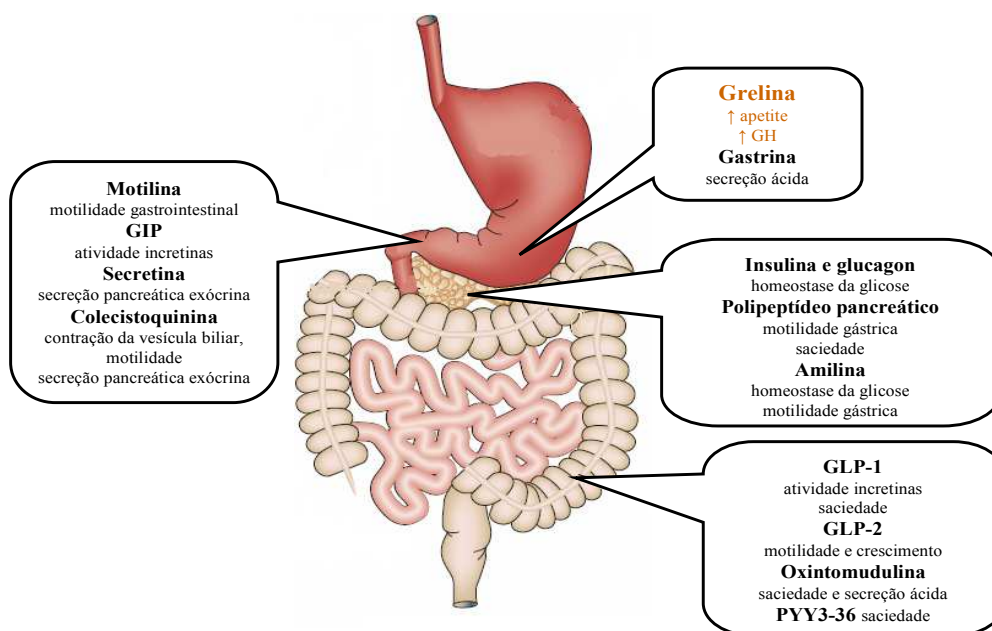
A fome relaciona-se a mecanismos fisiológicos, biológicos e instintivos; o apetite refere-se ao desejo físico ou emocional de ingerir alimentos específicos, e a saciedade, à sensação de plenitude em relação à necessidade em alimentar-se. Fome e saciedade não são determinantes únicos da ingestão alimentar ou de sua interrupção; são sensações de resposta a um controle e manutenção da homeostase energética, consolidada numa perspectiva genético-evolutiva.

A homeostase energética ajusta-se ao longo do tempo bem como promove estabilidade na quantidade de energia armazenada sob a forma de tecido adiposo (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Os dados ainda são conflitantes, mas vários hormônios e neuromoduladores atuam na regulação da fome e do apetite. Os neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos compõem apenas uma parcela dessa complexa regulação que integra um conjunto de sinais neuroendócrinos sensíveis ao estado metabólico e à ingestão calórica, permeando sensações de fome, apetite, saciedade e gasto energético. Fazem parte desses sinais neuroendócrinos: os gastrintestinais, os adipocitários, os neuromoduladores da fome e do apetite e outras substâncias como a insulina e a glicose (LEITE & BRANDÃO-NETO, 2009).

2.2 SINAIS METABÓLICOS GASTROINTESTINAIS

O núcleo paraventricular do hipotálamo recebe também sinais de outros peptídios relacionados à regulação do apetite, os quais atuam em receptores dos nervos autônomos, principalmente do nervo vago. Esses peptídios abrangem os sinais gastrintestinais, os quais interferem na regulação da ingestão alimentar: a grelina, a colecistocinina, o peptídeo YY, o polipeptídeo pancreático, a amilina, as incretinas e a oxintomodulina, com funções específicas sumarizadas na figura 1.

A grelina é o primeiro e o único sinal periférico gastrointestinal conhecido de aumento do apetite (KOJIMA & KANGAWA, 2008), o que a torna alvo do nosso interesse neste estudo com crianças e adolescentes cirróticos.



GLP-1: *Glucagon-Like Peptide-1*; **GLP-2:** *Glucagon-Like Peptide-2*
PYY3-36: Peptídeo YY3-36; **GIP:** *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*

Figura 1- Regulação gastrointestinal da homeostase energética

Fonte: Modificado de Murphy & Bloom, 2006

2.2.1 Grelina

A grelina (*ghre*, do grego, e *grow*, em inglês, que significa crescimento) é um hormônio peptídico, composto por 28 aminoácidos, que atua na liberação do hormônio do crescimento (GH) (em inglês, *Growth Hormone*) e como modulador da homeostase energética na regulação da ingestão alimentar (KORBONITS & GROSSMAN, 2004; SOARES & MOREIRA, 2008). Em 1999, a grelina acilada foi identificada por Kojima e colaboradores como um ligante cognato endógeno para o receptor secretagogo do GH (GHS-R1a) (em inglês, *ghrelin hormone secretagogue receptor-1a*), conhecido como um receptor órfão. Foi descoberta a partir de extratos gástricos naturais do estômago, ou seja, por "farmacologia reversa" (KOJIMA *et al.*, 1999; KOJIMA *et al.*, 2001).

O gene da grelina humana está localizado no cromossomo 3p25-26, e o gene do hormônio liberador do GH (GHSR) (em inglês, *Growth Hormone Realease Hormone*) também se localiza no cromossomo três, na posição q26-27 (SMITH *et al.*, 1997) e é codificado nos éxons dois e três (KOJIMA & KANGAWA, 2005; KOJIMA & KANGAWA, 2008). O gene da grelina pode gerar várias moléculas bioativas: a grelina acilada, a desacilada e a obestatina (SOARES & MOREIRA, 2008).

- **Grelina acilada e desacilada**

As duas principais formas da grelina encontradas no estômago e no plasma são a grelina desacilada, que é a forma na qual é secretada, e a grelina acilada (HOSODA *et al.*, 2000). No plasma, a grelina desacilada é encontrada predominantemente entre 75-90% ou mais, e a grelina acilada em cerca de 10-25% da grelina total (CHEN *et al.*, 2009b). Camilleri *et al.* (2009) sugerem que a grelina desacilada apresenta ações biológicas sutis e às vezes contraditórias no controle da homeostase energética, motilidade gastrointestinal e proliferação celular. Esses efeitos normalmente se opõem ou modificam a ação da grelina.

A grelina acilada age no GHS-R1a para estimular a liberação de GH. Possui uma modificação *n-octanoica* única postranslacional na serina que está na posição três, caracterizando a descoberta do primeiro caso conhecido de um hormônio peptídico modificado por um ácido graxo (KOJIMA *et al.*, 1999; KOJIMA *et al.*, 2001). O grupamento acil que se liga à grelina sintetizada corresponde aos ácidos graxos que foram ingeridos, indicando que os mesmos são usados diretamente para a acilação da grelina (KOJIMA & KANGAWA, 2005). Essa modificação é indispensável para aumentar a ingestão de alimentos e a adipogênese em humanos e ratos (KOJIMA & KANGAWA, 2005; CHEN *et al.* 2009b). Há evidências de que a ingestão de triglicerídios de cadeia média pode aumentar a produção da grelina acilada sem alterar o nível da grelina total (acilada e desacilada).

O GHS-R é um receptor de ligação para uma proteína G e tem muitos homólogos, cujos ligantes endógenos são peptídeos gastrointestinais ou neuropeptídeos. O receptor da grelina é homólogo ao da motilina; ambas as formas humanas compartilham 52% de aminoácidos idênticos (FEIGHNER *et al.*, 1999; INUI, 2001; SMITH *et al.*, 2001). A grelina desacilada não se liga ao receptor da grelina, mas provavelmente a um receptor ainda não identificado (HOSODA *et al.*, 2003).

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 oxíntica de ratos, a atividade *in vitro* e suas propriedades enzimológicas, uma aciltransferase de cadeia média específica para grelina. A regulação da atividade da GOAT interfere nas atividades e nas funções fisiológicas da grelina, em particular na regulação do apetite, sugerindo que ela possa ser um alvo terapêutico no futuro (SAKATA *et al.*, 2009; OHGUSU *et al.*, 2009).

A grelina acilada, a desacilada, a obestatina, o GHS-R1a e a GOAT podem ser parte de um sistema com vários elementos efetores que constitui o centro de um eixo integrado cérebro-intestino, modulando o apetite, a digestão, a motilidade intestinal, a adiposidade e a distribuição de nutrientes (CHEN *et al.*, 2009b).

- **Regulação da secreção e concentração da grelina**

A grelina é produzida no estômago, principalmente nas células do fundo (corpo) (DATE *et al.*, 2000a), nas células X/A-like, um tipo distinto de células endócrinas encontradas na mucosa do estômago (DATE *et al.*, 2000b), podendo também ser encontradas no duodeno, no jejuno, no íleo, no pâncreas, no cólon e em outros tecidos (DATE *et al.*, 2000a; GNANAPAVAN *et al.*, 2002; YOSHIMOTO *et al.*, 2002; KOJIMA & KANGAWA, 2008; KOJIMA & KANGAWA, 2010). Age no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (em inglês, *arcuate nucleus*), uma importante região no controle do apetite (HOWARD *et al.*, 1996; GUAN *et al.*, 1997; NAKAZATO *et al.*, 2001). Outros estudos também indicaram sua presença em neurônios hipotalâmicos de tipo não caracterizado previamente (COWLEY *et al.*, 2003). Também foi encontrada na glândula hipófise onde pode agir na liberação do GH por uma via autócrina ou parácrina. Esse padrão de localização sugere desempenhar 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).

No ARC, a grelina induz uma pré-sinapse nos neurônios que expressam o neuropeptídeo Y (NPY) para liberá-los, estimulando a ingestão alimentar. Esses neurônios produtores de grelina no ARC também aumentam a taxa de GABA (*Gamma-Amino Butyric Acid*; ácido gama-aminobutírico) que pode modular uma pós-sinapse para liberar a pro-opiomelanocortina (POMC) (em inglês, *Pro-Opiomelanocortin*) e o transcrito e regulado por cocaína e anfetamina (CART) (em inglês, *cocaine and amphetamine regulated transcript*).

No núcleo paraventricular, 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 inglês, *Corticotropin Release Hormone*) e levando à liberação de ACTH (*Adrenocorticotropic Hormone*; hormônio adrenocorticotrófico) e cortisol (KOJIMA & KANGAWA, 2005), figura 2.

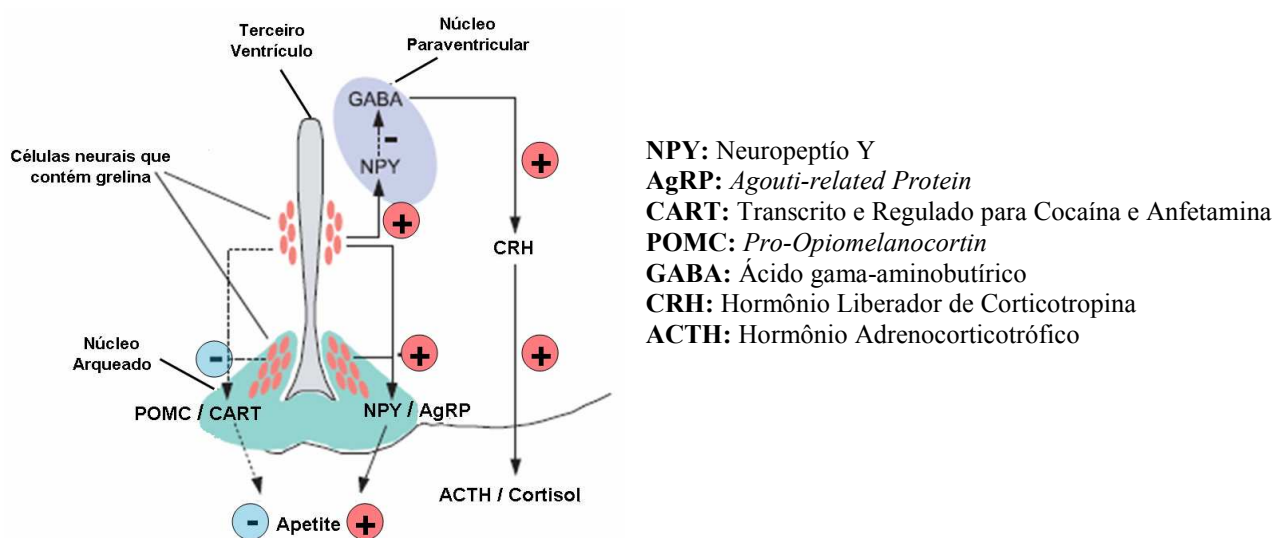


Figura 2 - Peptídeos hipotalâmicos neurais envolvidos na regulação do apetite
Fonte: Modificado de Kojima & Kangawa, 2005

O controle da secreção da grelina acilada pré-prandial não está completamente esclarecido, mas a ação simpática pode estar envolvida (DE LA COUR *et al.*, 2007; KOJIMA & KANGAWA, 2010). Sua supressão pós-prandial não é mediada apenas por nutrientes no estômago ou duodeno, pois ocorre também quando os mesmos são administrados por infusão jejunal, gástrica ou duodenal (OVERDUIN *et al.*, 2005). O nível de glicose no sangue também pode ser um fator crítico, pois, quando a glicose é administrada oral ou intravenosamente, a concentração de grelina no plasma diminui (SHIYA *et al.*, 2002).

Sánchez *et al.* (2004) referem que carboidratos apresentam um maior efeito supressor em relação aos lipídios. A glicose e os aminoácidos suprimem mais efetivamente do que

lipídios e frutose (TEFF *et al.*, 2004; OVERDUIN *et al.*, 2005). Além disso, 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). Um outro estudo mostra uma supressão bifásica da grelina, caracterizada pela diminuição inicial de grelina total e acilada e um efeito rebote muito aumentado sobre os valores pré-prandiais iniciais, após a ingestão de carboidratos isolados, sugerindo que as dietas hiperproteicas e pobres em carboidratos contribuem para a perda de peso, e as ricas em gordura, para aumentar o ganho de peso (FOSTER-SCHUBERT *et al.*, 2008). A supressão da grelina acilada pós-prandial está demonstrada em animais e humanos adultos, mas não em crianças (BELLONE *et al.*, 2004).

A grelina desacilada eleva-se pelo jejum induzido em ratos e humanos e é suprimida pela alimentação (SEOANE *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008; MONDAL *et al.*, 2008; KIRCHNER *et al.*, 2009). Estudo recente mostrou que é regulada em resposta à privação de alimento em ratos, apoiando a ideia de que grelina desacilada desempenha um papel fisiológico ainda indefinido no comportamento alimentar (KIRCHNER *et al.*, 2009).

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 340-519pg/ml (100 – 150 fmol/ml) para a grelina total (acilada e desacilada) (KOJIMA & KANGAWA, 2005). A concentração de grelina plasmática é sensível ao número e ao horário de refeições (ERDMANN *et al.*, 2003; GREENMAN *et al.*, 2004). Há um aumento pré-prandial e uma supressão pós-prandial em humanos que iniciam a refeição voluntariamente, sem horários fixos (CUMMINGS *et al.*, 2004). A distensão gástrica pela água não altera a concentração de grelina, e a distensão mecânica isolada não induz sua secreção (KOJIMA & KANGAWA, 2005). No entanto, a concentração de grelina é sensível ao tipo de refeição: diminui com refeição hiperlipídica e aumenta com hiperproteica (KOJIMA & KANGAWA, 2008).

2.2.1.1 Grelina e funções fisiológicas

A grelina é um hormônio peptídico que desempenha várias funções fisiológicas, conforme destacado na figura 3 (KOJIMA & KANGAWA, 2005; CAMILLERI *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2009b). Contudo, o enfoque neste estudo é sua atividade no controle metabólico do apetite, visando contribuir para o tratamento da anorexia-caquexia.

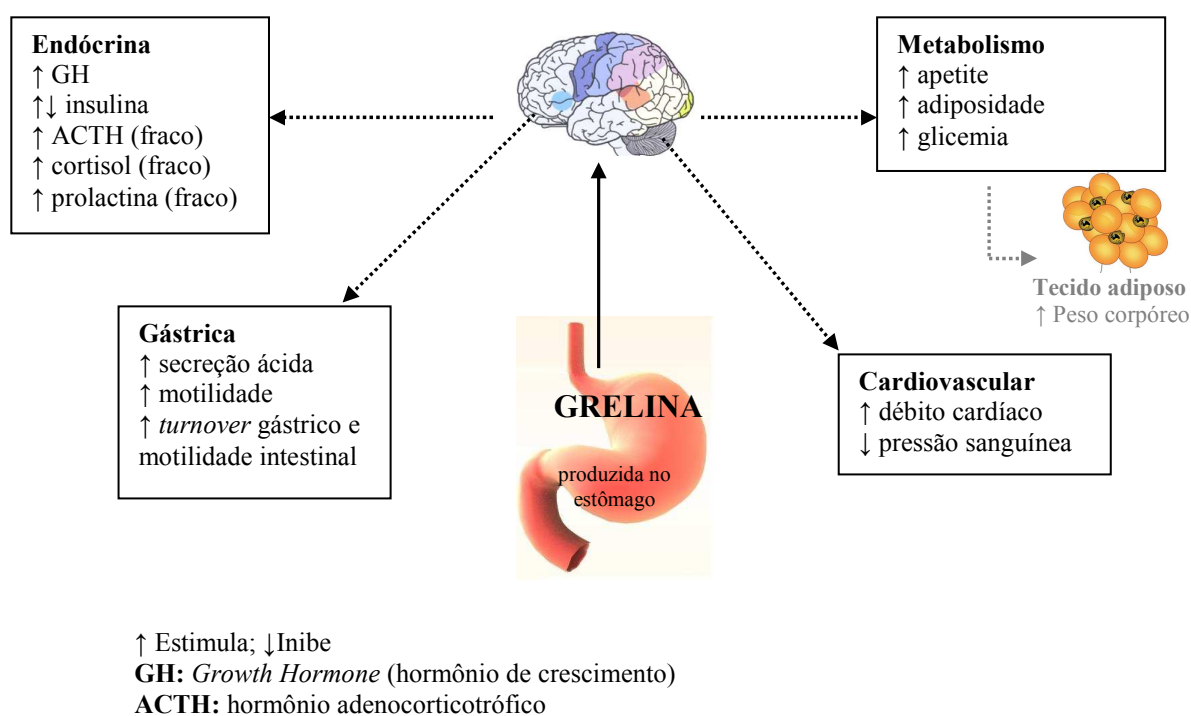


Figura 3 - Funções fisiológicas da grelina acilada

- **Grelina e liberação de GH**

A grelina estimula a liberação de GH tanto *in vivo* quanto *in vitro*, diretamente proporcional à dose aplicada (ARVAT *et al.*, 2000). A liberação de 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 de GH no plasma de ratos de uma maneira diretamente proporcional, com uma dose mínima de 10 pmol (DATE *et al.*, 2000b). Altas doses de grelina em humanos aumentam os níveis de ACTH, prolactina e cortisol (ARVAT *et al.*, 2001).

2.2.1.2 Grelina e regulação do apetite e peso corporal

Até a descoberta da grelina, o sinal de fome dos tecidos periféricos permanecia sem identificação, sendo a alimentação o fator mais importante na sua regulação. Em adultos, os níveis de grelina no plasma aumentam imediatamente antes de cada refeição e se reduzem aos níveis basais uma hora após a ingestão habitual (CUMMINGS *et al.*, 2001). Na infância, o papel fisiológico da grelina no início da refeição também foi demonstrado e correlacionado com os dados antropométricos e a idade no crescimento durante os primeiros meses de vida (SAVINO *et al.*, 2006). 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 nível de grelina no plasma é mais baixo em indivíduos obesos do que em não obesos (TSCHÖP *et al.*, 2001; HAQQ *et al.*, 2003). 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). Segundo Cummings *et al.* (2001), a concentração plasmática aumenta em condições de jejum e se reduz após alimentação, determinando o

papel da grelina como um gatilho para o início da refeição. A expressão do gene da grelina no estômago aumenta com o jejum e diminui com a administração de leptina e interleucina-1 β . A grelina acilada produz um balanço energético positivo devido ao aumento da ingestão alimentar e à diminuição do gasto de energético, bem como através do bloqueio da anorexia induzida pela interleucina-1 β (KIM *et al.*, 2003).

Além de sua influência sobre o apetite, a grelina acilada interfere no peso corporal e na adiposidade (CHEN *et al.*, 2009b). Estudo recente revelou que a grelina acilada pode limitar a utilização de tecido adiposo branco durante a privação calórica (DAVIES *et al.*, 2009). Dentre as ações periféricas da grelina, destacam-se a estimulação da secreção ácida, a motilidade gástrica e os distúrbios da motilidade gástrica (ASAKAWA *et al.*, 2001; BALDELLI *et al.*, 2001; ASAKAWA *et al.*, 2005; CAMILLERI *et al.*, 2009). Mietlicki *et al.* (2009), em experimentos com ratos, sugerem que as ações de grelina acilada não se limitam ao estímulo da ingestão alimentar, mas também podem incluir alterações que inibem o consumo de água, o que lhe confere um papel preponderante no comportamento alimentar (CHEN *et al.*, 2009b). A grelina desacilada também pode estar envolvida no comportamento alimentar, no metabolismo e na regulação do peso corporal, provavelmente por contrariar o elevado nível de grelina endógena acilada em certas situações fisiológicas e, em seguida, amortecendo seus efeitos biológicos, tais como alimentação e balanço energético (CHEN *et al.*, 2009b).

Essa multiplicidade de funções da grelina acilada e as perspectivas potenciais de seus análogos na prática clínica, na nutrição e no metabolismo, já está avançando para o desenvolvimento de pesquisas terapêuticas potenciais na utilização de agonistas e antagonistas desse hormônio nos diferentes tipos de doenças.

2.2.1.3 Grelinemia nos cirróticos

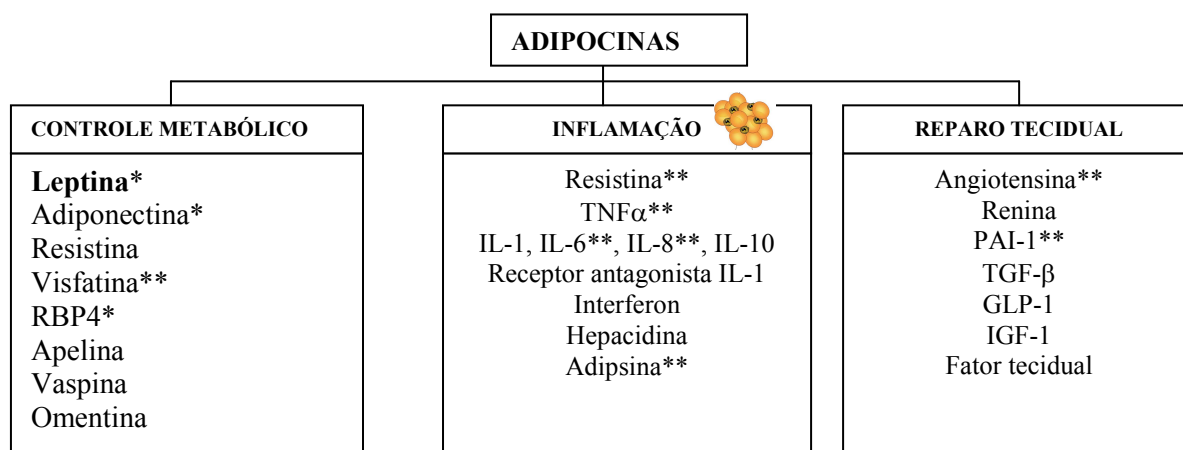
Estudos realizados com cirróticos adultos sugerem que a hipogrelinemia pode estar associada com a gravidade da doença hepática, com anorexia e com perda de peso e/ou desnutrição (TACKE *et al.*, 2003; MARCHESINI *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2006, DIZ-LOIZ *et al.*, 2009). Breidert *et al.* (2004) demonstraram uma concentração de grelina diminuída e de leptina aumentada em adultos com cirrose biliar associada à resistência insulínica. Tacke *et al.* (2003) avaliaram a grelina em jejum em cirróticos e encontraram valores significativamente elevados quando comparados a controles e sem correlação com a função hepática; entretanto, níveis aumentados foram vistos em pacientes com Child-Pugh C e com complicações severas (sangramento intestinal, ascite, encefalopatia hepática). Marchesini *et al.* (2004) mostraram que a concentração de grelina foi significativamente associada com ingestão alimentar e desnutrição, mas não foi maior nos controles e também não apresentou correlação com a gravidade da doença hepática. Takahashi *et al.* (2006) registraram correlação significativa da grelina com parâmetros antropométricos e com metabolismo basal, sugerindo que refletem a desnutrição e podem ser um indicador em cirróticos. Observaram ainda que não houve associação dos níveis de grelina com a gravidade e com a classificação de Child-Pugh. Em crianças e adolescentes com cirrose, não foram encontrados estudos com grelina.

A grelina tem se revelado eficaz no aumento da massa magra e da atividade em adultos caquéticos através dos efeitos orexígeno, anabolizante e anti-inflamatório, capazes de melhorar a qualidade de vida (ASHITANI *et al.*, 2009). Além disso, efeitos anti-inflamatório e antioxidante da grelina têm sido demonstrados, sugerindo que ela tenha uma ação antifibrótica e um efeito protetor contra a obstrução hepática induzida pela fibrose, bem como um potencial terapêutico importante (IŞERI *et al.*, 2008).

2.3 SINAIS METABÓLICOS ADIPOCITÁRIOS

O tecido adiposo atualmente é considerado um importante órgão endócrino-metabólico que recebe sinais neuroendócrinos, autócrinos e parácrinos e que produz substâncias sinalizadoras de estruturas hipotalâmicas envolvidas na regulação da fome, saciedade e ingestão alimentar (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). As “adipocinas” (tecido adiposo citocinas), moléculas ativas produzidas pelos adipócitos, afetam funções do SNC, músculo esquelético e fígado (LEITE & BRANDÃO-NETO, 2009), atuando no controle metabólico, na inflamação e no reparo tecidual, como demonstrado na figura 4 (MARRA & BERTOLANI, 2009).

A leptina será estudada pelo seu papel-chave na homeostase energética, atuando no controle da saciedade, e mais recentemente, por sua atuação profibrogênica.



RBP4: Proteína Ligadora de Retinol-4; **IL:** Interleucina; **TNF α :** Fator de Necrose Tumoral- α

PAI-1: Inibidor de Ativação de Plasminogênio-1; **TGF- β :** *Transforming Growth Factor- β*

GLP-1: *Glucagon-Like Peptide-1*; **IGF-1:** *Insulin Growth Factor-1*

* Expressão predominante no tecido visceral e no** tecido subcutâneo.

Figura 4 - Lista de adipocinas e suas ações
 Fonte: Modificado de Marra & Bertolani, 2009

2.3.1 Leptina

Em 1994, foi identificado o gene *ob* (obeso), e sua proteína codificada foi denominada leptina (ZHANG *et al.*, 1994). Oriundo do grego, *leptos* significa magro, caracterizando sua função anorexígena (AHIMA *et al.*, 1996). A leptina constitui-se de 167 aminoácidos e com peptídeo terminal de 21 aminoácidos e sua estrutura a classifica como da família das citocinas, tendo de quatro a cinco segmentos helicoidais (JANECKOVA, 2001). O gene *ob* se encontra no cromossomo 7q31.3, possui 650 kb e a região que codifica a síntese de leptina localiza-se nos éxons 2 e 3 (HERMSDORFF *et al.*, 2006). É um hormônio derivado do tecido adiposo, apresenta 16 kDa, homólogo à *ob* murina, e é uma das adipocinas mais importantes no controle da homeostase energética.

É produzida quase que exclusivamente em adipócitos diferenciados, principalmente no tecido subcutâneo, em relação direta com o seu teor de triglicerídios, embora seja encontrada em outros tecidos (MEIER & GRESSNER, 2004). É considerada um sinal de adiposidade, pois seus níveis são diretamente relacionados à quantidade de gordura armazenada pelo corpo (WOODS & DIALESSIO, 2008).

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; FLIER, 2004).

- **Regulação da secreção e concentração da leptina**

A leptina é secretada para a circulação de modo pulsátil, com significativas variações diurnas, e está presente ao longo do desenvolvimento puberal masculino e feminino (ANKARBERG-LINDGREN *et al.*, 2001; MARTOS-MORENO *et al.*, 2010). No entanto, as ações da leptina sobre tecidos-alvo são moduladas por ligações de formas truncadas circulantes de seus receptores (SMITH *et al.*, 2005). Os receptores de leptina pertencem à família de receptores de citocinas da classe I, e pelo menos seis isoformas de receptores da leptina foram identificados em camundongos (*ob*-Ra, *ob*-Rb, *ob*-Rc, *ob*-Rd, *ob*-Re e *ob*-Rf) (LEE *et al.*, 1996) e, em humanos, quatro isoformas (LEP-R5, R15, R67 e R274) (BARR *et al.*, 1999) estando divididos em classes: longos, curtos e solúveis em ambas as espécies (KOERNER *et al.*, 2005). Somente o receptor Rb/R274 isoforma possui forma longa, ou seja, um número maior de aminoácidos, e contém domínio intracelular que é capaz de realizar a transdução total do sinal de ligação da leptina para dentro da célula (ZHANG *et al.*, 2005).

As concentrações mais elevadas desta isoforma são encontradas no hipotálamo, considerado o mediador dos efeitos centrais da leptina, principalmente através da ativação da rota janus quinase e sinalização transdutor e ativador de transcrição. 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 do sinalizador da supressão da citocina-3, que é a molécula que inibe a sinalização da leptina (BJØRBAEK *et al.*, 1998; MARRA & BERTOLANI, 2009). As isoformas mais curtas (*ob*-Ra, *ob*-Rc e *ob*-Rd) parecem atuar como os transportadores de leptina em diferentes locais (KOERNER *et al.*, 2005).

É prevalente no hipotálamo, nos núcleos arqueado, paraventricular, dorsomedial e ventromedial, que são áreas relacionadas ao controle da ingestão alimentar e gasto energético (MEIER & GRESSNER, 2004; ZHANG *et al.*, 2005), que envolvem a maioria dos seus efeitos biológicos e apresenta papel fundamental na homeostase energética pela ação anorexígena da leptina (FRIEDMAN, 2002). Sua ação central no cérebro, especialmente no hipotálamo, é bem caracterizada pela homeostase energética e por sua importância na função reprodutiva (FLIER, 2004). A leptina age através de receptores centrais, especialmente no hipotálamo, e em vários tecidos periféricos, como pâncreas, fígado, tecido adiposo e sistema imunológico (BJØRBAEK & KAHN, 2004).

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 gasto energético e perda de peso, enquanto 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). Através de sua ação inibitória sobre o NPY, leptina exerce muitas outras ações de âmbito central, afetando o eixo adrenal, tireóide e somatotrófico.

2.3.1.1 Leptina e funções fisiológicas

A leptina é um hormônio que age mais na regulação da quantidade de energia do que na perda de peso (FLIER, 1998). Seus níveis diminuem no jejum, na perda de peso, em situações de estresse, mostrando o efeito da leptina como um sinalizador do tamanho dos estoques de gordura. O ritmo circadiano e o pico de sua secreção ocorrem durante a noite e

nas primeiras horas da manhã. O ritmo diurno da leptina é vinculado ao momento escolhido da alimentação. A velocidade de secreção da leptina é lenta (CISTERNAS, 2002). 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 e seus antagonistas participarem do processo (MORENO *et al.*, 2001).

Uma das ações periféricas mais importantes da leptina é a redução da síntese e da secreção de insulina, estabelecendo-se, assim, um eixo “adipo-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.

A leptina é responsável também por estimular a oxidação de ácidos graxos e a captação de glicose, impedindo assim o acúmulo de gordura nos tecidos (quadro 1).

Estimula

- gasto energético
- estimulação do aumento da glicose no músculo esquelético
- secreção de insulina
- expressão de adiponectina
- citocinas pró-inflamatórias (exemplo: interleucina-6, fator de necrose tumoral- α)

Inibe

- ingestão alimentar
- produção de glicose hepática
- biossíntese de ácido graxo
- expressão de resistina e RBP4 (proteína ligadora de retinol-4)

Quadro 1 – Ações metabólicas relevantes da leptina

Fonte: Modificado de Marra & Bertolani, 2009

Além da função 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. Contudo, o papel fisiológico

desempenhado pela leptina e grelina no desenvolvimento sexual, bem como seus sinais metabólicos na puberdade e em situações opostas de desnutrição crônica, obesidade e anorexia ainda não está bem elucidado (MARTOS-MORENO *et al.*, 2010).

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, enquanto no masculino ocorre uma diminuição progressiva. Isso se deve às diferenças hormonais, tendo a testosterona correlação negativa com níveis de leptina. A expressão dessa proteína é duas a três vezes maior no tecido subcutâneo do que no visceral (MARRA & BERTOLANI, 2009), particularmente no sexo feminino, em razão de os adipócitos subcutâneos serem maiores do que os viscerais (HERMSDORFF *et al.*, 2006).

2.3.1.2 Leptina e estado nutricional

As concentrações podem ser definidas pela alimentação recebida nos primeiros anos de vida e esses hormônios podem ser mecanismos que ligam a dieta na infância ao risco de desenvolver doenças na vida adulta, tanto em indivíduos saudáveis como em doentes. 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, retardariam o processo (DUNGER *et al.*, 2006). Em 1997, foi demonstrada a presença de leptina no leite materno e, mais recentemente de grelina e adiponectina, sugerindo um importante papel biológico desses hormônios na modulação da termogênese e na utilização de energia no metabolismo neonatal (SAVINO *et al.*, 2008).

As concentrações de leptina periférica parecem diminuir após privação de alimento, normalizando-se após a realimentação (KOLACZYNSKI *et al.*, 1996). Os níveis de leptina

circulantes parecem estar diretamente correlacionados com o índice de gordura corporal tanto em adultos como em crianças e adolescentes (MARTOS-MORENO *et al.*, 2010).

A leptina tem ainda papel fundamental sobre os sistemas imunológico, hematopoiético e cardiovascular. É um potente modulador de resposta imunológica. Os efeitos imunomodulatórios da leptina requerem interação direta com o receptor *ob-Rb*.

Os efeitos imunomoduladores da leptina indicam que ela participa de uma imunidade inata e sua deficiência aumenta a susceptibilidade aos efeitos deletérios das doenças infecciosas. A dramática queda na produção de leptina induzida pela desnutrição também causa imunossupressão e pode ser revertida por terapia de reposição com leptina (STOFKOVA, 2009). A leptina estimula a síntese de citocinas próinflamatórias como fator de necrose tumoral- α , interleucina-6, interleucina-8, entre outros. Contudo, as ações da leptina na produção de citocina ainda é controversa (STOFKOVA, 2009), os efeitos dos sinais metabólicos do tecido adiposo na desnutrição e supernutrição também necessitam de mais esclarecimentos, principalmente nas doenças crônicas (figura 5).

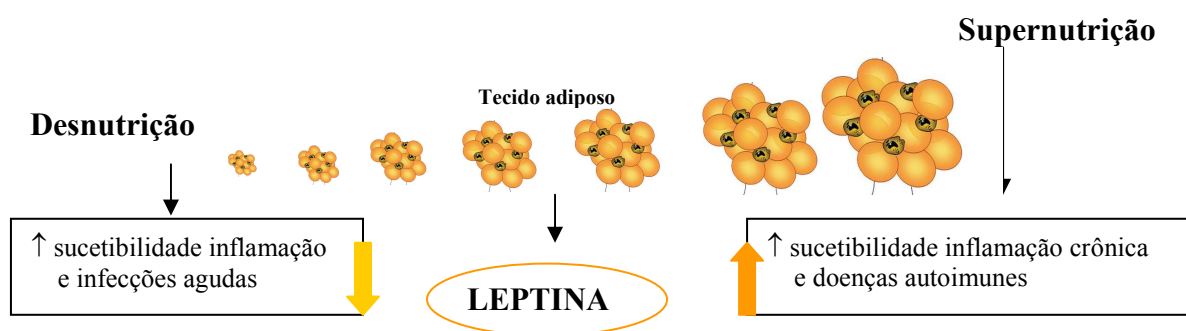


Figura 5 – Leptina interfere no estado nutricional e na resposta imune
Fonte: Modificado de Stofkova *et al.*, 2009

2.3.1.3 Leptinemia nos cirróticos

Em dois estudos que avaliaram leptina em crianças e adolescentes com hepatopatia crônica, a concentração de leptina apresentou valores inversos aos encontrados em adultos. Roberts *et al.* (1998) relataram que a concentração sérica de leptina foi menor no pré-transplante, mas não mostrou correlação com as medidas de gordura corporal. Na evolução pós-transplante, houve elevação da leptina e aumento da dobra cutânea tricípital e da circunferência do braço, sugerindo que existam mecanismos de anorexia e caquexia característicos da doença. Honsawek *et al.* (2008) encontraram níveis inferiores de leptina nos pacientes com atresia biliar, quando comparados aos dos controles saudáveis. Os níveis de leptina foram inferiores nos pacientes com atresia biliar, quando comparados aos dos controles. E foi significativamente menor nos pacientes com colestase em relação aos sem colestase.

Nos estudos realizados com cirróticos adultos, a leptina estava aumentada e relacionada com perda de peso, anorexia, hipermetabolismo e gravidade da doença hepática (OCKENGA *et al.*, 2000; TESTA *et al.*, 2000; BOLUKBAS *et al.*, 2004). A leptina é profibrogênica quando seus níveis estão aumentados, ativando as células estreladas hepáticas e interagindo com o TGF- β (em inglês, *transforming growth factor- β*), pois a lesão do hepatócito desencadeia uma produção em cascata de mediadores inflamatórios pelas células de Kupffer, pelas células do infiltrado inflamatório e pelas células estreladas, que convergem para a produção de TGF- β e estimulam as células estreladas, as quais respondem produzindo colágeno. Este se acumula progressivamente, distorcendo a citoarquitettura e comprometendo a função. Wang *et al.* (2009) sugerem que a leptina é um mediador da fibrose hepática principalmente por intermédio das células de Kupffer, aumentando o TGF- β . Outros mediadores encontrados em adultos são insulina e glicose.

2.4 NEUROMODULADORES DA FOME E DO APETITE

No hipotálamo, o ARC é a região do sistema nervoso responsável por enviar os neuropeptídeos que atuam no controle da fome e do apetite, sendo alguns com ação anorexígena e outros, orexígena.

Os mecanismos de atuação dos neuromoduladores no anabolismo e catabolismo são antagônicos, interagem entre si e com sinais periféricos na regulação do apetite e do gasto energético. A grelina produzida no estômago estimula o sistema nervoso via nervo vago aumentando a expressão gênica dos neuropeptídeos orexígenos NPY (neuropeptídeo Y) e o AgRP (*argouti-related protein*) e suprimindo o POMC e o CRH os quais levam a uma ação orexígena. Já a leptina secretada no tecido adiposo que atua no hipotálamo pela corrente sanguínea estimulando de maneira inversa a família POMC e CART e inibindo o NPY e o AgRP que leva a um efeito anorexígeno (KLOK *et al.*, 2007). Ou seja, um modelo onde os peptídeos gastrintestinais, a leptina e a insulina exercem efeitos regulatórios sobre o hipotálamo; de um lado originando-se dos neuropeptídeos NPY/AgRP e, de outro lado, dos POMC e CART (WOODS *et al.*, 2000), ambos mediados pela atividade da quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (em inglês, *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (KOJIMA & KANGAWA, 2010) (figura 6).

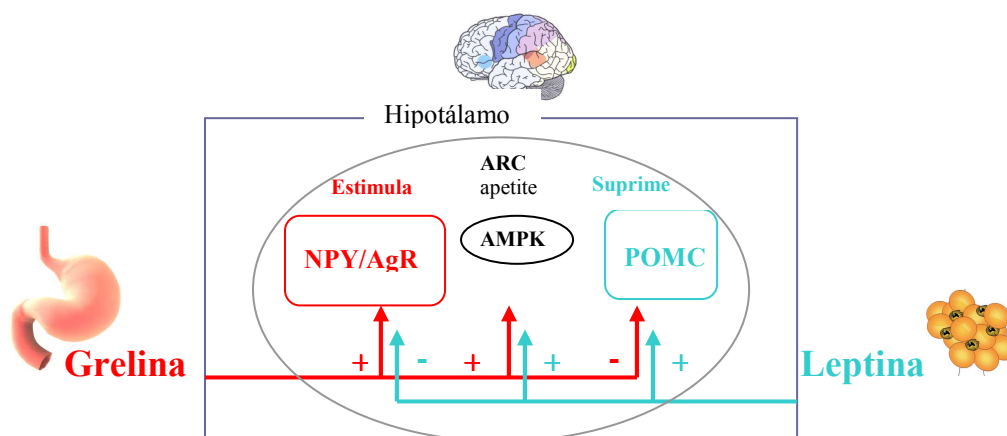


Figura 6 - Regulação hipotalâmica do apetite pela grelina e leptina
Fonte: Modificado de Kojima & Kangawa, 2010

Os efeitos específicos da ativação da AMPK são estimulação da oxidação dos ácidos graxos e cetogênese hepática; a inibição da síntese do colesterol, lipogênese, e a síntese de triglicerídios; a inibição da lipólise dos adipócitos e lipogênese; a estimulação do músculo esquelético oxidação dos ácidos graxos e da captação de glicose muscular, e a modulação da secreção de insulina das células-beta do pancreáticas (WINDER *et al.*, 1999). Contudo, alguns estudos demonstram que a AMPK possui, além das ações orexígenas também efeitos metabólicos de sinais dos tecidos periféricos (CHEN *et al.*, 2009a).

2.5 INSULINA E GLICOSE

A insulina, do latim “*insula*”, que significa ilha, 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; ROSENFELD, 2002). É sintetizada nas células beta das ilhotas de Langerhans, assim como seu precursor, a proinsulina (9,6 Kda, 86 aminoácidos). Em humanos, o tempo de meia-vida da insulina na circulação é de aproximadamente três a cinco minutos. Quase todos os tecidos metabolizam a insulina, sendo que 50% ocorre no fígado e 30 % no rim (CHEVENNE *et al.*, 1999). A insulina é o principal hormônio responsável pelo controle do metabolismo da glicose e 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 *et al.*, 2000).

A glicose é o primeiro sinal de estímulo de secreção de insulina, pois, dentre os nutrientes secretagogos, somente ela pode iniciar a secreção de insulina. A glicose é um monossacarídeo importante, pois é a fonte de energia mais utilizada, e deriva do grego *glykys*

que significa “doce” acrescentado do sufixo “ose”. A estrutura da glicose é representada por seis átomos de carbono e um grupo aldeído ($C_6H_{12}O_6$); no metabolismo, a glicose fornece quatro quilocalorias (kcal) de energia por grama. Assim, é recomendável a dosagem de ambas para uma interpretação correta da medida de insulina (CHEVENNE *et al.*, 1999; VOLP *et al.*, 2008).

2.5.1 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, promovendo uma série de reações em cadeia que interagem no controle hipotalâmico provocando uma série de ações biológicas. No músculo, promove a captação de glicose a partir do estoque de glicogênio. No fígado, inibe a produção e liberação de glicose, bem como promove o estoque de glicogênio. 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, estimulando o depósito de gorduras por ativação da lipase lipoproteica (FRIEDMAN, 1998; HOWARD, 1999).

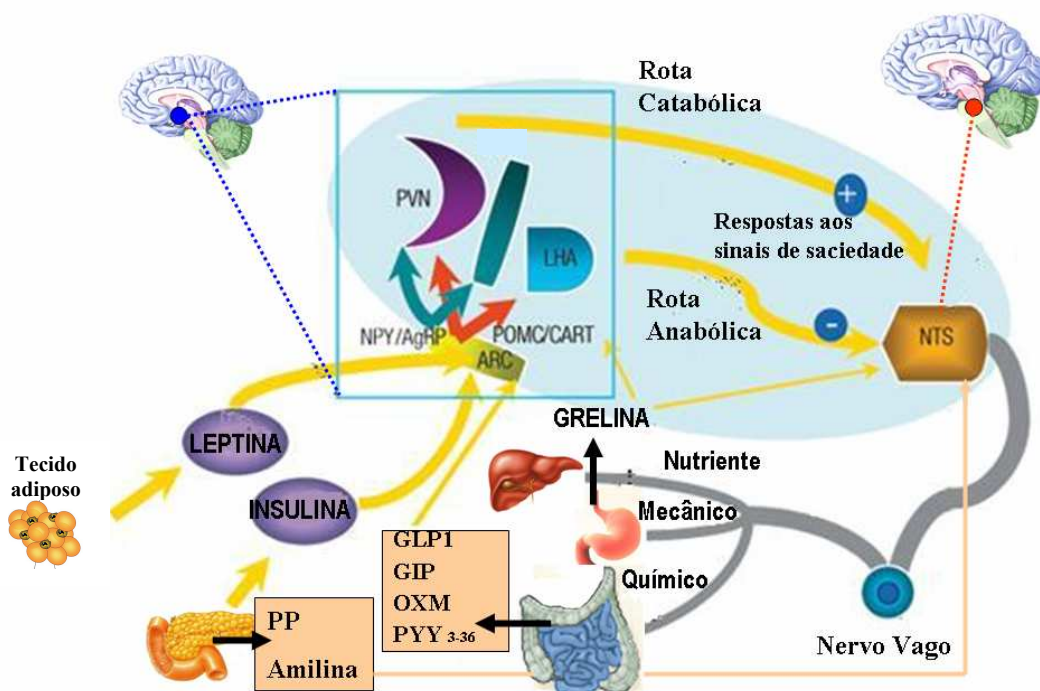
O receptor insulínico é formado por uma subunidade α extracelular e uma subunidade β intracelular. A ligação da insulina à subunidade alfa estimula a atividade da tirosina-quinase associada à subunidade β do receptor insulínico inserido na membrana das células, resultando na fosforilação do substrato do receptor de insulina-1. Uma vez fosforilado, esse substrato do receptor interage com uma série de proteínas intracelulares, desencadeando uma cascata complexa de reações de fosforilação e defosforilação (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). A secreção basal de insulina é constante, porém alguns estímulos provenientes do metabolismo

de nutrientes, atuação de neurotransmissores e outros hormônios podem aumentar ou diminuir esses níveis (CISTERNAS, 2002).

2.5.2 Modulação hormonal e homeostase

A insulina interage com hormônios como a leptina, que também atua no hipotálamo, 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 (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 tireoide no núcleo hipotalâmico paraventricular, juntamente com a diminuição da expressão de fatores anorexígenos como POMC, CRH, CART, α -MSH (*α -Melanocyte Stimulating Hormone*) e aumento da expressão de fatores orexígenos NPY e AgRP (CISTERNAS, 2002; SUVIOLAHTI *et al.*, 2003).

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 maior secreção de insulina e 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 peptídeos derivados do POMC e possuem efeitos catabólicos. Produzida por neurônios do ARC, exerce 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 (figura 7).



VMN: *Ventromedial Nucleus*; núcleo ventromedial; **GLP-1**: *Glucagon-Like Peptide-1*
 PVN: *Paraventricular Nucleus*; núcleo paraventricular; **GIP**: *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*
 LHA: *Lateral Hypothalamic Area*; área hipotalâmica lateral; **OXM**: Oxintomodulina
 NTS: *Nucleus Tractus Solitarius*; núcleo do trato solitário; **PYY3-36**: Peptídeo YY3-36
 ARC: *Arcuate Nucleus*; núcleo arqueado; **PP**: Polipeptídeo pancreático; Neuropeptídeo Y
AgRP: *Agouti-related protein*; **POMC**: *Pro-opiomelanocortin*; **CART**: *Cocaine and amphetamine regulated transcript*

Figura 7 - Ação da leptina e insulina
 Fonte: Modificado de Zanella & Ribeiro, 2009

2.5.3 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: $HOMA-IR = \text{insulina } (\mu \text{ mU/l}) \times \text{glicemia de jejum (mmol/l)} / 22,5$. 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 sua determinação para crianças e adolescentes de acordo com sexo e idade, razão pela qual o HOMA-IR não foi realizado neste estudo.

Moreira *et al.* (2008) sugerem que a insulinemia apresenta o melhor poder de predição, sensibilidade e especificidade quando comparada aos outros indicadores. Os índices antropométricos também possuem significativo poder de predição da RI.

2.5.4 Insulinemia e glicemia nos cirróticos

Nos cirróticos adultos são extremamente comuns a resistência periférica à insulina e hiperglicemia, bem como diabetes melito, porém, em crianças e adolescentes com cirrose esses achados são baseados na resistência ao GH e seus efeitos metabólicos (BUCUVALAS *et al.*, 1990). Em pesquisas realizadas em cirróticos adultos (HARDY & KLEINMAN, 2007; NIGHTINGALE & VICKY, 2009), nas quais não foram encontrados dados confirmatórios.

2.6 CIRROSE

O fígado desempenha um papel essencial no processamento de nutrientes, hormônios, drogas e toxinas, além de atuar na síntese de substâncias metabolicamente implicadas na manutenção da homeostase corporal (SCHIFF *et al.*, 2007). É o principal órgão de detoxificação, um sítio de conversão de compostos endógenos, exógenos e catabolismo de hormônios, participando na regulação dos níveis plasmáticos e respondendo a estímulos hormonais e neurais que regulam a concentração de glicose. Constitui apenas 2% do peso corporal no adulto e aproximadamente 5% na criança e utiliza cerca de 20% do gasto energético basal (SCHIFF *et al.*, 2007).

As doenças hepáticas graves não apenas agravam a função hepática como também exercem consideráveis efeitos extra-hepáticos no metabolismo da glicose, dos lipídios e das proteínas. Por esse motivo, complicações nutricionais são frequentes quando a integridade hepática encontra-se comprometida (SCHIFF *et al.*, 2007; HARDY & KLEINMAN, 2007).

Os problemas nutricionais em cirróticos apresentam diversas causas: anorexia, hipermetabolismo, além de problemas na síntese e absorção de nutrientes (MAIO, 2000), na qual se destaca a diminuição da síntese de IGF-1 (em inglês, *Insulin-like Growth Factor-1*) e sua proteína de ligação IGFBP-3 (em inglês, *Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3*), que resultam na resistência ao GH (BUCUVALAS *et al.*, 1997). A desnutrição é considerada um dos mais importantes fatores prognósticos na evolução da cirrose (TSIAOUSI *et al.*, 2008).

2.6.1 Definição

A cirrose é uma das principais consequências das doenças hepáticas crônicas e representa o estágio final de praticamente todas as doenças progressivas (HARDY & KLEINMAN, 2007). Caracteriza-se por uma alteração crônica e irreversível do parênquima hepático, modificando sua estrutura, o funcionamento dos hepatócitos e a circulação porta.

À medida que a cirrose avança, ocorre uma alteração progressiva da arquitetura hepática com compressão de estruturas vasculares e biliares, o que ocasiona uma oferta irregular de nutrientes, oxigênio e metabólitos a diversas partes do fígado e pode perpetuar o processo de cirrose, mesmo quando o fator desencadeante é controlado ou eliminado (HARDY & KLEINMAN, 2007). Até o momento, o transplante hepático é a única opção terapêutica efetiva; no entanto, algumas terapias medicamentosas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de reverter ou deter a progressão desse processo (SCHUPPAN & AFDHAL, 2008).

2.6.2 Epidemiologia e etiologia

A prevalência da hepatopatia crônica em crianças não é conhecida, estimando-se que ocorra em cerca de 1: 10.000 nascidos vivos (KIM *et al.*, 2002). De uma maneira geral, no grupo infanto-juvenil, as causas de hepatopatia crônica envolvem uma lista heterogênea de doenças que podem evoluir com diferentes prognósticos (quadro 2).

A atresia biliar (AB) responde pela maioria dos casos de cirrose na população pediátrica (BALISTRERI, 2000). Sua etiologia permanece desconhecida e provavelmente resulta de um processo heterogêneo em que um insulto inicial, seja infeccioso, isquêmico ou

tóxico, precipita uma severa destruição inflamatória dos ductos biliares em indivíduos geneticamente suscetíveis (KIELING *et al.*, 2008).

A incidência estimada é de 1: 9.600 nascidos vivos no Japão, de 1:14.000 nos EUA e de 1:15.000 no Reino Unido, com um discreto predomínio do sexo feminino (1,2:1) (CARVALHO, 2007; KIELING *et al.*, 2008). No Rio Grande do Sul, Kieling *et al.* (2008) estudaram 112 casos de crianças com AB, cuja prevalência entre as hepatopatias crônicas foi 33,9% de 1982 a 1989, 41,1% de 1990 a 1999 e 25,0% a partir de 2000.

• Anomalias congênitas	• Doenças genéticas/metabólicas
Atresia biliar	Deficiência de alfa-1 antitripsina
Síndromes colestáticas intra-hepáticas progressivas familiares*	Galactosemia
Deficiência de FIC 1 (ATP8B1)*	Frutosemia
Deficiência de BSEP (ABCB11)*	Tirosinemia
Deficiência de MDR3 (ABCB4)*	Fibrose cística
Defeitos na síntese de ácidos biliares	Hemocromatose
Síndrome de Alagille	Doenças do ciclo da uréia
Hipoplasia biliar intra-hepática	Glicogenose (tipo III e IV)
	Doença de Wilson
	Doença de Gaucher
	Doença de Niemann-Pick tipo C
	Doença de Caroli
	Síndrome de Budd-Chiari
• Hepatite	• Miscelânea
Hepatite autoimune	Criptogênica
Hepatite B	Colangite esclerosante
Hepatite C	

Quadro 2 - Causas da cirrose em crianças e adolescentes

Fonte: Adaptado de Leonis & Balistrieri, 2008; *Santos *et al.*, 2010

2.6.3 Desnutrição e anorexia-caquexia

A desnutrição faz parte da evolução da doença hepática crônica e pode influenciar o prognóstico e a morbi-mortalidade pré e pós-transplante hepático, tanto em crianças como em adultos. Além disso, as crianças desnutridas apresentam mais infecções, maiores

complicações cirúrgicas, maior tempo de permanência em unidade de terapia intensiva e dependência de ventilação mecânica (BLECKER *et al.*, 2000; GREER *et al.*, 2003).

A desnutrição representa um forte indicador no escore de gravidade pediátrico, o PELD (*Pediatric End-Stage Liver Disease*), que é baseado no risco de morbidade utilizado para alocação de órgão para transplante (LEONIS & BALISTRERI, 2008). A desnutrição é considerada um dos mais importantes fatores prognósticos na evolução da cirrose (TSIAOUSI *et al.*, 2008). Schneider *et al.* (2007) observaram, em nosso meio, uma prevalência de 16,7% de desnutrição entre crianças cirróticas, através da relação estatura/idade, e 32,4% das crianças apresentavam risco nutricional quando avaliadas pela dobra cutânea tricípital.

A palavra "caquexia" é de origem grega, em que "kakos" significa "mau" e "hexis" significa "condição, estado", portanto "um estado debilitado da saúde". A diferença mais importante entre desnutrição e caquexia é a preferência da primeira por mobilização de gordura, poupando o músculo esquelético, enquanto na segunda há igual mobilização de gordura e tecido muscular (DELANO & MOLDAWER, 2006). A caquexia é inversamente correlacionada com a sobrevida (NORMAN, 2008). Nos cirróticos, a anorexia-caquexia é resultado da interação de diversos fatores, entre eles, anorexia, perda de peso, saciedade precoce, má absorção de nutrientes, alterações gastrointestinais, distúrbios hormonais e imunodepressão (SOKOL & STALL, 1990; SHEPHERD, 2004).

A perda de apetite é comum em cirróticos, sendo que náusea e perda de peso podem surgir à medida que a função hepática se deteriora e, conseqüentemente, ocorre diminuição da síntese proteica. Dietas hipocalóricas não intencionais e/ou pouco palatáveis em decorrência do manejo dietético específico na cirrose também podem contribuir para a anorexia (CÓRDOBA *et al.*, 2004; TSIAOUSI *et al.*, 2008). Outras causas iatrogênicas incluem as múltiplas hospitalizações, nas quais a ingestão alimentar pode ser prejudicada pela necessidade de jejum para a realização de exames e procedimentos (PLAETH, 2002). Dieta

com restrição de proteínas é frequentemente recomendada para pacientes com doença hepática avançada na tentativa de impedir o desenvolvimento de encefalopatia hepática clínica. Em crianças, esta recomendação empírica é menos apropriada, dado o aumento da demanda de proteínas para o crescimento. A recomendação de ingestão proteica de até 4 g/kg de peso corporal por dia tem demonstrado não precipitar encefalopatia em crianças com cirrose (NIGHTINGALE & VICKY, 2009).

Algumas citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas-1, as interleucinas-6 e o fator de necrose tumoral- α , estão associadas com anorexia-caquexia e depressão e têm um papel no hipermetabolismo, no catabolismo proteico e na resistência à insulina (PLAETH, 2002; DELANO & MOLDAWER, 2006).

Um dos determinantes da perda de peso na caquexia é o aumento do gasto energético (DELANO & MOLDAWER, 2006). Baker *et al.* (2007) sugerem que o hipermetabolismo pode ser uma das causas para o déficit de crescimento, que é cerca de 40% maior nos desnutridos em comparação com os eutróficos.

Nos casos de colestase crônica e enteropatia hipertensiva portal, há diminuição da absorção de gorduras e de vitaminas lipossolúveis, resultando em deficiências específicas, como a de vitaminas A, D, E, K, cálcio, folato, riboflavina, nicotinamida, ácido pantotênico, vitamina B₁₂ e tiamina (TSIAOUSI *et al.*, 2008; NIGHTINGALE & VICKY, 2009). A diminuição dos níveis de zinco, magnésio, sódio e fósforo é frequente (KONDRUP, 2006; GUNDLING, 2007; TSIAOUSI *et al.*, 2008; SCHNEIDER *et al.*, 2009).

Em crianças e adolescentes, os acréscimos energéticos necessários para promover o crescimento, aliados à inapetência característica, tornam a desnutrição um problema ainda mais difícil de ser combatido. Por isso, devem ter seu crescimento constantemente monitorado

e o risco nutricional prontamente identificado (SHEPHERD, 2004), bem como a determinação de uma intervenção precoce da terapia nutricional.

2.6.4 Avaliação e diagnóstico nutricional

O crescimento é regulado por uma complexa interação entre fatores nutricionais, hormonais e genéticos. A avaliação nutricional é uma etapa fundamental no atendimento da criança e do adolescente com cirrose, salientando-se que, quanto mais jovem a criança, mais vulnerável aos agravos e distúrbios nutricionais. Ela é um processo que define o estado nutricional e estabelece as necessidades de macro e micronutrientes.

Na prática clínica da avaliação nutricional, alguns métodos têm sido tradicionalmente utilizados enquanto outros, mais modernos, têm incrementado o arsenal propedêutico. A antropometria, pela facilidade de execução, baixo custo, inocuidade e, principalmente, pelo seu emprego universal, recomendado pela OMS (Organização Mundial de Saúde), tem se revelado o método mais utilizado para o diagnóstico nutricional, sobretudo na infância e na adolescência (SIGULEM *et al.*, 2000; MELLO, 2002; WHO, 2006a). Considera-se desnutrição quando índices antropométricos são inferiores a -2,00 DP abaixo da média de referência, desnutrição moderada entre -2,00 e -3,00 e desnutrição grave -3,00 DP (WHO, 1995a; WHO, 1995a; WHO, 2006). E risco nutricional quando o índice de massa corporal para idade (IMC/I) encontra-se entre -1,00 a -2,00 DP (De ONIS, 2007), destacando este risco é um momento adequado para a intervenção precoce.

A calorimetria indireta é um procedimento tecnicamente difícil em crianças e adolescentes. Porém, a composição corporal pode ser avaliada pelas medidas da espessura das dobras cutâneas ou por métodos especializados. A bioimpedância elétrica é um método simples, portátil e não-invasivo, porém apresenta limitações pela falta de equações para

lactentes e pré-escolares, bem como pela necessidade de manutenção de hidratação constante, difícil de ser obtida e avaliada nos cirróticos. A absormetria de duplo raio X (DEXA) (em inglês, *dual energy X-ray absormetry*), considerada o padrão-áureo para avaliação da composição corporal, a ressonância magnética e a tomografia computadorizada têm o seu uso limitado pelo alto custo e encontram-se disponíveis apenas em centros especializados. Outras técnicas são utilizadas para a avaliação nutricional em adultos, a avaliação global subjetiva e a dinamometria, medida pela força do aperto de mão, mas que não foram validadas para crianças e adolescentes. Portanto, a necessidade de um método mais simples na avaliação da desnutrição em cirróticos é ainda um desafio, pois não existe método considerado ideal, em razão de suas limitações e influências de fatores independentes do estado nutricional (SCHNEIDER *et al.*, 2007).

O diagnóstico do estado nutricional é uma integração entre parâmetros clínicos, nutricionais, antropométricos, laboratoriais e dietéticos.

- **Parâmetros antropométricos**

No início da doença hepática, geralmente as crianças e adolescentes são eutróficos; no entanto, podem evoluir com baixa ingestão alimentar e conseqüentemente apresentar perda de massa magra, mesmo sem manifestações clínicas. À medida que a doença avança, a avaliação antropométrica do hepatopata torna-se difícil em decorrência da organomegalia e de ascite e/ou edema periférico, frequentes nos cirróticos. Estes fatores podem mascarar os parâmetros tradicionais utilizados, como, por exemplo, índices de peso/estatura (PE), peso/idade (PI) e IMC/I para idade. Portanto, é essencial a avaliação de medidas adjuvantes, tais como a circunferência de braço e a espessura de dobras cutâneas. O acompanhamento regular destes pacientes pode detectar sinais precoces de comprometimento nutricional, evitando o aumento de sua gravidade e as sequelas da desnutrição na vida adulta. Os parâmetros antropométricos

são diversos e adotados de acordo com sexo e idade (WHO, 2006b; WHO, 2007; WHO, 2009). Recomenda-se complementar a avaliação com a aferição da circunferência muscular do braço (CMB) e da dobra cutânea tricipital (DCT), pois não são afetadas pela presença de ascite e edema periférico (GUNSAR, 2006; PLAUTH *et al.*, 2006). Sugere-se que essas medidas sejam realizadas por um profissional experiente no sentido de evitar variabilidades intra e interobservadores. O diagnóstico de desnutrição é estabelecido quando a CB (circunferência do braço) e/ou a DCT estiverem com valores abaixo do percentil cinco (FRISANCHO, 2008).

- **Parâmetros laboratoriais**

Os parâmetros laboratoriais mais utilizados para avaliação nutricional são a dosagem de albumina, pré-albumina, transferrina, proteína transportadora de retinol, colesterol sérico e o balanço nitrogenado. Alguns destes exames podem ter seus resultados influenciados pela gravidade da hepatopatia, seja porque são sintetizados pelo fígado (albumina, pré-albumina, transferrina e proteína transportadora de retinol) ou porque níveis baixos de colesterol sérico são vistos com maior frequência na doença hepática, sem relação com o estado nutricional (MAIO, 2000; TAYLOR & DHAWAN, 2005). O balanço nitrogenado reflete a perda de proteína muscular e é um método bastante útil na avaliação nutricional, porém em cirróticos tem sua interpretação prejudicada pela nefropatia secundária à hepatopatia. Assim, há dificuldade em discernir as alterações laboratoriais que ocorrem devido à desnutrição daquelas que resultam do comprometimento hepático.

- **Parâmetros dietéticos**

A história dietética fornece informações valiosas sobre a quantidade e a qualidade dos nutrientes ingeridos. A aplicação de recordatórios alimentares de 24 horas e inquéritos alimentares de frequência na anamnese alimentar, bem como a solicitação do preenchimento

de registros alimentares de dois a três dias viabilizam um exame mais detalhado da alimentação e tornam possível estimar as calorias, os macronutrientes, as vitaminas e os minerais da dieta. Além disso, observam-se o padrão sociocultural, a oferta do tipo de alimento, as preparações, o volume e o fracionamento das refeições, bem como a consistência e a adequação para a idade.

Os distúrbios nutricionais e as alterações do apetite nos cirróticos sofrem influência não só do tipo da doença hepática e da quantidade de nutrientes ingeridos, como também de vários hormônios e peptídios. Apesar das pesquisas ainda estarem em andamento, a grelina com sua função orexígena, a leptina e a insulina com suas funções anorexígenas, juntamente com outros hormônios e peptídios, estão envolvidos neste delicado equilíbrio que existe em seres humanos eutróficos, bem como nos cirróticos. Maiores elucidações, possivelmente em um futuro próximo, poderão contribuir para um tratamento adequado da anorexia-caquexia.

Relato da mãe de um menino com nove anos de idade, pós-transplante hepático

“Antes de ficar doente, comia normal... arroz, feijão, muitas frutas e legumes cozidos.

Depois... Quando a doença começou a ficar mais grave, não tinha apetite, ficava enjoado só de ver a comida, até mesmo do cheiro... e já não conseguia comer mais nada... Quando comia um pouquinho, reclamava que já estava com o estômago cheio... e dizia que, se tentasse comer um pouco mais, vomitava... E muitas vezes era o que acontecia!

No começo, quando colocou a sonda, vomitava também. Depois começou se a acostumar, começou a comer e por fim já não vomitava mais!

Depois do transplante, no primeiro dia já começou a dizer que estava sentindo sede, coisa que antes nem água ele conseguia tomar. No segundo dia começou a comer já a comida sólida, com bastante apetite. “Qualquer comida” sem dizer que se sentia nauseado ou que estava ruim, a comida que viesse comia toda!

Perguntei como ele estava se sentindo de fígado novo?

- Muito bem, mais disposto até para poder caminhar.

Disse também que conseguia sentir o sabor da comida e que era muito bom sentir que podia comer as coisas sem passar mal como antes.

- Mãe, meu fígado velho não gostava de comer, mas o novo é um comilão!”

3 JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Crianças e adolescentes com cirrose frequentemente apresentam perda de apetite e saciedade precoce, sintomas gastrintestinais que contribuem para a desnutrição e anorexia-caquexia, aumentando o risco de morbi-mortalidade.

Grelina é um hormônio com propriedades orexígenas, ações contrárias às da leptina, que é modulada por ações da insulina e glicose. Em cirróticos adultos, quando avaliados em jejum, sua concentração mostra-se diminuída, sugerindo que a hipogrelinemia possa estar associada com a redução da ingestão energética, perda de peso e desnutrição (TACKE *et al.*, 2003; MARCHESINI *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2006; KALAITZAKIS *et al.* 2007), mas desconhece-se na população em estudo.

Assim sendo, o presente estudo investigou a concentração em jejum de grelina, leptina, insulina e glicose e o potencial de relação das alterações com anorexia-caquexia em crianças e adolescentes com cirrose. Esta pesquisa é inédita e sua importância deve-se principalmente ao impacto da doença no estado nutricional, repercutindo conseqüentemente sobre o crescimento e desenvolvimento na infância e adolescência. Este trabalho visa contribuir para o conhecimento dos mecanismos de anorexia que frequentemente acomete crianças com cirrose e desnutrição.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concentração de grelina, leptina, insulina e glicose no sangue de crianças e adolescentes com cirrose.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as concentrações de grelina total, acilada e desacilada no plasma e de leptina, insulina e glicose no soro de crianças e adolescentes com cirrose e compará-las com as de um grupo sem doença hepática.

- Avaliar a eventual relação entre dados obtidos na análise da concentração de grelina acilada, desacilada e total e de leptina, insulina e glicose com:
 - dados antropométricos (cirróticos e controles)
 - gravidade da cirrose
 - ingestão alimentar (cirróticos)

5 PACIENTES E MÉTODOS

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Foi realizado um estudo transversal prospectivo, considerando-se como fator em estudo a cirrose. Os desfechos analisados foram os resultados das concentrações de grelina, leptina, insulina e glicose.

5.2 POPULAÇÃO

A população em estudo foi constituída de crianças de dois meses a 15 anos de idade, com diagnóstico clínico de cirrose, atendidos regularmente na Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os controles foram crianças e adolescentes sem doença hepática, eutróficos, previamente hígidos e selecionados entre pacientes com indicação para cirurgias ambulatoriais de pequeno porte.

Quarenta e duas crianças e adolescentes com cirrose foram elegíveis, e seus pais e/ou responsáveis concordaram em deixá-los participar do estudo. Desse total, permaneceram no estudo 39, sendo que os motivos de exclusão estão expostos no fluxograma abaixo (figura 8).

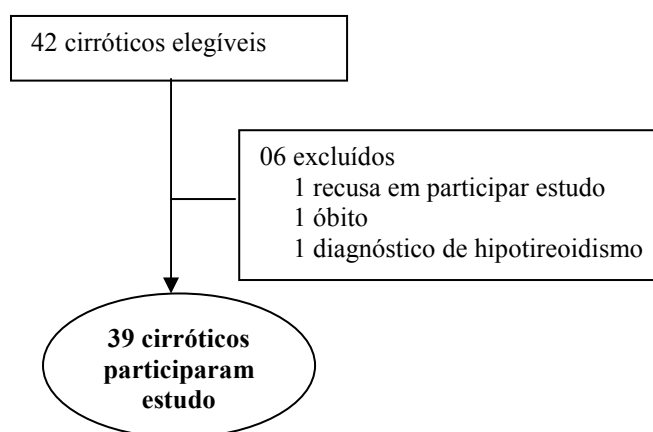


Figura 8 - Fluxograma de seleção dos pacientes com cirrose

5.3 AMOSTRA

5.3.1 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo amostral foi obtido com base nos estudos de Marchesini *et al.* (2004), Honsawek *et al.* (2008), Huang *et al.* (2002) e Breidert *et al.* (2004). Considerando-se as respectivas médias, desvios-padrões (DP) e/ou margens de erro para cada uma das dosagens em estudo e um nível de confiança de 95%, foram necessárias amostras de n1= 39, n2=16, n3=13 e n4=23 crianças. O programa utilizado foi o PEPI, versão 4.0.

- n1= Grelina: 414 pg/ml (DP±164) e margem de erro 52 fmol/litro
- n2= Leptina: 2,5 ng/dl e margem de erro 2,0 ng/dl
- n3= Insulina: 15µU/ml (DP±10)
- n4= Glicose de 0,3 mg/dl (DP±0,3 4)

5.3.2 Critérios de inclusão

Os critérios de elegibilidade para o estudo foram os seguintes:

- **Cirróticos:** crianças e adolescentes de dois meses a 15 anos de idade, com diagnóstico de cirrose obtido por confirmação histopatológica (presença de formação nodular e fibrose na biópsia hepática) ou, na ausência desta, por exames laboratoriais (alterações de coagulação e de provas funcionais hepáticas), endoscópicos (presença de varizes esofágicas) e/ou ultrassonográficos (fígado com ecogenicidade heterogênea, nódulos regenerativos e sinais de hipertensão portal).
- **Controles:** crianças e adolescentes, sem doença hepática, eutróficos, supostamente hígidos, com idade de dois meses a 15 anos, com solicitação de coleta de sangue nos laboratórios do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e jejum mínimo de três horas e máximo de 14 horas.

5.3.3 Critérios de exclusão

- **Cirróticos:** concomitância com outras doenças crônicas (fibrose cística, diabetes melito, pneumopatia crônica e hipotireoidismo, entre outras) diferentes da desnutrição, encefalopatia, cirrose pós-transplante hepático, uso de corticoterapia e prematuridade.
- **Controles:** doenças hepáticas e/ou doenças crônicas (fibrose cística, diabetes melito, pneumopatia crônica, entre outras), uso de medicação, exceto sulfato ferroso e polivitamínicos em doses profiláticas, prematuridade, sobrepeso e/ou obesidade, processo infeccioso uma semana antes da coleta, dieta para perda de peso, impossibilidade de realização da antropometria.

5.3.4 Coleta de dados

A coleta de dados ocorreu de dezembro de 2006 a maio de 2009.

Os pacientes cirróticos foram encaminhados do Serviço de Pediatria, Setor de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os controles foram selecionados a partir das solicitações e encaminhamentos para coleta de sangue dos serviços de Pediatria, Puericultura, Cirurgia Pediátrica e Otorrinolaringologia Pediátrica.

5.4 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)** - os dados foram verificados no prontuário *on line* ou no cartão da criança.
- **Grupo racial** - as crianças e adolescentes foram considerados caucasoides ou não caucasoides.
- **Horas em jejum** - foi solicitado um mínimo de três horas e um máximo de 14 horas de jejum, sendo considerada a última ingestão de alimento como última refeição.
- **História de alimentação insuficiente** - foi considerada quando, na anamnese alimentar, a ingestão em recordatório de 24 horas era inferior a 80% da Recomendação Diária de Ingestão (RDI) (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2001-2005) para a idade, em associação ao ganho pômdero-estatural inadequado para a

idade. E também as crianças que estavam recebendo dieta enteral e leite materno com complemento de fórmula láctea.

- **Gravidade da cirrose** - foi avaliada considerando-se dois modelos prognósticos para doentes hepáticos crônicos, a classificação de Child-Pugh (PUGH,1973) e os PELD (*Pediatric End-stage Liver Disease*) e MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) (UNOS, 2005).

A classificação de gravidade por Child-Pugh foi realizada de acordo com a soma de pontos obtidos após a avaliação de aspectos clínicos e laboratoriais (quadro 3). Considera-se doença de intensidade leve (Child-Pugh A) quando a soma de pontos é inferior a seis; de intensidade moderada (Child-Pugh B) quando a soma situa-se entre sete e nove, e grave (Child-Pugh C) quando for superior a nove.

Avaliação clínica e bioquímica	Pontuação 01	Pontuação 02	Pontuação 03
Encefalopatia (grau)	Ausente	Discreta	Moderada/Grave
Ascite	Ausente	Discreta	Moderada/Grave
Bilirrubina (mg/dl)	1 – 2	2 – 3	> 3
Albumina (g/dl)	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8
Prolongamento do tempo de protrombina (segundos)	1 – 4	4 – 6	> 6

Grau A= (leve) < 6; **Grau B=** (moderada) 7 – 9; **Grau C=** (grave) > 9

Quadro 3 – Intensidade da doença hepática de acordo com a classificação Child-Pugh (1973)

A partir de fevereiro de 2002, a UNOS (*United Network for Organ Sharing*) tem sido utilizado na alocação de órgãos para transplante hepático o escore PELD (quadros 4), que é um modelo prognóstico específico para crianças com doença hepática crônica até 12 anos de idade. O PELD foi realizado com base no MELD. Neste modelo prognóstico, através de análise multivariada, foram identificadas cinco variáveis consideradas preditivas de morte ou internação em unidade de tratamento intensivo em crianças com doença hepática crônica:

idade, albuminemia, bilirrubina total, INR (*International Normalized Ratio*) e quando o escore-z do peso ou da estatura para a idade ficar abaixo de -2,0 DP desse escore-z. Atribuindo-se um peso para cada uma das variáveis, conforme equação específica (quadro 4), obtém-se o valor do PELD. Os pacientes com mais de 12 anos foram categorizados conforme a classificação PELD, ≤10, 11 a 18, 19 a 24 e ≥25, sendo que, a partir do escore 15, considera-se mais grave o estado do paciente, tanto para o PELD como para o MELD (UNOS, 2005).

$$\begin{aligned} \text{PELD} = & 0,48 \times \text{Log} (\text{bilirrubina total mg/dl}) + 1,1857 \times \text{Log} (\text{INR}) - 0,687 \times \text{Log} (\text{albumina g/dl}) \\ & + 0,436 \text{ (paciente } < 12 \text{ meses. Caso o paciente houver sido incluído em lista de transplante} \\ & \text{antes de 12 meses, este valor continua no cálculo até que ele alcance 24 meses de idade).} \\ & + 0,667 \text{ (se o paciente estiver abaixo de } - 2,00 \text{ DP do escore-z do PI ou EI)} \end{aligned}$$

INR: International Normalized Ratio

Quadro 4 – Equação do PELD

Fonte: UNOS, 2005

O modelo MELD é calculado para pacientes a partir de 12 anos de idade e para adultos. Para cálculo do MELD, são utilizadas as seguintes variáveis: creatinina, bilirrubina total e INR. A equação para o cálculo do MELD está representada no quadro 5. Este modelo utiliza uma escala numérica cujos escores variam de seis a 40, a fim de categorizar a gravidade do paciente.

$$\begin{aligned} \text{MELD} = & 0,957 \times \text{Log} (\text{creatinina mg/dl}) + 0,378 \times \text{Log} (\text{bilirrubina total mg/dl}) \\ & + 1,120 \times \text{Log} (\text{INR}) + 0,643 \end{aligned}$$

Quadro 5 - Equação do MELD

Fonte: UNOS, 2005

- **Níveis séricos de bilirrubinas e albumina** - foram solicitados durante exames de rotina, e os níveis séricos foram determinados conforme o Protocolo Operacional Padrão do Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Empregou-se o método Jendrassik e Grof para análise da bilirrubinemia e o método colorimétrico do verde de bromo cresol para análise da albuminemia. Os valores de referência utilizados nesse hospital são:
 - Bilirrubina total (BT) - (0,3 - 1,2 mg/dl)
 - Bilirrubina direta (BD) - (< 0,2 mg/dl)
 - Albumina - (3,4 - 4,8 g/dl)
- **Peso (g)** - foi medido, com as crianças e adolescentes sem roupa, em balança eletrônica de marca Filizola®; nas crianças até 24 meses, com carga máxima de 16 kg e variação 10g; nas crianças acima de dois anos e nos adolescentes, o peso foi verificado em balança da marca Filizola® de uso hospitalar, com carga máxima de 120 kg.
- **Estatura (cm)** - crianças com até 24 meses 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 acima de dois anos foram medidas na posição vertical com régua antropométrica fixa na parede e cursor móvel graduado em centímetros.
- **Índice de massa corporal (kg/m²)** - o IMC/I foi calculado pelo peso dividido pela altura elevada ao quadrado, no software WHO, 2009.

- **Circunferência braquial (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 0,1mm.
- **Dobra cutânea tricipital (mm)** - a espessura da DCT foi medida em triplicata a 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 olecrânio (COSTA, 2001), com a utilização do adipômetro científico, marca Cescorf®.
- **Dobra cutânea subescapular (mm)** - a espessura da DCS foi medida em triplicata com 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®.
- **Inquérito alimentar** - foi solicitado o registro da ingestão alimentar de todos os alimentos ingeridos e suas quantidades. Esse registro deveria ser feito em dois dias da semana e em um dia de final de semana, na semana da coleta de material para os exames laboratoriais. Todos os pacientes apresentavam orientação dietética com 150% da recomendação para a idade. A comparação da ingestão alimentar foi realizada com os dados preconizados pelas RDI e RDA (Recomendação Diária Aceitável). Os cálculos da ingestão calórica foram feitos no programa Nutwin – Sistema de Apoio à Decisão em Nutrição da Escola Paulista de Medicina, versão 2.5, que utiliza como referência a recomendação diária de ingestão de nutrientes e necessidades energéticas de acordo com a idade.

- **Ingestão alimentar insuficiente:** considerada quando a ingestão alimentar do registro de três dias no período da coleta foi inferior a 120% da recomendação para a idade, pois a ingestão adequada para cirróticos deveria contemplar entre 120% a 150%.
- **Dosagem de grelina (pg/ml)** – para a coleta e armazenamento do sangue para determinar a concentração da grelina os tubos foram previamente preparados e esterilizados. Devido à instabilidade desse hormônio, utilizaram-se 50µl de aprotinina e 15 µl de EDTA-2Na por mililitro de sangue como inibidores de proteases.
- **Dosagem de leptina (ng/ml), insulina (µUI/ml), glicose (mg/dl)** – para a coleta e armazenamento do sangue para determinar a concentração da leptina, insulina e glicose os tubos foram previamente esterilizados.

5.5 LOGÍSTICA

Semanalmente era realizada uma busca eletrônica nas agendas do ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para identificar as crianças e os adolescentes com cirrose que tinham consultas agendadas e preenchiam os critérios de inclusão. Os dados da história clínica, diagnóstico, informações perinatais, entre outros, eram verificados por pesquisa *on line* e confirmados com um gastropediatra da equipe.

Na data agendada para a consulta gastropediátrica de rotina era marcada também uma avaliação nutricional. Nesta consulta da nutrição era realizada uma entrevista com os pais e/ou responsáveis para explanação do trabalho e verificação do interesse na participação do estudo. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1), era preenchida uma ficha de coleta de dados com a história clínica (ANEXO 2) e solicitado o

preenchimento de um registro da ingestão alimentar (ANEXO 3) dos três dias imediatamente anteriores ao da coleta de rotina.

Posteriormente, verificava-se a data da solicitação do exame para ser efetuada a coleta de sangue para dosagem da concentração de grelina, leptina, insulina, glicose e para a avaliação antropométrica. Quatro dias antes da data agendada para coleta de sangue, todos recebiam um telefonema como lembrete ao início do preenchimento do registro alimentar, horário agendado dos exames e período de jejum.

Na data e horário previamente marcados para os exames de sangue, a pesquisadora responsável se dirigia até à zona de coleta, com 30 minutos de antecedência, para identificação do comparecimento do paciente cirrótico agendado, realização da avaliação antropométrica, recebimento do registro da ingestão alimentar e espera do material coletado. As análises foram feitas nos laboratórios do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.5.1 Avaliação antropométrica

- **Crianças de zero a cinco anos**

Na avaliação dos dados antropométricos das crianças de zero a cinco anos foi utilizado o *software WHO Anthro, 2009* determinando os percentis e escores-z para as relações peso para estatura (PE), peso para idade (PI), estatura para idade (EI), IMC/I, CB, DCT e DCS (WHO, 2009) para sexo e idade.

Para a classificação antropométrica do estado nutricional foi adotado o padrão da OMS, 2006, comparando os índices de EI e IMC/I, confirmados pela CB, DCT e DCS (WHO, 2007). A eutrofia foi definida a partir do ponto de corte do escore-z +1,00 e -1,00 (percentil

15 e 85), e a desnutrição, pelo escore-z para E/I e IMC/I abaixo de $-2,00$ ($<$ percentil 3). Possível risco para sobrepeso definiu-se a partir do IMC/I entre $+1,00$ e $+1,99$ (percentil 85 e 95), e sobrepeso entre $+2,00$ e $+2,99$ (percentil 95 e 99); para a obesidade, foi utilizado o IMC/I acima de $+3,00$ ($>$ percentil 99), segundo critérios recomendados pela OMS, 2006. Foram considerados para classificação de risco nutricional os valores de escore-z $\leq -1,00$ ($<$ percentil 10) para IMC/I (De ONIS, 2007). Na classificação do estado nutricional em que foi empregada mais de uma relação dos índices antropométricos (EI, PE e IMC/I), havendo discrepância entre as faixas utilizadas, considerou-se o menor valor.

- **Crianças acima de cinco**

Na análise dos dados das crianças acima de cinco anos foi utilizado o *software WHO Anthro Plus, 2009* e foram calculados os percentis e escores-z para as relações PI até 10 anos, EI e IMC/I. Os dados de CB, DCT e DCS das crianças com mais de cinco anos foram avaliados no programa do Frisancho, 2008.

Para a classificação antropométrica do estado nutricional foi adotado o padrão da OMS, 2007, comparando os índices de EI e IMC/I, confirmados pela CB, DCT e DCS. A eutrofia foi definida a partir do ponto de corte do escore-z $+1,00$ e $-1,00$ (percentil 15 e 85), e a desnutrição, pelo escore-z para EI e IMC/I abaixo de $-2,00$ ($<$ percentil 3). Para definição de sobrepeso, foi utilizado o índice IMC/I entre $+1,00$ e $+1,99$ (percentil 85 e 95) e, para obesidade, acima de $+2,00$ ($>$ percentil 95). A classificação do estado nutricional das crianças e dos adolescentes com cirrose que apresentaram edema e/ou ascite foi determinada pela avaliação da estatura e pela espessura da DCT. Havendo discrepância entre os dados antropométricos e a espessura das dobras cutâneas, considerou-se o menor valor para diagnóstico do estado nutricional, conforme demonstrado no diagrama a seguir (figura 9).

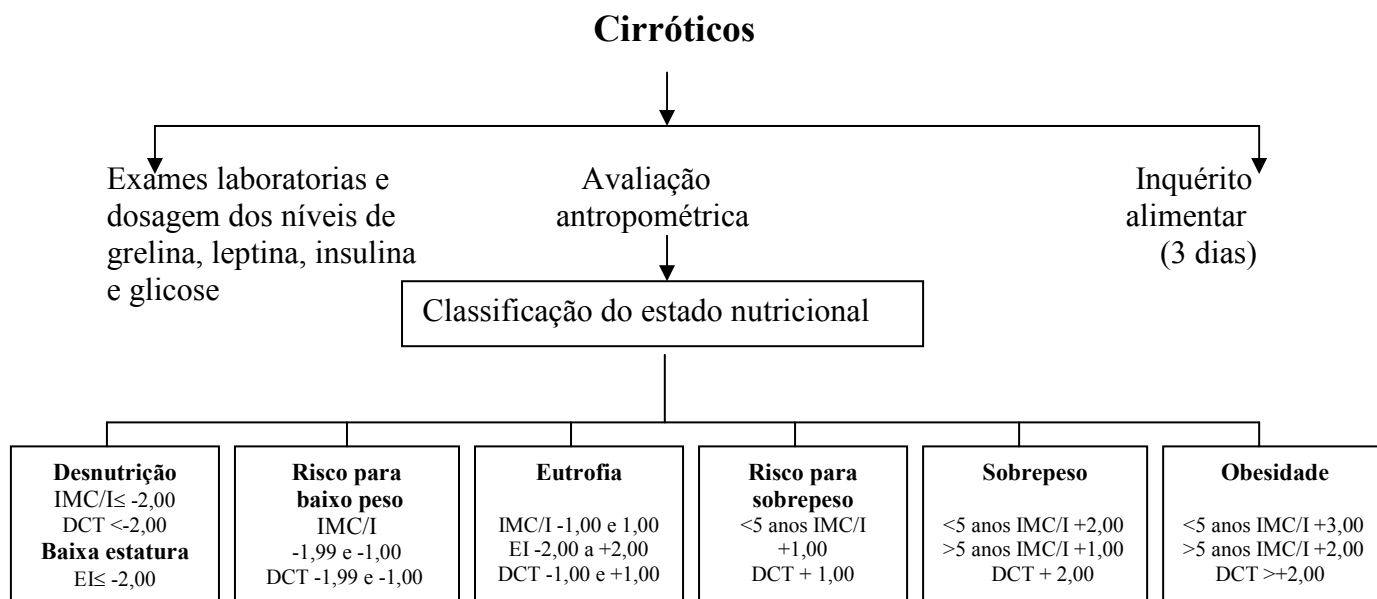


Figura 9 - Diagrama de avaliação e classificação do estado nutricional dos cirróticos

Os controles foram selecionados e pareados a partir de uma pesquisa para avaliar a concentração de grelina, leptina e insulina de crianças de dois meses a 15 anos de idade, eutróficas e previamente hígdas. Na data agendada para realização dos exames laboratoriais era realizada uma entrevista com os pais e/ou responsáveis para explanação do trabalho e verificação do interesse na participação do estudo. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 4), também era preenchida uma ficha com os dados da avaliação, da história clínica e dos exames laboratoriais (ANEXO 5). Todos os participantes foram pesquisados individualmente no prontuário *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).

O grupo controle de zero a cinco anos de idade obteve a sua classificação também pelo padrão da OMS, 2006, comparandos os índices de PE, EI e IMC/I, cofirmados pela CB, DCT e DCS. A eutrofia foi definida a partir do ponto de corte do score-z +2,00 e -2,00. E as crianças e adolescentes desse grupo acima de cinco anos pelo padrão da OMS, 2007,

comparando os índices de EI e IMC/I e PI (crianças até 10 anos), somados aos resultados das medidas de CB, DCT e DCS. A eutrofia foi definida a partir do ponto de corte do escore-z +1,00 e -2,00 (WHO, 2007).

Após a avaliação antropométrica, os casos e os controles eram encaminhados à sala de coleta de sangue para realização dos exames solicitados e os da pesquisa. Era coletado sangue venoso no período da manhã. Após a coleta dos exames de rotina, o sangue restante era colocado nos tubos específicos para obtenção de plasma (grelina) (ANEXO 6) e de soro (leptina, insulina e glicose), conforme protocolos (ANEXO 7). As amostras eram transportadas para o Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG) em caixa térmica refrigerada. Ao chegar ao LEHG as amostras para obtenção de plasma (grelina) eram centrifugadas imediatamente (centrífuga refrigerada da marca SIGMA® Laboratory Centrifuges 3k30) a 3.000 rpm a uma temperatura de 4°C por 10 minutos. Após, 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, procedia-se à homogeneização do plasma no agitador de tubos (marca Phoenix® Ap 56) e armazenava-se o material em freezer a -80°C. As amostras para obtenção de soro (leptina, insulina e glicose) ficavam em temperatura ambiente por 45 minutos para reter o coágulo. Após, centrifugava-se a amostra (centrífuga refrigerada da marca SIGMA® Laboratory Centrifuges 3k30 a 3.000 rpm) a uma temperatura de 4°C por 15 minutos. O soro era pipetado para microtubo devidamente identificado e então armazenado em freezer a -80°C.

5.5.2 Análise dos hormônios e 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 (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), específico para cada hormônio.

O ensaio imunoenzimático ELISA foi proposto em 1971 por Engvall, Jonsson & Perlmann e por Van Weemen & Schuurs. 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 por Voller, Bartlett & Bidwell (1976) e possibilitou seu uso com menores volumes de reagentes, mais estáveis e mais econômicos.

Na técnica ELISA para detecção de anticorpo o antígeno é adsorvido a uma placa de poliestireno ou polipropileno e a amostra a ser investigado 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 um 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, houve formação de imunocomplexo, a antiglobulina é fixada a ele e aí permanece 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 remover-se o excesso. A solução problema onde deverá encontrar-se o antígeno é acrescentada e incubada. Realiza-se uma nova lavagem e adiciona-se o soro contendo anticorpo específico ligado à enzima e incuba-se. Lava-se. Ao juntar-se o substrato, a reação positiva se manifesta, 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), seguindo-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 8).

- **Grelina acilada (pg/ml)** – foi utilizado o *kit* comercial *Human Ghrelin (Active) ELISA Kit* (Linco Research™, St Charles-MI, USA), adotando-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 9).
- **Grelina desacilada (pg/ml)** – foi realizada a subtração entre a grelina total e a grelina acilada (ANEXO 10).
- **Leptina (ng/ml)** – foi utilizado o *kit* comercial *Human Leptin ELISA Kit* (Linco Research™, St Charles-MI, USA), seguindo-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 11).
- **Insulina (μUI/ml)** – foi utilizado o *kit* comercial *Active Insulin ELISA* (DSL-Diagnostic Systems Laboratories, Inc, Webster-TX, USA), conforme protocolo adotado pelo fabricante (ANEXO 12).
- **Glicose (mg/dl)** – foi utilizado o *kit* comercial *Glicose PAP Liquiform* (Labtest Diagnóstica®, Lagoa Santa-MG, Brasil), adotando-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO 13).

5.6 EQUIPE DE PESQUISA

A equipe foi composta por uma nutricionista pesquisadora, duas nutricionistas clínicas, um biólogo e dois biomédicos. Foi realizado um treinamento para a padronização das técnicas de laboratório para a uniformização dos métodos.

A pesquisadora foi responsável pelo contato com os participantes do estudo, pela avaliação antropométrica e pela explicação do procedimento a ser realizado e cálculos do inquérito alimentar. O processamento e armazenamento do sangue (plasma e soro) foram

feitas pela própria pesquisadora ou por um membro da equipe previamente treinado, no Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia (LHEG). A análise das amostras de plasma, para determinação da concentração dos hormônios e da glicose, foi supervisionada pelo biólogo Rafael Lucyck Maurer, do LHEG do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os demais exames e as análises bioquímicas e histopatológicas foram realizados conforme as rotinas desse hospital.

5.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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 número 06-457. A dosagem de insulina e glicose foi realizada com aprovação de emenda no projeto, pelo GPPG do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, conforme previsto no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes sobre pesquisa envolvendo seres humanos estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996). Durante a pesquisa, não houve interferência quanto às datas de consulta no ambulatório e solicitação de exames. Para participar do estudo, foi assinado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais e/ou responsáveis (ANEXOS 1 e 4).

5.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os programas utilizados para análise epidemiológica e estatística pertencem ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foi realizada dupla digitação para assegurar melhor confiabilidade dos dados armazenados.

O nível de significância adotado foi de 5% ($P \leq 0,05$) e as análises foram realizadas pelo programa SPSS-*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 17.0, Inc., Chicago-IL, USA).

- **Análise estatística**

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão (distribuição simétrica) ou mediana e amplitude interquartílica (distribuição assimétrica). Na análise de variáveis categóricas, as frequências absolutas e relativas foram utilizadas. Para verificar a associação entre as variáveis categóricas foi aplicado o teste Qui-Quadrado de Pearson e, como complemento, o Teste dos Resíduos Ajustados foi utilizado para verificar associações locais. Na associação entre as variáveis quantitativas foram aplicados o coeficiente de Correlação de Spearman (distribuição assimétrica: grelina, leptina e insulina) e o de Pearson (distribuição simétrica: glicose).

Os pacientes foram agrupados por idade, sexo, causas da cirrose, presença de colestase, ascite, classificação de Child-Pugh, escores PELD/MELD e estado nutricional. Para comparar os dois grupos em relação às variáveis quantitativas foram utilizados ou o teste t-Student para amostras independentes (distribuição simétrica) ou o teste de Mann-Whitney (distribuição assimétrica). Para comparar mais de dois grupos (por exemplo: faixa etária), foram utilizados ou a Análise de Variância (ANOVA) *One-Way* (distribuição simétrica) ou o

teste de Kruskal-Wallis (distribuição assimétrica). Para complementar essas análises foram aplicados, respectivamente, os testes de Tukey e Mann-Whitney.

Para controlar fatores de confusão e avaliar as variáveis independentemente associadas com os desfechos em estudo, a análise de Regressão Linear Multivariada foi aplicada na associação de altas concentrações de grelina com estado nutricional, presença de colestase, ascite, gravidade da cirrose, creatinina, hematócrito; e os níveis de leptina, com os parâmetros antropométricos (EI, CB, DCT e DCS), estado nutricional, ascite, albumina, INR, hemoglobina, hematocrito e sexo. O método de estimação do modelo escolhido foi o de *stepwise* devido à quantidade de variáveis e ao número de indivíduos amostrados. O critério para a entrada das variáveis no modelo foi o de que apresentassem um valor de $P < 0,20$ na análise bivariada. Como a maioria dos desfechos apresentou distribuição assimétrica, a transformação logarítmica foi escolhida para satisfazer os pressupostos da análise de regressão.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

Foram arroladas para o estudo 39 crianças e adolescentes com cirrose e 39 controles hígidos, pareados por sexo e idade, selecionados conforme os critérios de inclusão. Nos casos apresentados, a principal causa da cirrose foi atresia biliar em crianças com até dois anos de idade pertencentes ao sexo feminino, conforme tabela 1. O total de crianças de zero a 10 anos compreendeu a maioria da amostra (n=30;76,9%). Sessenta e quatro por cento dos pacientes com cirrose realizaram os procedimentos de coleta e registro da ingestão alimentar, conforme rotina ambulatorial, e os demais, durante a hospitalização no período que antecedeu a alta hospitalar.

Os dados apresentados a seguir referem-se aos resultados principais e com maior relevância neste estudo. As tabelas completas com todos os resultados obtidos na análise encontram-se em anexo (ANEXO 14).

6.1 COMPARAÇÃO ENTRE CIRRÓTICOS E CONTROLES

Na tabela 1, são descritas as características gerais dos pacientes com cirrose e dos controles que participaram do estudo. Dentre as causas de cirrose, 76,9% foram biliares (26

por atresia biliar e 1 por cisto de colédoco) e 23,1%, não biliares (3 por hepatite autoimune, 2 por deficiência de alfa-1 antitripsina e 7 criptogênicas). O grupo étnico foi composto por 97,5% de caucasóides em cirróticos e por 82,5% nos controles. Na entrevista clínica, realizada previamente à coleta e ao registro da ingestão alimentar, a maioria das crianças e adolescentes apresentava história de alimentação insuficiente. Na classificação de Child-Pugh, utilizado para determinar a gravidade da cirrose, 50% da amostra foi classificada como A, considerada leve, e o restante em B e C, moderada a grave. Foram avaliados pelo critério de gravidade no escore PELD 85% e, destes, 81,8% (n=27/33) apresentaram escores abaixo do ponto de corte 15. Quinze por cento foram avaliados pelo escore MELD, estando todos abaixo do mesmo ponto de corte.

Tabela 1 - Características gerais da amostra

Características	Cirróticos (n= 39)	Controles (n= 39)	P†
Idade (anos)	2,5 (0,7-9,6)	2,6 (1,3-9,5)	0,667
0-2	20 (51,3)	20 (51,3)	
2-5	5 (12,8)	5 (12,8)	
5-10	5 (12,8)	6 (15,4)	
10-15	9 (23,1)	8 (20,5)	
Sexo feminino	20 (51,3)	20 (51,3)	
Causas da cirrose			
Atresia biliar	26 (66,7)		
Cisto colédoco	01 (2,6)		
Hepatite autoimune	03 (7,7)		
Deficiência alfa-1 antitripsina	02 (5,1)		
Criptogênica	07 (17,9)		
História alimentação insuficiente	22 (56,4)		
Presença de ascite	05 (12,8)		
Colestase (BD≥2 mg%) - n=35	12 (34,3)		
Child-Pugh			
A	20 (51,3)		
B	16 (41,0)		
C	03 (7,7)		

Os dados foram expressos como mediana (P25 a P75) ou número absoluto (%) quando indicado.

† Teste qui-quadrado de Pearson

Em relação aos dados antropométricos, os cirróticos apresentaram índices significativamente menores somente para o escore-z da CB, DCT e DCS, quando comparados com os controles ($P<0,001$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativa entre peso, estatura e IMC/I, conforme sumarizado na tabela 2.

Tabela 2 - Dados antropométricos

Características	Cirróticos (n=39)	Controles (n=39)	P^{\dagger}
Peso (kg)	13,3 (8,0 a 25,5)	14,1 (9,9-34,0)	0,395
Estatura (cm)	84,5 (68,0 a 130,0)	94,0 (80,0-139,0)	0,323
IMC/I (kg/m ²) - n=25	16,8 (\pm 2,53)	16,9 (\pm 1,81)	0,818
Escore-z PI - n= 25	-0,53 (\pm 1,17)	0,20 (\pm 0,80)	0,013
Escore-z EI	-1,22 (\pm 1,20)	0,28 (\pm 1,05)	<0,001
Escore-z IMC/I - n= 25	0,00 (\pm 1,23)	0,14 (\pm 0,65)	0,538
Escore-z CB*	-1,04 (\pm 1,61)	0,27 (\pm 0,61)	<0,001
Escore-z DCT*	-0,99 (\pm 1,67)	0,33 (\pm 0,62)	<0,001
Escore-z DCS*	-1,22 (\pm 1,89)	0,14 (\pm 0,75)	<0,001

Os dados foram expressos como mediana (P25 a P75) ou média (\pm DP), quando indicado.

IMC/I: índice de massa corporal; CB: circunferência do braço; DCT: dobra cutânea tricúspita

DCS: dobra cutânea subescapular; *n=38, pois um paciente apresentou CB, PCT e DCS abaixo do limite inferior do *software* WHO, 2009 e não foi possível o cálculo desses dados

\dagger Teste-t *Student* para amostras independentes

A tabela 3 apresenta a avaliação antropométrica realizada nos pacientes com cirrose e nos respectivos controles a partir do escore-z quanto aos índices EI, CB, DCT, DCS e a classificação do estado nutricional obtida a partir do escore-z de EI e da DCT.

Na classificação do estado nutricional, os cirróticos apresentaram maior proporção de baixa estatura no EI ($P=<0,001$), risco para desnutrição no PI ($P=0,040$) e desnutrição na CB, na DCT, na DCS e no estado nutricional, quando comparados com os controles ($P=<0,001$; $P=0,001$; $P=0,003$), caracterizando cerca de 44% como desnutridos; sendo que 69% destes eram desnutridos grave (abaixo do escore-z -3,00). Das crianças avaliadas, cinco apresentaram ascite e não foram classificadas através do PI e IMC/I, conforme tabelas 2 e 3.

Tabela 3 - Classificação do estado nutricional

Características	Cirróticos (n=39)	Controles (n=39)	P†
Escore-z de EI			
< - 2,00	12 (30,8)**	0 (0,0)	<0,001
- 1,99 a -1,00	11 (28,2)**	3 (7,7)	
- 1,00 a + 1,00	16 (41,0)	26 (66,7)**	
>+1,00 a +1,99	0 (0,0)	8 (20,5)**	
> + 2,00	0 (0,0)	2 (5,1)	
Escore-z da CB – n= 38*			
< -2,00	12 (31,6)**	0 (0,0)	<0,001
-1,99 a -1,00	7 (18,4)**	1 (2,6)	
-1,00 a + 1,00	15 (39,5)	35 (89,7)**	
>+1,00 a +1,99	3 (7,9)	3 (7,7)	
> +2,00	1 (2,6)	0 (0,0)	
Escore-z da DCT - n= 38*			0,001
< -2,00	10 (26,3)**	0 (0,0)	0,003
-1,99 a -1,00	5 (13,2)	1 (2,5)	
-1,00 a + 1,00	21 (55,3)	34 (87,2)**	
>+1,00 a +1,99	2 (5,3)	3 (7,5)	
>+2,00	0 (0,0)	0 (0,0)	
Escore-z da DCS - n= 38*			0,003
< -2,00	11 (28,9)**	0 (0,0)	<0,001
-1,99 a -1,00	3 (7,9)	2 (5,3)	
-1,00 a + 1,00	23 (60,5)	34 (89,5)**	
>+1,00 a +1,99	1 (2,6)	2 (5,3)	
>+2,00	0 (0,0)	0 (0,0)	
Estado nutricional (EI e DCT)			
Desnutrição	17 (43,6)**	0 (0,0)	<0,001
Eutrofia	21 (53,8)	39 (100)**	
Sobrepeso	1 (2,6)	0 (0,0)	

Os dados foram expressos como número absoluto (%).

EI: estatura para idade; PI: peso para idade; PE: peso para estatura; IMC/I: índice de massa corporal

CB: circunferência do braço; DCT: dobra cutânea tricipital; dobra cutânea subescapular

EI e DCT <-2,00 foi considerado como desnutrição;

*n=38, um paciente apresentou CB, PCT e DCS abaixo do limite inferior do *software* WHO, 2009 e não foi possível o cálculo desses dados; ** associação estatisticamente significativa pelo teste de resíduos ajustados ($P<0,05$)

† Teste qui-quadrado de Pearson

As dosagens das concentrações de grelina, leptina, insulina e glicose da população estudada encontram-se apresentadas na tabela 4. A concentração da grelina acilada nas crianças e adolescentes com cirrose foi cerca de 16% da grelina total, e nos controles, de 20%. A concentração da grelina acilada foi significativamente menor nos cirróticos do que nos controles, respectivamente ($P= 0,001$), conforme descrito na tabela 4 e ilustrado na figura 11. Observa-se uma tendência de a grelina total ser

menor nos cirróticos, quando comparados com crianças eutróficas e sem doença hepática ($P=0,060$). A leptina, a insulina e a glicose, quando comparadas entre cirróticos e controles, não se apresentaram estatisticamente diferentes.

Tabela 4 – Concentração de grelina, leptina, insulina e glicose

Características	Cirróticos (n= 39)	Controles (n= 39)	P^\dagger
Grelina (pg/ml)			
Total	907 (755-1432)	1391 (814-1995)	0,060
Acilada	142 (93-278)	275 (208-481)	0,001
Desacilada*	815 (625-1045)	1001 (688-1624)	0,163
Leptina (ng/ml)	1,6 (1,1-3,5)	2,3 (1,3-4,2)	0,421
Insulina (μUI/ml)	17,4 (13,5-29,9)	18,2 (14,1-29,7)	0,908
Glicose (mg/dl)	85,9 (\pm 15,5)	86,0 (\pm 9,01)	0,851

Os dados foram expressos como mediana (P25 a P75).

(*) Calculada a partir da subtração da grelina total pela acilada (KOJIMA, comunicação pessoal).

\dagger Teste U-Mann-Whitney

Os hormônios, quando correlacionados entre si, não foram diferentes tanto na amostra total quanto no grupo dos cirróticos. O período de jejum mediano para a coleta de sangue para exames laboratoriais não foi diferente entre cirróticos (4,0 horas; 3 a 8,3) e controles (4,5 horas; 3 a 12,4) ($P=0,103$) e não foi correlacionado com nenhuma das variáveis em estudo.

Os valores do hematócrito [$34,1 \pm 5,2$ %; $36,8 \pm 2,75$ % ; $P= 0,008$] e da hemoglobina [$11,3 \pm 1,87$ g/dl; $12,1 \pm 0,87$ g/dl; $P= 0,005$] foram significativamente menores nos pacientes com cirrose comparados aos dos controles. Nos cirróticos, a média ou mediana do resultado dos demais exames laboratoriais são os seguintes: albumina $3,8\text{mg}\% \pm 0,55$, bilirrubina total 1,4 g/dl (0,6-4,8), bilirrubina direta (n=35) 1,0 mg/dl (0,2-5,9), creatinina 0,36 mg/dl $\pm 0,10$ e INR 1,14 $\pm 0,17$, sendo que não houve associação entre essas variáveis e os desfechos estudados. Dentre os cirróticos, em que foi dosada a bilirrubina direta, 34,3% apresentaram $\geq 2\text{mg/dl}$.

6.2 GRELINEMIA NOS CIRRÓTICOS

A grelina total, a acilada e a desacilada apresentaram correlação inversa com a idade na análise bivariada, respectivamente [($r^s = -0,450$; $P = 0,004$); ($r^s = -0,367$; $P = 0,022$); ($r^s = -0,417$; $P = 0,008$)] (figura 10). Houve uma tendência na grelina total [984 (858-1506) pg/ml *versus* 879 (715-1235) pg/ml; $P = 0,055$] e na grelina desacilada [867 (728-1.395) pg/ml *versus* 749 (548-981) pg/ml; $P = 0,052$] a serem mais elevadas nos cirróticos desnutridos comparados aos bem nutridos, e nos com presença de colestase [1323 (793-2.113) pg/ml *versus* 896 (725-1.304) pg/ml; $P = 0,099$] em relação aos demais [992 (672-1.912) pg/ml *versus* 775 (725-1.024) pg/ml; $P = 0,099$]. A grelina total [1530 (1.055-3.680) pg/ml *versus* 904 (748-1239) pg/ml; $P = 0,049$] e a desacilada [1.461 (943-3.253) pg/ml *versus* 791 (622-1.019) pg/ml; $P = 0,031$] foram significativamente mais elevadas nos cirróticos com ascite. A grelina não apresentou associação com sexo, causas da cirrose biliar e não biliar e história de alimentação insuficiente nas crianças e adolescentes com cirrose.

A grelina total, a acilada e a desacilada foram associadas com a gravidade da doença hepática nos cirróticos. A grelina acilada foi significativamente menor nos pacientes mais graves classificados como Child-Pugh B+C 133 ng/ml (69-177), quando comparadas com a dos demais 184 pg/ml (113-3,66) ($P = 0,043$), na análise bivariada (figura 11). A grelina total [1.489 (1.263-3.294) pg/ml *versus* 901 (722-1.215) pg/ml] e a desacilada [1.395 (917-2.793) pg/ml *versus* 782 (599-994) pg/ml] foram maiores nos cirróticos com doença mais grave (escore de gravidade PELD/MELD ≥ 15) quando comparada com a dos demais cirróticos, na análise bivariada (figura 12). No modelo multivariado, a grelina total e a acilada permaneceram associadas com a idade, após o ajuste ao contrário da desacilada. A grelina acilada permaneceu associada com a classificação de Child-Pugh, e a grelina desacilada, com o escore de gravidade PELD/MELD ≥ 15 , conforme tabela 5.

Tabela 5 - Regressão linear múltipla* para grelina pelo método *stepwise*

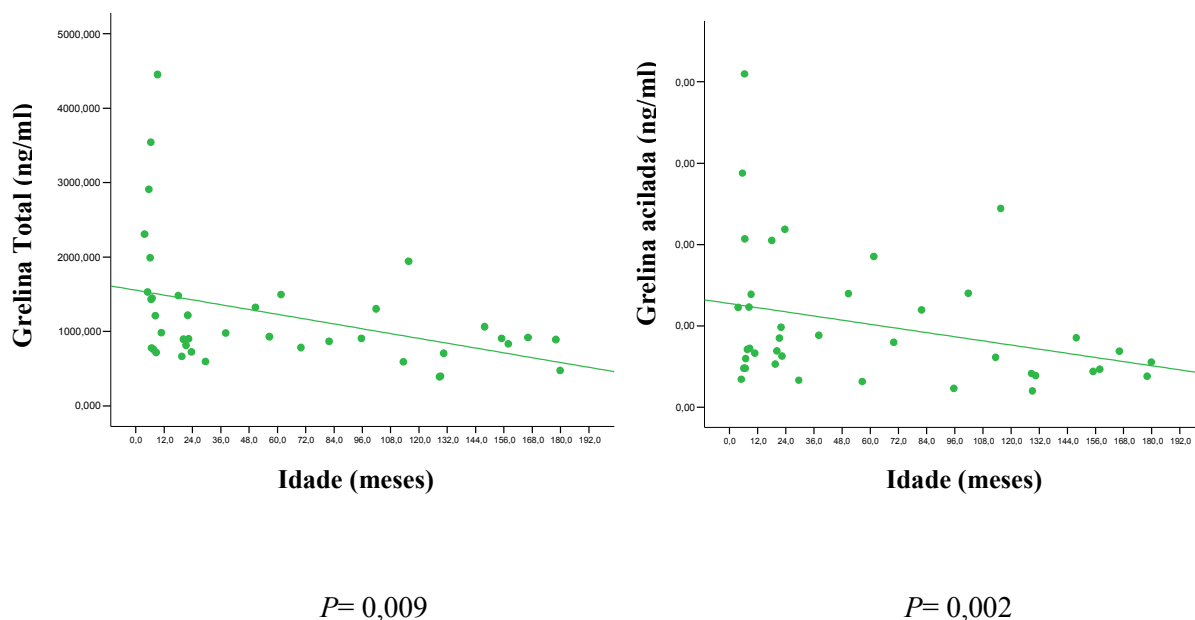
Variáveis	Modelo de Regressão Linear	
	β	<i>P</i>
Total*		
Idade (anos)	-0,438	0,009
Acilada**		
Idade (anos)	-0,461	0,002
Child-Pugh B/C	-0,576	<0,001
Desacilada***		
PELD/MELD ≥ 15	0,445	0,007

*O modelo foi estatisticamente significativo [F(1,33)=7,83; $P=0,009$; $R^2=19,2\%$] e ajustado para estado nutricional, creatinina, colestase, ascite e gravidade da cirrose pelos escores PELD/MELD.

**O modelo foi estatisticamente significativo [F(2,33)=11,3; $P < 0,001$; $R^2=40,6\%$] e ajustado para história de alimentação insuficiente, creatinina, hematócrito e classificação da RDI $\leq 80\%$.

***O modelo foi estatisticamente significativo [F(1,33)=8,16; $P=0,007$; $R^2=19,8\%$] e ajustado para idade, estado nutricional, creatinina, ascite e colestase.

****Os níveis sofreram transformação logarítmica.

**Figura 10** - Relação da grelina total e acilada com a idade nos cirróticos

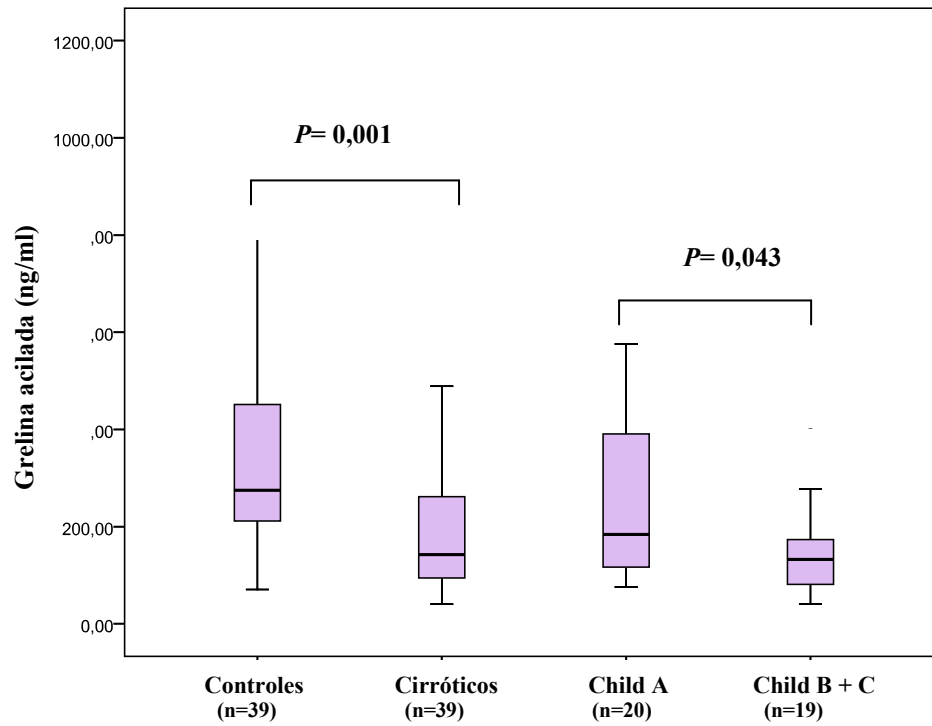


Figura 11 - Grelina acilada entre cirróticos, controles e classificação de Child-Pugh

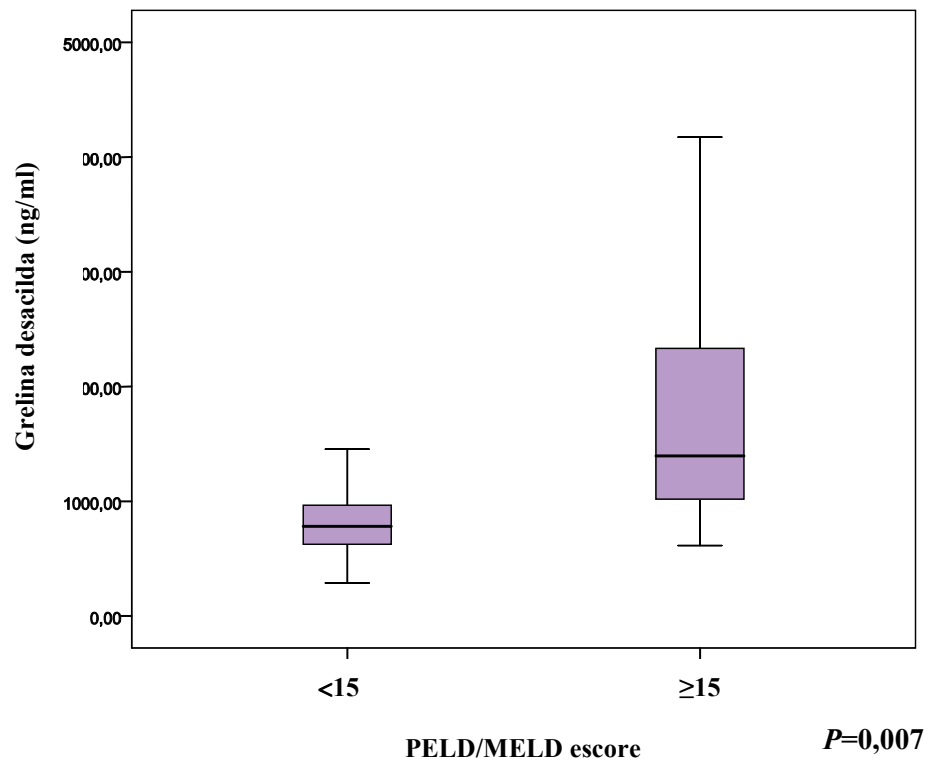
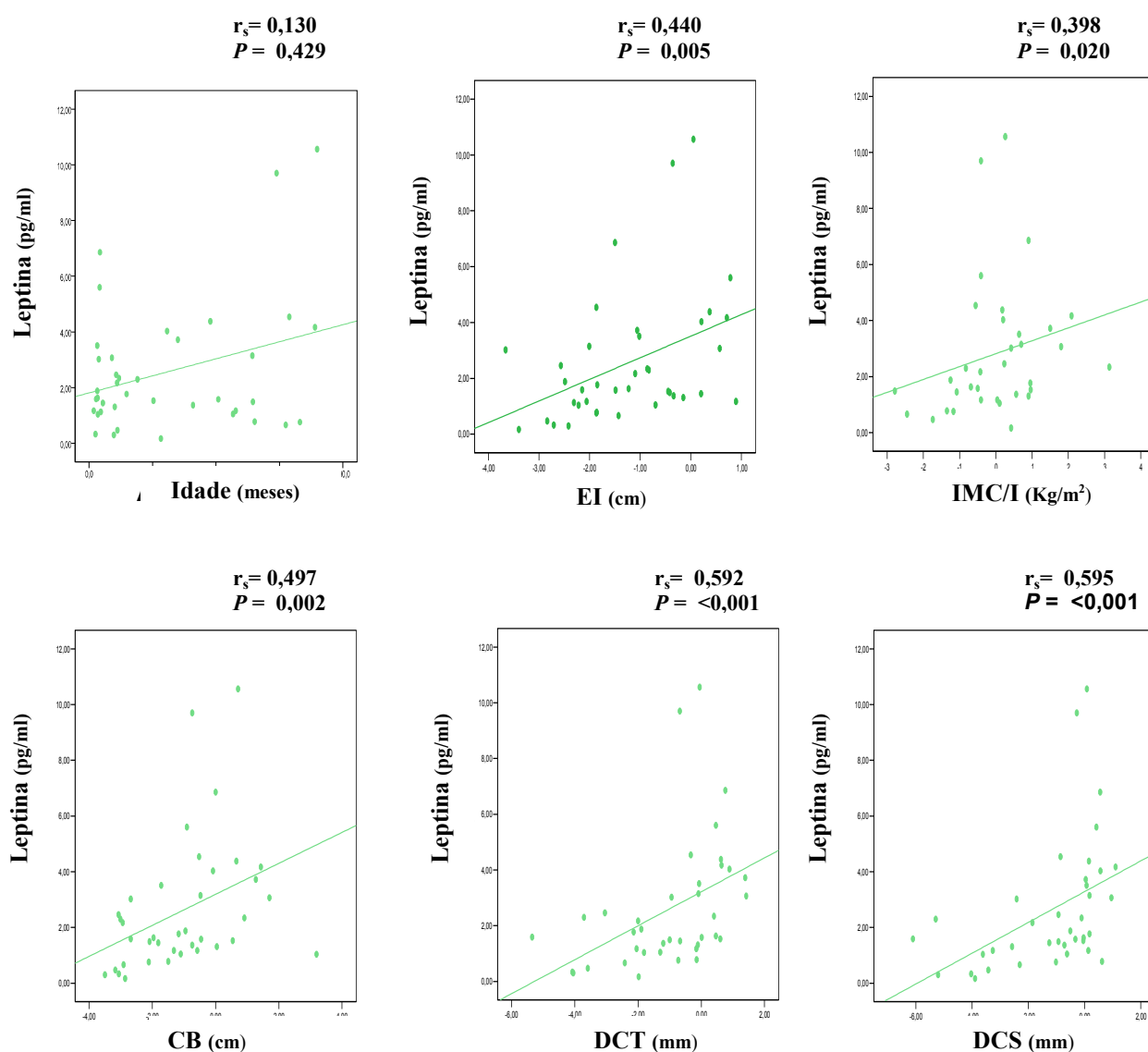


Figura 12 - Relação da grelina desacilada com o escore PELD/MELD ≥ 15

6.3 LEPTINEMIA EM CIRRÓTICOS

A leptina apresentou correlação positiva com o escore-z de EI ($r_s = 0,440$, $P = 0,005$), IMC/I ($r_s = 0,398$, $P = 0,020$), CB ($r_s = 0,497$, $P = 0,002$), DCT ($r_s = 0,592$, $P < 0,001$), DCS ($r_s = 0,595$, $P < 0,001$), hematócrito ($r_s = 0,384$, $P = 0,016$) e hemoglobina ($r_s = 0,325$, $P = 0,043$) na análise bivariada, figura 13.



EI: estatura/idade; IMC/I: índice de massa corporal para idade; CB: circunferência do braço
DCT: dobra cutânea tricriptal; DCS: dobra cutânea subescapular

Figura 13 - Relação ente leptina, idade e parâmetros antropométricos

Houve diferença entre os sexos em relação ao nível de leptina, sendo que os valores medianos (percentil 25-75) da concentração de leptina foi maior no sexo feminino 2,40 (1,54-4,21) ng/ml do que no masculino 1,31(0,78-2,30) pg/ml, $P=0,038$.

A leptina nos cirróticos com ascite foi significativamente menor quando comparada com a dos sem ascite [1,04 (0,32-1,36) ng/ml vs 2,03 (1,28-3,80) ng/ml; $P=0,012$]. Os cirróticos desnutridos apresentaram menor concentração sérica de leptina quando comparados com os bem nutridos [3,08 (1,35-4,42) ng/ml vs 1,45 (0,57-2,03) ng/ml; $P= 0,005$]. Os níveis medianos de leptina foram menores nos cirróticos com história de alimentação insuficiente [1,34 (0,78-1,76) ng/ml vs 3,51 (1,82-4,99) pg/ml; $P=<0,001$] do que nos demais. Houve uma tendência de associação positiva entre leptina e percentual de ingestão alimentar da RDI para idade ($P=0,059$).

Os níveis de leptina não foram diferentes nos cirróticos em relação à causa da cirrose biliar ou não biliar, presença de colestase e gravidade da doença hepática.

No modelo de análise multivariada após o ajuste permaneceram associados com os níveis mais baixos de leptina apenas o escore-z de EI (figura 14) e o sexo feminino (figura 15), conforme apresentado na tabela 6.

Tabela 6 – Regressão linear múltipla* para leptina** pelo método *stepwise*

Variáveis	Modelo de Regressão Linear	
	β	P
EI (escore-z)	0,438	0,007
Sexo feminino	0,388	0,016

* O modelo foi estatisticamente significativo [$F(4,26)=6,99$; $P= 0,001$; $R^2=44,4\%$] e ajustado para os escores-z dos dados antropométricos (IMC/I, EI, CB, PCT e DCS), hemoglobina, hematócrito, albumina, INR e história de alimentação insuficiente

** Os níveis sofreram transformação logarítmica

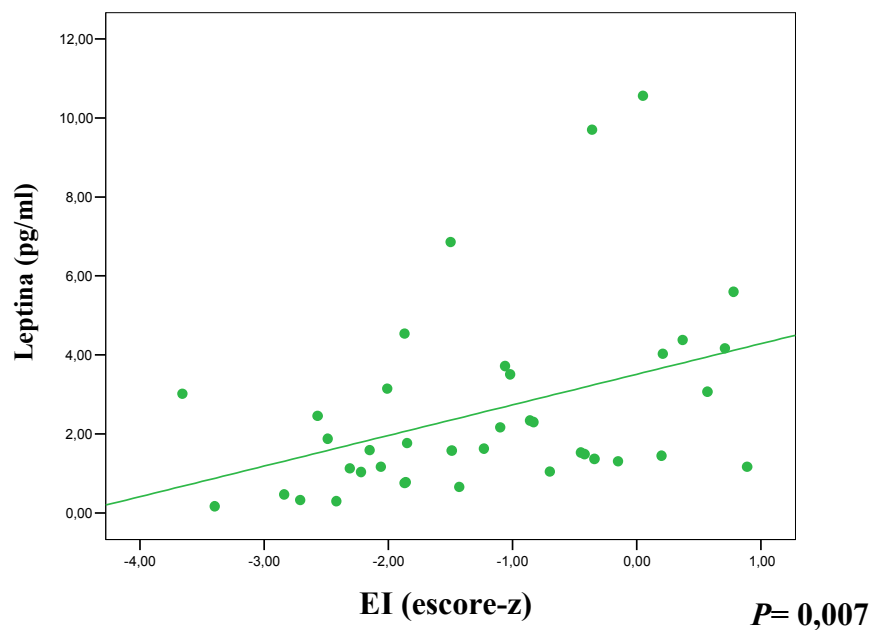


Figura 14 - Relação dos níveis de leptina com o escore-z da EI

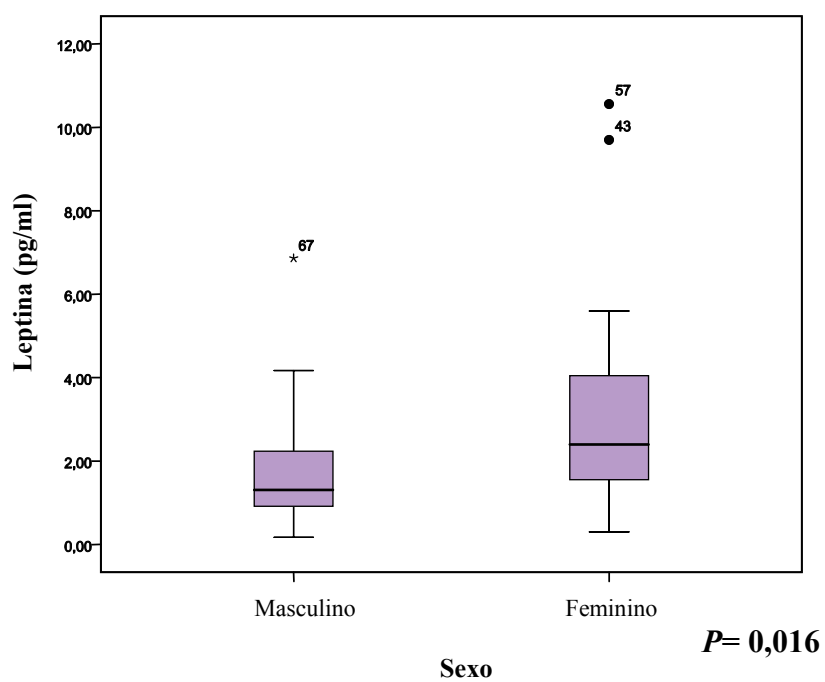


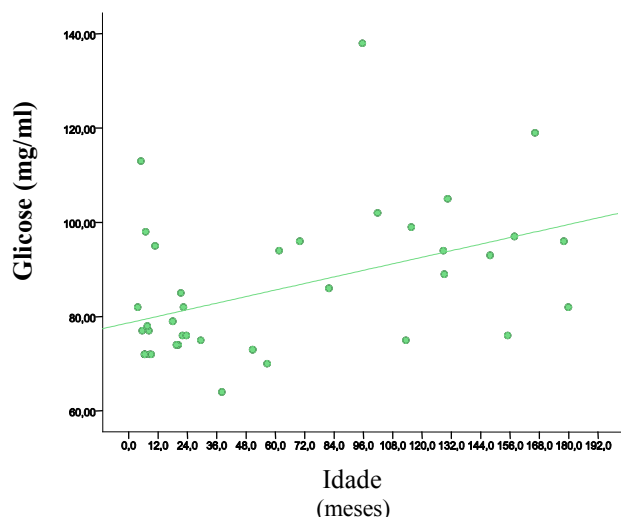
Figura 15 - Relação dos níveis de leptina com o sexo

6.4 INSULINEMIA E GLICEMIA NOS CIRRÓTICOS

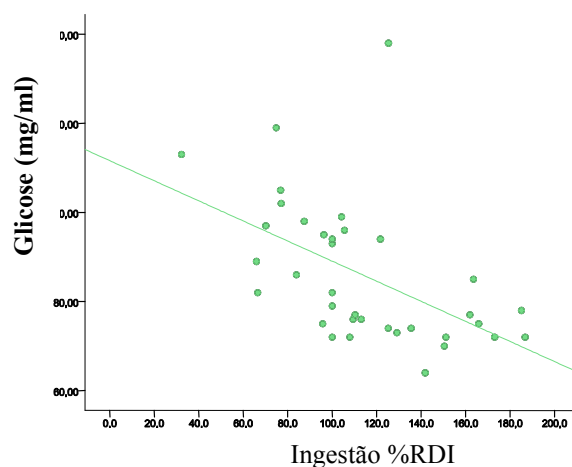
A insulina não apresentou associação com nenhuma das variáveis em estudo.

A glicemia foi mais baixa nos cirróticos desnutridos ($P= 0,039$) e se associou positivamente com a idade ($r= 0,048$; $P= 0,004$) e creatinina ($r= 0,331$; $P= 0,039$) e negativamente com o percentual de ingestão alimentar da RDI ($r= -0,517$; $P= 0,001$). A glicemia não se associou com sexo, causas da cirrose, presença de colestase, ascite, gravidade da doença hepática e história de alimentação insuficiente.

Após o ajuste pelo modelo multivariado, permaneceram associados com a glicemia elevada o aumento da idade (figura 16) e a redução da ingestão alimentar pelo percentual da RDI (figura 17) nas crianças e adolescentes com cirrose, conforme demonstrado na tabela 7. Ou seja, para cada ano de idade aumentou 0,42 mg% a glicemia; e cada aumento percentual da RDI causou uma queda de 0,5 mg% da glicemia.



$P= 0,018$



$P= 0,004$

Figura 16 - Glicemia e idade nos cirróticos

Figura 17 - Glicemia e ingestão percentual da RDI nos cirróticos

Tabela 7 - Regressão linear múltipla* para glicose pelo método *stepwise*

Variáveis	Modelo de Regressão Linear	
	β	<i>P</i>
Glicose		
RDI (%)*	-0,505	0,004
Idade (anos)**	0,423	0,018

* O modelo foi estatisticamente significativo [F(1,29)=9,91; $P=0,004$; $R^2=25,5\%$] e ajustado para estado nutricional, BD, BT, albumina, creatinina, idade, CB e DCS em escore-z

** O modelo foi estatisticamente significativo [F(1,29)=6,31; $P=0,018$; $R^2=15,0\%$] e ajustado para estado nutricional, BD, BT, albumina, creatinina, classificação da RDI, CB e DCS em escore-z, com $RDI \leq 80$

6.5 INGESTÃO ALIMENTAR NOS CIRRÓTICOS

A ingestão alimentar média dos cirróticos (33/39), excluindo aqueles com leite materno, dieta enteral e restrição dietética, comparada com a RDI para idade foi de 112% (± 36), sendo que a maioria 78,4% (26/33) apresentaram uma ingestão $\geq 80\%$ da recomendação para a idade. Na avaliação do registro da ingestão alimentar 61,6 % (n=20/33) apresentaram ingestão alimentar considerada insuficiente ($< 120\%$ da RDI) para crianças e os adolescentes com cirrose, apesar da orientação nutricional hipercalórica (tabela 8).

Na faixa etária menor de 2 anos 50%, dos 2-5 anos 80% e dos 5-10 anos 20% ingeriram abaixo do preconizado para cirróticos. Nos acima de 10 anos nenhum paciente ingeriu abaixo do recomendado ($P=0,003$). Apesar disso, os mais desnutridos foram os que ingeriram um maior aporte calórico.

Em relação ao percentual do valor energético total dos macronutrientes avaliados, nos respectivos grupos de acordo com a faixa etária, os resultados de carboidratos obtidos nos grupos foram 59,6%, 59,6%, 57,4% e 52,5% e de lipídios 27,5%, 26,0%, 30,7% e 33,9%.

Quanto à ingestão dos micronutrientes avaliados comparados com a RDI para a faixa etária o cálcio atingiu valores acima de 100% até 5 anos, entre 5 e 10 anos cerca de 70% e acima de 10 anos a

ingestão ficou em torno de 57%. A ingestão mediana de ferro em todas as idades atingiu os valores preconizados pela RDI para a faixa etária. O zinco apresentou ingestão insuficiente na faixa etária acima de 10 anos, abaixo dessa idade os valores da mediana atingiram a recomendação para a idade. O sódio atingiu valores medianos acima da recomendação para a ingestão alimentar em todas as idades. E potássio ingerido foi abaixo da RDI para a idade somente pelas crianças e adolescentes acima de cinco anos.

Tabela 8 - Ingestão alimentar dos cirróticos

Variáveis	0-2 anos (n= 21)	2-5 anos (n= 5)	5-10 anos (n= 5)	10-15 anos (n= 9)
Alimentação insuficiente	13 (62)	1 (20)	3 (60)	6 (67)
Kcal/dia	959 (\pm 394,3)	1723 (\pm 238,4)	1706 (\pm 362,8)	1703 (\pm 272)
Kcal/kg	115 (\pm 42,5)	107 (\pm 34,6)	68 (\pm 10,4)	56 (\pm 8,3)
g prot/dia	24 (15,1-40,1)	63 (59-75)	63 (42-66)	57 (50-67)
g prot/kg	2,9 (2,1-4,1)	4,2 (3,1-4,9)	2,4 (1,9-2,5)	1,9 (1,7-2,1)
Cálcio	595 (397-884)	1137 (857-1430)	589 (569-576)*	741 (354-1116)*
Ferro	7,1 (3,5-11,9)	10,1 (9,9-12,4)	9,7 (5,9-14,0)	8,4 (5,4-11,8)
Zinco	5,3 (3,1-6,5)	6,0 (4,8-7,3)	4,4 (3,7-6,5)	5,1 (3,5-6,5)*
Sódio	499 (252-1098)	1775 (1379-2135)	1525 (1352-2326)	1705 (931-2100)
Potássio	1039 (756-1340)	1810 (1687-2858)	1573(1027-2015)*	1247 (972-1984)*

Os dados foram expressos como média (\pm DP), mediana (P25 a P75) e número absoluto (%)

* Ingestão inadequada

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

7.1 COMPARAÇÃO ENTRE CIRRÓTICOS E CONTROLES

A comparação dos nossos resultados com os dados da literatura está dificultada pela exigüidade de estudos realizados com pacientes pediátricos. Em se tratando de hepatopatas crônicos, praticamente inexistem. Há poucas pesquisas publicadas que investiguem grelinemia, leptinemia, insulinemia e glicemia em pacientes pediátricos com hepatopatia crônica, em especial cirrose.

Até o momento, encontramos somente trabalhos com adultos cirróticos avaliando grelina, e apenas dois avaliando leptina em crianças e adolescentes, sendo um sobre pré e pós-transplante hepático (ROBERTS *et al.*, 1998) e outro sobre atresia biliar (HONSAWEK *et al.*, 2008). Em relação à insulinemia e à glicemia na população aqui analisada, os estudos são escassos e antigos, e os dados não foram totalmente explorados e conclusivos (BUCUVALAS *et al.*, 1990; BUCUVALAS *et al.*, 1997), conforme sumarizado no quadro 6.

Nível sérico	EM JEJUM	
	Adultos	Crianças e adolescentes
Grelina acilada	↓ ¹	↓ ⁵
Leptina	↑ ou ↓ ²	↓ ^{3, 5}
Insulina	↑ ⁴	N ⁵
Glicose	↑ ⁴	N ⁵

↓ = diminuído; ↑ = aumentado; N= normal

Quadro 6 - Estudos conduzidos com hepatopatas crônicos

Fonte: ¹Tacke *et al.*, 2003; Marchesini *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2006; Diz-Loiz *et al.*, 2009

²Testa *et al.*, 2000; Breidert *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2006

³Roberts *et al.*, 1998; Honsawek *et al.*, 2008

⁴Petrides *et al.*, 1989; Nielsen *et al.*, 2005; Bucuvalas *et al.*, 1990; Bucuvalas *et al.*, 1997

⁵Presente estudo, 2010

Estudos realizados com crianças e adolescentes saudáveis situaram a mediana da grelina total em 162 pg/ml (WHATMORE *et al.*, 2003) e mostraram diferença entre meninos (133,2-fmol/ml; 612,72 pg/ml) e meninas (189 fmo/ml; 872,16 pg/ml), contudo as amostras eram heterogêneas quanto ao método utilizado, ao tempo de jejum, à idade e ao estado nutricional (PARK *et al.*, 2005). A inexistência de dados referentes à amostra com crianças eutróficas em nosso meio foi resolvida com um estudo do nosso laboratório por Wilasco *et al.*, 2010 que dosou grelina total, acilada e desacilada, leptina, insulina e glicose em 111 crianças eutróficas de zero a 10 anos. Neste estudo a mediana de grelina total foi de 1.374 pg/ml (949-1.875), a de grelina acilada de 288 pg/ml (212-450), a de grelina desacilada de 1.088 pg/ml (711-1.093), a de leptina de 1,53 ng/ml (1,11 – 2,77), a de insulina de 15,5 (12,1-23,5) µU/ml e a de glicemia de 88,6 ±13,1 mg/ml.

A faixa etária compreendeu crianças e adolescentes cirróticos acompanhados na Unidade de Gastroenterologia Pediátrica no Serviço de Pediatria, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Restringiu-se à inclusão de crianças com cirrose e outras co-morbidades associadas (KOJIMA & KANGAWA, 2005), devido à possibilidade de interferência nas dosagens avaliadas, e a preocupação em limitar sua possibilidade de apresentar reflexos negativos na ingestão alimentar.

A regulação da secreção de grelina tem como pressuposto básico a alimentação (KOJIMA & KANGAWA, 2008), sendo que sua concentração duplica imediatamente antes das refeições habituais e retorna aos níveis basais uma hora após. A leptina não parece ter alterações entre as refeições, mas pode apresentar uma oscilação diurna. A insulina e a glicose geralmente atingem seus picos pós-prandiais entre uma a duas horas após as refeições. Contudo, o tempo de jejum é difícil de ser padronizado, especialmente em lactentes. Baseado nesses dados, foi determinado um tempo mínimo de três horas para contemplar as solicitações de exames laboratoriais de rotina de controles e cirróticos, e o tempo máximo estipulado foi de 14 horas. O método de escolha para a análise bioquímica foi o teste ELISA utilizado no LEHG, não apenas por sua sensibilidade e especificidade, mas também por sua possibilidade de automação aliada a menor custo.

Estudos conduzidos com crianças e adolescentes com cirrose apresentam a atresia biliar como principal causa da doença na maioria dos casos (SILVEIRA *et al.*, 1993; FERREIRA *et al.*, 1997; BALISTRERI, 2000, SCHNEIDER *et al.*, 2007), assim como nesta pesquisa. No trabalho de Schneider *et al.*, (2007), com uma população semelhante à estudada, o percentual de participantes com cirrose por atresia biliar foi de 33,3% e, no atual, de aproximadamente 67%.

Em relação à gravidade da cirrose, 50% das crianças e adolescentes foram classificados como Child-Pugh A, portanto a maioria com cirrose compensada. Considerando que foram avaliados tanto pacientes ambulatoriais como hospitalizados e que foi restrita a inclusão de qualquer tipo de encefalopatia, alguns critérios podem ter influenciado na limitação da amostra de pacientes com maior gravidade da doença hepática e, conseqüentemente, com maior grau de desnutrição. Nos modelos PELD e MELD, a maioria obteve um escore abaixo de 15, indicando também uma hepatopatia com gravidade não muito intensa.

A avaliação nutricional em crianças com hepatopatia crônica suscita muitos questionamentos, tais como:

- Qual o conceito de desnutrição?

Soeters *et al.* (2008) definem como desnutrição “estado nutricional agudo ou crônico com graus variados de sub ou sobrenutrição, na presença de atividade inflamatória que ocasiona mudanças na composição corpórea e atividades funcionais imunes, musculares e cognitivas diminuídas”. Essa definição adotada pela *European Society of Parenteral Enteral Nutrition* parece ser apropriada para crianças e adolescentes com cirrose, que apresentam um intenso catabolismo proteico e alterações na composição corporal em função da hepatopatia, anorexia, perda de massa muscular e redistribuição dos compartimentos hídricos.

- Os índices antropométricos são necessários e suficientes para diagnosticar o estado nutricional?

A desnutrição da criança e do adolescente com cirrose é subdiagnosticada na avaliação dos parâmetros antropométricos recomendados para crianças e adolescentes saudáveis, pois frequentemente superestimam a adequação nutricional em hepatopatas. Faltam estudos e indicadores precisos para crianças e adolescentes cirróticos, principalmente nos estágios avançados da doença. Em cirróticos descompensados, a desnutrição está associada com morbi-mortalidade (GREER *et al.*, 2003; LEONIS & BALISTRERI, 2008; NIGHTINGALE & VICKY, 2009). Nesses casos alguns critérios precisam ser avaliados e definidos.

- Quais os critérios a serem adotados ?

Avaliação {

- A= Antropométrica
- B= Bioquímica
- C= Clínica
- D= DEXA (crianças e adolescentes)/ Dinamometria (adultos)
- E= Equação para bioimpedância?

Na **antropometria**, o peso e o IMC/I não devem ser valorizados e somente a estatura é um parâmetro confiável que necessita ser complementado pela avaliação da circunferência do braço e dobras cutâneas. Feferbaum *et al.* (2009) demonstraram discrepâncias na classificação do estado nutricional utilizando diferentes índices antropométricos em pacientes pediátricos com cuidados intensivos. O IMC/I $\leq 2,00$ do escore-z não identificou 15,5% dos desnutridos, ao passo que a CB abaixo do percentil 5 não diagnosticou 53,5%. E surpreendentemente, quando avaliaram a correlação com mortalidade, a desnutrição não foi um fator de risco.

Este trabalho identificou 44% de desnutrição nas crianças e adolescentes cirróticos, achados semelhantes aos da literatura que se encontram entre 13% a 65% (SOKOL & STALL, 1990; CHIN *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 2000; GAZAL, 1995; ROGGERO *et al.*, 1997; MATTAR *et al.*, 2005); em adultos com cirrose, variam de 10% a 100%, de acordo com diferentes séries da literatura (MAIO *et al.*, 2000; GOTTSCHALL *et al.*, 2004; ALVARES-DA-SILVA *et al.*, 2005).

Os índices de **avaliação antropométrica** que avaliam a composição corporal, as medidas de CB e dobras cutâneas são indicadores simples que estimam a massa magra e gordura. As dobras cutâneas, apesar da sua acurácia na população pediátrica e a necessidade de treinamento do avaliador constituem a melhor opção na avaliação dos hepatopatas crônicos, pois não são influenciadas pela retenção hídrica, exceto no edema generalizado (SOKOL & STALL, 1990; ROGGERO *et al.*, 1997; MAIO *et al.*, 2004; SCHNEIDER *et al.*, 2007). Salienta-se que o modelo prognóstico avaliado pelo escore PELD considera os critérios de escore-z para PI e EI, e somente por isso ainda necessitam ser calculados.

Na avaliação **bioquímica**, as dosagens de proteínas plasmáticas (albumina, pré-albumina, transferrina, hemoglobina, hematócrito), os métodos imunológicos (contagem de linfócitos e testes de hipersensibilidade cutânea tardia) e o balanço nitrogenado são claramente influenciados pela síntese hepática, prejudicando sua utilização na avaliação

nutricional (MAIO *et al.*, 2004; RITTER L & GASOLA, 2006). Frequentemente, em razão da doença hepática, os exames laboratoriais encontram-se alterados, diminuindo a confiabilidade dos testes. Seu uso reflete a disfunção hepática, devido ao dano hepático, e não necessariamente o estado nutricional. A intensidade da resposta inflamatória mantém o hipercatabolismo e a proteólise, que é mediada por citocinas, resultando em balanço nitrogenado negativo. Desnutridos apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6, cuja dosagem poderia ser adotada.

A **avaliação clínica** multidisciplinar é de extrema relevância no acompanhamento do hepatopata crônico. O método de Avaliação Global Subjetiva baseado na história clínica e em aspectos nutricionais, é considerado efetivo e sensível para identificar a desnutrição em adultos (ALVARES-DA-SILVA *et al.*, 2005; RITTER L & GASOLA, 2006), para crianças e adolescentes parece ser um método válido para determinação de risco nutricional (SECKER & JEEJEEBHOY, 2007), porém ainda são necessários estudos na população estudada. A dinamometria também é considerada um método simples, de baixo custo e eficiente na detecção da desnutrição em adultos. Contudo, uma anamnese clínica e/ou nutricional pode se complementar através de relatos que se interrelacionam e da identificação de sintomas, ainda que subjetivos, capazes de contribuir de forma proativa para as decisões terapêuticas. Na anamnese alimentar empreendida no presente estudo, surpreendentemente, os valores percentuais da anamnese foram subestimados quando comparados com os cálculos dos registros alimentares, o que nos permite sugerir uma valorização nos dados subjetivos quando referidos espontaneamente pelos responsáveis no acompanhamento de uma criança com doença crônica.

Em relação à avaliação da composição corporal, o **DEXA** ainda não é uma realidade em nosso meio, tanto do ponto de vista de custo quanto em relação à habilitação profissional. As **equações** para uso da bioimpedância para crianças e adolescentes hígidos ainda são

controversas quanto a sua precisão, eficácia e efetividade, o que, de certa forma, poderia servir de base para a avaliação dos cirróticos.

A associação de parâmetros antropométricos, laboratoriais, clínicos e dietéticos e técnicas de mensuração da composição corporal devem ser avaliadas em conjunto e interpretadas individualmente. Também deve ser considerados o tipo de doença hepática e suas repercussões metabólicas e nutricionais para compor um diagnóstico nutricional adequado ao planejamento e monitorização da terapia nutricional.

7.2 GRELINEMIA NOS CIRRÓTICOS

A grelina é responsável pela liberação de GHRH que, por sua vez, libera o GH. O GH é um hormônio multifuncional secretado pelas células somatotróficas da hipófise anterior e atua na regulação do crescimento celular e corporal, no metabolismo dos macronutrientes, no balanço hidroeletrólítico e na estimulação da função imune (ARGETSINGER & CARTER-SU, 1996; HEWSON & DICKSON, 2000). A produção e a liberação do GH são controladas particularmente por dois neuropeptídeos hipotalâmicos, o hormônio liberador de GH e a somatostatina, que atua como inibidor de GH, o que demonstra sua extraordinária importância para crianças e adolescentes. As crianças com cirrose têm síntese reduzida de produtos derivados do fígado como o IGF-1, medeia às ações anabólicas do GH levando a uma resistência a esse hormônio com impacto negativo no crescimento, na fase final da doença hepática (BUCUVALAS *et al.*, 1997; PHAVICHITR *et al.*, 2008).

Crianças e adolescentes cirróticos são especialmente vulneráveis ao risco de desenvolver anorexia e, posteriormente, déficit ponderal e perda muscular. A grelina é um hormônio com efeitos orexígenos na modulação da ingestão e do comportamento alimentar, razão pela qual suas ações biológicas podem estar relacionadas com desnutrição nos cirróticos.

O presente estudo é inédito em quantificar mais de uma isoforma da grelina (total, acilada, desacilada) e o primeiro realizado com crianças e adolescentes cirróticos, pois novas evidências apontam que cada isoforma da grelina pode fazer parte de um sistema de múltiplos elementos integrados ao eixo cérebro-intestino modulando o apetite, a digestão, a motilidade intestinal, a adiposidade e o metabolismo energético (CHEN *et al.*, 2009a). Até o momento, os estudos realizados com cirróticos adultos encontraram níveis normais, aumentados ou diminuídos, dependendo da isoforma da grelina avaliada. A dosagem separada de grelina acilada e desacilada poderia resolver as discrepâncias encontradas (CHEN *et al.*, 2009a), pois ambas possuem ações diferentes e antagônicas. Tais diferenças entre as dosagens podem ser de fundamental importância para embasar estudos envolvendo o possível uso de análogos da grelina no tratamento da anorexia-caquexia.

- Que ações biológicas a grelina poder exercer na desnutrição nos cirróticos?

Considerando que a grelina pode apresentar efeitos fisiológicos ainda não totalmente explicados elaborou-se o quadro abaixo resumando dados de publicações na literatura (quadro 7).

Efeitos fisiológicos	Acilada	Desacilada
Endócrino		
GH	↑	↓
ACTH, cortisol, prolactina (fraco)	↑	?
Insulina (secreção)	↑↓ secreção	↓
Insulina (ação)	↑ periférica ↓ hepática	? periférica ↓ hepática
Metabolismo		
Apetite e peso corporal (adiposidade)	↑	↓
Glicose	↑ produção ↓ sensibilidade	↓ produção ? sensibilidade
Lipídio (adipócito e fígado)	↑	?
Água	↓	?
Gastrointestinal		
Secreção ácida	↑	?
Motilidade	↑	↓
Turnover gástrico e motilidade intestinal	↑	?

(↑) Estimula; (↓) Inibe; (?) não determinado

Quadro 7 - Efeitos fisiológicos da grelina

Fonte: Soares & Moreira, 2008; Chen *et al.*, 2009b; Kojima & Kangawa, 2010

Os resultados desse estudo demonstraram que os níveis plasmáticos de grelina acilada são significativamente menores em crianças e adolescentes com cirrose quando comparados aos de controles saudáveis. Em contraste, a grelina desacilada foi significativamente mais elevada, sugerindo um menor efeito orexígeno e um maior efeito anorexígeno, que pode identificar uma diminuição da ingestão alimentar e a desnutrição, achado comum na doença hepática avançada. A acilação através da GOAT confere à grelina acilada seu principal efeito fisiológico (orexígeno), bem documentado na ativação de neurônios hipotalâmicos que expressam NPY e AgRP, enquanto que a grelina desacilada pode ter um efeito antagônico (anorexígeno), conforme descrito em alguns experimentos com animais (CHEN *et al.*, 2009a). Achados semelhantes foram descritos em adultos com cirrose (TAKAHASHI *et al.*, 2006a).

No presente estudo, os níveis de grelina foram associados com a gravidade da cirrose independentemente da etiologia. A grelina acilada associou-se com a gravidade da cirrose na classificação de Child-Pugh, sugerindo que ela pode desempenhar um menor efeito fisiológico no apetite em cirróticos com doença mais grave. Além disso, os níveis baixos de grelina podem também estar relacionados aos seus efeitos hepatoprotetor e antifibrinogênico, descritos recentemente em experimentos *in vitro*, que parecem atenuar o dano hepatocelular e influenciar na progressão da fibrogênese em ratos e na fibrose hepática em humanos (MORENO *et al.*, 2010). Ao contrário, a grelina total e a desacilada mostraram-se significativamente aumentadas nos cirróticos com ascite, e a desacilada, nos cirróticos com escore de gravidade PELD/MELD ≥ 15 , sugerindo um maior efeito anorexígeno nos cirróticos com maior gravidade, podendo-se inferir também que este critério considera a desnutrição na sua equação. Em estudos realizados com adultos cirróticos, a grelina total mostrou-se elevada na cirrose classe Child C, associada com hemorragia gastrointestinal, ascite e encefalopatia hepática (TACKE *et al.*, 2003). Nesta pesquisa, a grelina exibiu uma correlação inversa com a idade, e não foi associada com o sexo e com a etiologia da cirrose. Também não foi

encontrada correlação entre parâmetros antropométricos e os níveis de grelina, como descrito em adultos (TAKAHASHI *et al.*, 2006), possivelmente pelas características relacionadas à causa da cirrose e à idade em que os pacientes são acometidos pela cirrose, pois a grelina parece ter papel a curto prazo na ingestão alimentar e somente a longo prazo na adiposidade (DE VRIESE *et al.*, 2010). Portanto, os achados encontrados neste estudo parecem reforçar que, paralelamente ao avanço da doença hepática, pode ocorrer um desequilíbrio nos níveis da grelina com conseqüente alteração no apetite. Evidenciando a importância da intervenção terapêutica nutricional precoce para atenuar os efeitos do risco nutricional e/ou desnutrição.

A tabela 9 apresenta os resultados de alguns dos trabalhos que avaliaram grelina em jejum nos hepatopatas crônicos. Três deles avaliaram a grelina total em cirróticos e controles saudáveis e encontraram valores normais, sendo um em jejum (MARCHESINI *et al.*, 2004) e os outros dois foram avaliados níveis pós-prandiais (KALAITZAKIS *et al.*, 2007, KALAITZAKIS *et al.*, 2009). Dois estudos observaram concentrações elevadas (TACKE *et al.*, 2003; DIZ-LOIS *et al.*, 2009), e outros dois, níveis diminuídos de grelina total (BREIDERT *et al.*, 2004) e desacilada (TAKAHASHI *et al.*, 2006) em pacientes com cirrose quando comparados aos controles.

Devido à heterogeneidade das amostras, às diferentes isoformas de grelina avaliada, às causas da cirrose e ao ciclo da vida em que foram avaliados os valores de grelina apresentam uma ampla variação no que se refere à unidade das medidas.

Quanto ao método de detecção, apenas o trabalho de Takahashi *et al.* (2006) utilizou o mesmo aqui adotado. Contudo, os valores encontrados apresentam concordância no que se refere ao aumento da grelina acilada e à redução da grelina total e desacilada, tanto em adultos como em crianças e adolescentes com cirrose, independentemente do método adotado.

Tabela 9 - Estudos com grelina plasmática em jejum nos hepatopatas crônicos

AUTORES, ANO E LOCAL	AMOSTRA	CIRRÓTICOS	CONTROLES	P
		Grelina	Grelina	
Tacke <i>et al.</i>, 2003 Hanôver, Alemanha	n=105 n=35/12 n=44/12 n=14/12	TOTAL: 230 pmol/l (94-719) Child A 226 pmol/l (94-719)* Child B 217 pmol/l (125-719)* Child C 306 pmol/l (168-716)	TOTAL 211 pmol/l (130-310)*	<i>P</i> <0,05*
Breidert <i>et al.</i>, 2004 Hanôver, Alemanha	n=22 Child A 36 ♀	TOTAL: 208 pmol/l	TOTAL: 402 pmol/l	<i>P</i> <0,01
Marchesini <i>et al.</i>, 2004 Perugia, Itália	n=43/50 n=11 n=13 n=19	TOTAL: 414 pg/ml (±164) Child A 352 pg/ml (±110) Child B 428 pg/ml (±440) Child C 440 pg/ml (±197)	TOTAL: 398 pg/ml (±142)	<i>P</i> = 0,624 <i>P</i> = 0,344
Takahashi <i>et al.</i>, 2006 Morioka, Japão	n=34/10	DESACILADA 110 fmol/ml (63-154) Child A 67 fmol/ml Child B 134 fmol/ml Child C 109 fmol/ml	DESACILADA 57fmol/ml (26-162)	NS
Diz-Loiz <i>et al.</i>, 2009 La Coruña, Espanha	n= 16/10	TOTAL: 527 pg/ml (377-971)	TOTAL: 643 pg/ml (523-2.163)	<i>P</i> = 0,045
Crianças e adolescentes	Amostra	Grelina cirróticos (ng/ml)	Grelina controles (ng/ml)	P
Presente estudo Brasil, 2010	n=39/39	TOTAL: 907 Child A*= 904 Child B= 913 Child C= 1.447 B+ C* = 919 ACILADA: 142 Child A*= 184 Child B= 135 Child C= 120 B+ C* = 133 DESACILADA**: 815 Child A*= 817 Child B= 791 Child C= 1328 B+ C* = 801 <i>P</i> *= 0,870	TOTAL: 1.391 ACILADA: 275 DESACILADA: 1.001	<i>P</i> *= 0,870 <i>P</i> *= 0,004 <i>P</i> *= 0,870

** Grelina desacilada inferido a partir dos resultados da grelina total e acilada.
NS: Não significativo

As perspectivas já estão avançando em modelos experimentais com restabelecimento da função hepática (IÇSERI *et al.*, 2008). Moreno *et al.* (2010) demonstraram *in vitro* que a grelina exerce efeitos hepatoprotetores e antifibrogênicos no fígado e sugerem estudos futuros para avaliar a segurança e eficácia da grelina e/ou agonistas da grelina em hepatopatas crônicos. A intervenção terapêutica com grelina em situações catabólicas pode induzir uma combinação de aumento da ingestão alimentar, do esvaziamento gástrico, do armazenamento de nutrientes e do GH, ligando o metabolismo energético com o crescimento e os processos de reparação. Esses dados sugerem que compostos baseados na grelina podem ter utilidade terapêutica no tratamento da anorexia-caquexia, bem como para sua ação antagônica. Além disso, a descoberta da enzima GOAT também abriu novas oportunidades de investigação e compreensão da fisiologia da grelina. O conhecimento atual sobre a síntese, a secreção, o mecanismo de ação e as funções biológicas da grelina fundamentam um foco adicional no potencial da grelina baseado em farmacoterapias (CASTAÑEDA *et al.*, 2010).

Em resumo, a grelina atua como um dos principais hormônios na modulação da ingestão e do comportamento alimentar; suas ações biológicas parecem estar altamente relacionadas com a desnutrição na população estudada. A grelina acilada, além dos efeitos na modulação da ingestão alimentar, parece ter uma atividade anti-inflamatória (IÇSERI *et al.*, 2008), hepatoprotetora e antifibrogênica (MORENO *et al.*, 2010) e mostrou-se diminuída, enquanto que a grelina desacilada estava aumentada e parecendo ter um efeito antagônico. Além disso, a grelina desacilada (DIXT *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009a) e a leptina têm efeitos anorexígenos, pró-inflamatórios e imunomoduladores (MYERS *et al.*, 2008). Com base nos achados, considera-se fundamental um seguimento deste estudo investigando os efeitos pós-prandiais da grelina e de motilina entre outros hormônios gastrointestinais, com vistas ao desenvolvimento de terapias farmacológicas baseadas nos produtos derivados do gene da grelina.

7.3 LEPTINEMIA NOS CIRRÓTICOS

A leptina, hormônio peptídico produzido por adipócitos que se destaca pelo seu desempenho no balanço da homeostase energética, na reprodução e na imunomodulação, está associado com a patogênese de várias doenças (STOFKOVA, 2009). Recentemente, foi mostrado que a leptina apresenta uma atividade prófibrogênica direta no fígado e sua deficiência está associada com a atenuação da resposta hepática aos diversos estímulos da fibrose (WANG *et al.*, 2009). Os autores ainda demonstraram que a leptina atua mediando a ativação das células estreladas e fibrose hepática através de efeitos indiretos nas células de *Kupffer*, e esses parcialmente mediados pelo TGF- β .

Em crianças e adolescentes, o tecido adiposo encontra-se em rápidas e constantes mudanças relacionadas aos ajustes do crescimento e influenciadas por vários fatores, como alimentação e nutrição (SULIGA *et al.*, 2009). Sua função lipostática (mensurador de depósitos de gordura) pode também oscilar da mesma forma, representando as alterações na composição corporal nessa população, em especial nos lactentes com cirrose por atresia biliar, altamente suscetíveis às alterações de competência nutricional e imunológica.

Nossos resultados demonstraram que os níveis de leptina não diferiram significativamente entre cirróticos e controles, porém foram correlacionados com os parâmetros antropométricos, com o hematócrito, com a hemoglobina e com a desnutrição. Houve também uma correlação positiva com o escore-z dos parâmetros antropométricos de EI, IMC/I, CB, DCT e DCS, sugerindo que a leptina pode desempenhar um papel fisiológico na manutenção da composição corporal em crianças e adolescentes cirróticos. Estes achados são semelhantes aos relacionados com a população pediátrica, no qual associam-se à desnutrição (ROBERTS *et al.*, 1998; HONSAWEK *et al.*, 2008), mas diferentes dos encontrados em cirróticos adultos que apresentam supernutrição (tabela 10). Roberts *et al.*

(1998) demonstraram uma leptina sérica baixa em 24 crianças com a doença hepática crônica pré-transplante, mas não verificaram a correlação esperada com as medidas de massa de gordura corporal. Honsawek *et al.* (2008) detectaram significativa redução nos níveis circulantes de leptina em crianças com atresia biliar e, em particular, nos pacientes com colestase, em comparação com controles sem icterícia ou saudáveis, e os níveis circulantes de leptina foram associados com idade, IMC/I e a densidade mineral óssea. Em adultos, a leptina sérica está aumentada em pacientes com cirrose alcoólica, independentemente do IMC (McCULLOUGH *et al.*, 1998) sendo menor em pacientes com esteatose leve a moderada. Em outro estudo, a leptina apresentou correlação positiva com parâmetros metabólicos relacionados à atividade simpática através das citocinas próinflamatórias, sugerindo funções distintas (ORENGA *et al.*, 2007).

Tabela 10 - Estudos com leptina sérica em jejum nos hepatopatas crônicos

Autores, ano e local	Amostra	LEPTINA	LEPTINA	P
Adultos	n	Cirróticos	Controles	
Testa <i>et al.</i>, 2000 Gênova, Itália	M=42/30 F=10/15♀	6,8 ng/ml ± 0,8 12,2 ng/ml ± 1,2	7,2 ng/ml ± 0,2 10,0 ngl/ml ± 0,3♀	P <0,05
Breidert <i>et al.</i>, 2004* Hanôver, Alemanha	n=22*/36 ♀	1,4 nmol/l ± 0,2	0,5 nmol/l ± 0,1	P <0,01
Takahashi <i>et al.</i>, 2006 Morioka, Japão	n=34	5,7 ng/ml (3,0-15,5)	-	-
Crianças e adolescentes	n	Cirróticos	Controles	P
Roberts <i>et al.</i>, 1998 Londres, Inglaterra	n=24/10	4,06 ng/ml (3,5-5,7)	6,62 ng/ml (4,3-8,0)	P=0,02
Honsawek <i>et al.</i>, 2008** Bangkok, Tailândia	n=50/15	2,7 ng/ml (±0,3)	7,1 ng/ml (±1,7)	P=0,0001
Presente estudo Brasil, 2010	n=39	1,6 ng/ml (1,1-3,5)	2,3 ng/ml (1,3-4,2)	P=0,421

M= masculino; F= feminino; * Child-Pugh; ** Atresia Biliar

No presente estudo, os cirróticos com ascite e desnutrição apresentaram menor concentração sérica de leptina, o que pode ser atribuído às possíveis alterações na regulação do hormônio na desnutrição associado ao processo inflamatório na cirrose, relacionado à gravidade da doença hepática. A leptina apresentou correlação positiva com hematócrito e hemoglobina nos cirróticos, possivelmente também relacionada à gravidade. A leptina não foi associada com idade, causa da cirrose biliar ou não-biliar, presença de colestase e gravidade da doença hepática. Honsawek *et al.* (2008) demonstraram diminuição significativa nos níveis circulantes de leptina em crianças com atresia biliar com colestase, em comparação com controles sem icterícia ou saudáveis. Em relação ao sexo, houve diferenças na concentração dos níveis de leptina, e os valores da mediana foram maiores no sexo feminino nas crianças e adolescentes com cirrose, assim como nos achados da literatura (HERMSDORFF *et al.*, 2006).

7.4 INSULINA E GLICOSE NOS CIRRÓTICOS

Crianças com cirrose estão em maior risco de apresentar hipoglicemia em jejum, pois a capacidade de armazenamento de glicogênio e gliconeogênese estão diminuídos em decorrência da disfunção e/ou perda de hepatócitos. Lactentes, devido à menor reserva nutricional, estão particularmente em risco.

O desenvolvimento de hiperglicemia pós-prandial e a utilização de glicose reduzida em pacientes cirróticos, apesar dos níveis elevados de insulina, podem ser postulados quando se relacionarem com o catabolismo reduzido de insulina pelo fígado ou *shunting* portossistêmico (NIELSEN *et al.*, 2005; NIGHTINGALE & VICKY, 2009).

No atual estudo, a mediana da insulina e a glicemia média dos cirróticos e controles não foram significativamente diferentes, respectivamente ($P= 0,90$; $P=0,851$). Tais achados

reforçam que a resistência à insulina e hiperglicemia nos pacientes com cirrose, tanto adultos (MARRA & BERTOLANI, 2009) como pediátricos, estão associadas à esteatose hepática, que está também associada ao aumento da oxidação lipídica sistêmica. Em tecidos periféricos (músculo), o aumento da oxidação de gordura pode impedir a eliminação total de glicose, diminuindo a oxidação da glicose através da concorrência de substratos (ciclo de *Randle*), obtendo como resultado final a resistência periférica à insulina (VANI *et al.* 2009).

Consideramos como uma limitação deste estudo o fato do jejum não ter sido controlado para avaliação adequada dos níveis de insulina e glicose, possibilitando que esses achados tenham sido superestimados, quando o período foi inferior a oito horas sem alimentação. Além disso, fatores sociais podem estar envolvidos na ingestão alimentar inadequada, ainda que sem a nossa percepção.

7.5 INGESTÃO ALIMENTAR NOS CIRRÓTICOS

Crianças e adolescentes cirróticos freqüentemente desenvolvem anorexia e, posteriormente, apresentam redução do peso corporal e perda muscular. Anorexia, paladar alterado, saciedade precoce, náuseas e vômitos são sintomas comuns em crianças com cirrose (SHEPHERD, 2004; NIGHTINGALE & VICKY, 2009) os quais somados aos mecanismos fisiológicos alterados na hepatopatia crônica, contribuem com uma grande parcela para a redução da ingestão alimentar e, conseqüentemente, para a desnutrição. A causa da desnutrição e anorexia em crianças e adolescentes com cirrose é multifatorial, embora a ingestão alimentar insuficiente seja provavelmente uma das causas mais importante e considerada corrigível, exceto nas situações de gravidade extrema da doença.

Este trabalho não encontrou nenhuma associação da redução da ingestão alimentar e do estado nutricional com os níveis de grelina avaliados, como já descritos em adultos

(MARCHESINI *et al.*, 2004). Adultos cirróticos apresentaram níveis pré-prandiais de grelina total elevados associados com baixa ingestão calórica, anorexia avaliada pela ingestão e por escalas de fome e saciedade, e IMC/I ajustado para cirróticos (MARCHESINI *et al.*, 2004), sugerindo que anorexia e hiperghrelinemia podem indicar um mecanismo compensatório para tentar estimular a ingestão de alimentos, mas que parece ser ineficaz no intervalo fisiológico em cirróticos. Enfatiza-se que a história de alimentação insuficiente esteve presente subjetivamente quando questionada na entrevista em 56% e objetivamente, no registro da ingestão alimentar, em 78% das crianças e adolescentes com cirrose. Além disso, nossos achados podem ter sido subestimados pela falta de um método eficaz na avaliação da anorexia como, por exemplo, uma escala apropriada para crianças e adolescentes, e que apesar de considerada subjetiva é de extrema relevância em se tratando de crianças e adolescentes com doença hepática avançada.

A análise dos registros realizados para o inquérito alimentar mostrou uma ingestão alimentar adequada em proteínas e insuficiente em calorias para crianças e adolescentes com cirrose, representada por uma mediana de 112% da RDI para idade, apesar de a recomendação da terapia nutricional ter sido estimada em 150%, caracterizando que o manejo nutricional requer ainda novas estratégias de abordagem. Requerimentos nutricionais estes que não suprem as demandas relacionadas ao aumento da oxidação de gordura em crianças com doença hepática em fase terminal (GREER *et al.*, 2003), ao aumento da lipólise, que não pode ser facilmente repostas na presença de colestase, ao balanço nitrogenado negativo (PIERRO *et al.*, 1989) se a capacidade de síntese hepática está prejudicada, e ao aumento do catabolismo. Outros estudos que avaliaram a ingestão alimentar *ad libitum* de pacientes pediátricos hepatopatas, também observaram inadequação na ingestão energético-proteica na maioria dos casos (CHIN *et al.*, 1992; CARDOSO *et al.*, 1997; RICHARDSON *et al.*, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 2007). Gazal (1995) constatou que 77% dos pacientes avaliados ingeriam

dietas com valor calórico abaixo do recomendado para crianças normais e 61,5 % apresentaram baixa ingestão proteica. Cardoso *et al.* (1997) relataram que 63% de seus pacientes tiveram uma ingestão energética inadequada. Schneider *et al.* (2007) mostraram que a ingestão de calorias foi insuficiente em 45,6 % dos pacientes. A adequação da ingestão proteica também foi observada nos dois estudos citados, em que apenas uma criança ingeriu abaixo da recomendação (CARDOSO *et al.*, 1997; SCHNEIDER *et al.*, 2007). Todos esses dados alertam para a necessidade de otimização de uma terapia nutricional específica, ousada e inovadora para crianças e adolescentes com cirrose, em especial aos candidatos a transplante hepático.

A saciedade precoce foi inicialmente atribuída ao efeito mecânico da distensão abdominal, da organomegalia ou da ascite. Considera-se que é um sintoma difícil de ser avaliado, mas certamente acompanha a fisiopatologia da cirrose na criança e no adolescente. Atualmente os estudos destinam-se a um enfoque mais detalhado e específico da grelina, da motilina, do GLP-1 e da insulina pós-prandial, devido a suas contribuições à ingestão alimentar e ao peso corporal. Agentes farmacológicos agonistas e antagonistas dos receptores da grelina e da motilina em breve podem fazer parte do arsenal terapêutico para melhorar a dismotilidade, agregando uma nova classe de pró-cinéticos (POITRAS & PETERS, 2008; DE SMET *et al.*, 2009).

A etiologia da desnutrição em crianças e adolescentes com cirrose é complexa e envolve múltiplos mecanismos e alterações metabólicas, incluindo a diminuição da ingestão alimentar, a má absorção e o aumento dos requerimentos nutricionais (NIGHTINGALE & VICKY, 2009). A alimentação e a nutrição das crianças e adolescentes com doença hepática crônica, em especial os cirróticos, são um desafio e fazem parte de um complexo de mecanismos que interferem nas nossas abordagens nutricionais. Então, novos questionamentos, dúvidas e possibilidades surgem...

- *É possível corrigir os efeitos da doença hepática na desnutrição através da terapia nutricional?*
- *E como resgatar a fome e o apetite na criança com hepatopatia crônica? E até quando a via oral supre essas necessidades?*
- *O tipo de dieta e seus nutrientes necessitam ser modificados e em que estágios específicos da doença hepática?*
- *A terapia de nutrição enteral é o melhor recurso? Ou é apenas um método paliativo para tentar garantir uma ingestão alimentar adequada, amenizando esses efeitos, sem levar em consideração a qualidade de vida das crianças e adolescentes cirróticos?*
- *Em adultos, a grelina tem se mostrado importante na modulação da homeostase energética. E no grupo pediátrico, teriam esses hormônios o mesmo efeito em crianças, visto que elas sofrem forte influência do hormônio de crescimento?*

Este trabalho é apenas o início de alguns resultados e discussões na busca das respostas a todos esses questionamentos, mas certamente sua contribuição servirá como base dentro de uma perspectiva evolutiva na busca incessante de uma terapia adequada para o tratamento da anorexia-caquexia em crianças e adolescentes com cirrose.

Sugerimos a realização de estudos longitudinais para otimizar respostas a questões inconclusivas e contribuir para o estabelecimento de alvos terapêuticos na anorexia-caquexia da cirrose.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Níveis diminuídos de grelina acilada e níveis aumentados de grelina total e desacilada relacionam-se com gravidade da doença hepática.

A leptina diminuída têm relação com desnutrição em crianças e adolescentes cirróticos.

Insulinemia e glicemia não apresentaram relação com as variáveis estudadas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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;382:250-252.

Alvares-da-Silva MR, Silveira TR. Comparison between handgrip strength, subjective global assessment, and prognostic nutritional index in assessing malnutrition and predicting clinical outcome in cirrhotic outpatients. *Nutrition* 2005;21:143-150.

Ankarberg-Lindgren C, Dahlgren J, Carlsson B, Rosberg S, Carlsson L, Wikland KA, *et al.* Leptin levels show diurnal variation throughout puberty in healthy children, and follow a gender-specific pattern. *Eur J Endocrinol* 2001 Jul;145(1):43-51.

Argetsinger LS & Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 1996;76:1089-1107.

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;23:493-495.

Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, *et al.* Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1169-1174.

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;54:18-24.

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;120:337-345.

Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Ghrelin and its therapeutic potential for cachectic patients. *Peptides* 2009;30(10):1951-1956.

Baker A, Stevenson R, Dhawan A, Goncalves I, Socha P, Sokal E. Guidelines for nutritional care for infants with cholestatic liver disease before liver transplantation. *Pediatr Transplantation* 2007;11:825-834.

- 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;14:95-99.
- Balistreri WF. Pediatric hepatology. A half-century of progress. *Clin Liver Dis* 2000;4(1):191-210.
- Barr VA, Lane K, Taylor SI. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* 1999;274(30):21416-21424.
- 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;89(4):1662-1665.
- 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;1(4):619-625.
- Bjørbaek C & Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:305-331.
- Blecker U, Mehta DI, Davis R, Sothorn MS, Suskind RM. Nutritional problems in patients who have chronic disease. *Pediatrics* 2000;21(1):29-32.
- Bolukbas FF, Bolukbas C, Horoz M, Gumus M, Erdogan M, Zeyrek F, Yayla A, Ovunc O. Child-Pugh classification dependent alterations in serum leptin levels among cirrhotic patients: a case controlled study. *BMC Gastroenterol* 2004;4:23.
- Breidert M, Zimmermann TF, Schneider R, Ehninger G, Brabant G. Ghrelin/Leptin-imbalance in patients with primary biliary cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004;112(3):123-126.
- Bucuvalas JC, Cutfield W, Horn J, Sperling MA, Heubi JE, Campaigne B, *et al.* Resistance to the growth-promoting and metabolic effects of growth hormone in children with chronic liver disease. *J Pediatr* 1990;117(3):397-402.
- Bucuvalas JC, Horn JA, Chernausk SD. Resistance to growth hormone in children with chronic liver disease. *Pediatr Transplant* 1997;1(1):73-79.
- 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;89:1319-1324.
- Camilleri M, Papathanasopoulos A, Odunsi ST. Actions and therapeutic pathways of ghrelin for gastrointestinal disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6(6):343-352.
- Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJ. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(4):419-25.
- Carvalho E, Seixas RBPM, Neto JTA. Doença hepática crônica- abordagens diagnóstica e terapêutica. In: Lopez FA & Júnior DC. *Tratado de Pediatria.- Sociedade Brasileira de Pediatria- Brueri, São Paulo: Manoele, 2007. p:905-918.*
- Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* 2010;31(1):44-60.

- 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;61:430-481a.
- Chen CY, Chao Y, Chang FY, Chien EJ, Lee SD, Doong ML. Intracisternal des-acyl ghrelin inhibits food intake and non-nutrient gastric emptying in conscious rats. *Int J Mol Med* 2005;16:695-699.
- Chen CY, Chien EJ, Chang FY, Lu CL, Luo JC. Impacts of peripheral obestatin on colonic motility and secretion in conscious fed rats. *Peptides* 2008;29:1603-1608a.
- Chen CY, Doong ML, Chien EJ, Luo JC, Lu CL, Lin HC, *et al.* Intracerebroventricular ghrelin enhances non-nutrient semiliquid gastric emptying in fasted conscious rats. *Gastroenterol J Taiwan* 2008;25:242-248b.
- Chen CY, Fujimiya M, Asakawa A, Chang FY, Cheng JT, Lee SD, *et al.* At the cutting edge: ghrelin gene products in food intake and gut motility. *Neuroendocrinology* 2009;89(1):9-17b.
- Chevenne D, Trivin F, Porquet D. Insulin assays and reference values. *Diabetes Metab* 1999;25(6):459-76.
- Chin SE, Shepherd RW, Thomas BJ, CLEHGorn GJ, Patrick MK, Wilcox JA, *et al.* The nature of malnutrition in children with end-stage liver disease a waiting for orthopic liver transplantation. *Am J Clin Nutr* 1992;56:164-68.
- Cisternas JR. Fisiologia da Ilhotas de Langerhans. In: *Tratado de fisiologia aplicado à nutrição*. São Paulo: Robe Editorial 2002. p791-804.
- Cnop M, Land Child-Pugh 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;51(4):1005-1015.
- Córdoba J, López-Hellín J, Planas M, Sabín P, Sanpedro F, Castro F, *et al.* Normal protein diet for episodic hepatic encephalopathy: results of a randomized study. *J Hepatol* 2004;41(1):38-43.
- Costa R F. *Composição corporal: Teoria e prática da avaliação*. Brasil. Editora Manole 2001, p40-41.
- 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;411:480-484.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, *et al.* The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003;37:649-661.
- 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.

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;50:1714-1719.

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;141:4255-4261a.

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;275:477-480b.

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;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;143(1-3):118-126.

De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization* 2007;85:660-667.

De Vriese C, Perret J, Delporte C. Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition* 2010. [*in press*]

Delano MJ & Moldawer LL. The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. *Nutr Clin Pract* 2006;21:68-81.

Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, *et al.* Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 2004;114(1):57-66.

Diz-Lois MT, Garcia-Buela J, Suarez F, Sangiao-Alvarellos S, Vidal O, Cordido F. Fasting and postprandial plasma ghrelin levels are decreased in patients with liver failure previous to liver transplantation. *Endocrine* 2009;35(3):467-476.

Dunger DB, Ahmed ML, Ong KK. Early and late weight gain and the timing of puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254-255:140-145.

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;23:775-786.

Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 2003;116:101-107.

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;284:2184-2188.

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):842-852.

- Ferreira CT, Vieira SMG, Kieling CO, Mello ED, Santos CM, Silveira C *et al.* Evolução dos pacientes pediátricos avaliados para transplante J. Pediatr (Rio J) 1997;73(2):75-79a.
- Ferreira CT, Vieira SMG, Silveira TR. Transplante hepático. J Pediatr (Rio J) 2000;76(2):198-208b.
- Flier JS. Clinical review 94: what's in a name? In search of leptin's physiologic role. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:1407-1413.
- Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell 2004;116:337-350.
- 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;50(2):216-229.
- 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;93:1971-1979.
- Friedman JM. The function of Leptin in nutrition, weight, and physiology. Nutr Rev 2002;60:1-14.
- Friedman MI. Fuel partitioning and food intake. Am J Clin Nutr 1998;67(3):513-518.
- Frisancho AR. Anthropometric standards: an interactive nutritional reference of body composition for children and adults. Ann Arbor The University of Michigan Press 2008;149-155.
- Gazal CHA. O inquérito nutricional, a antropometria e a avaliação da eliminação intestinal de proteínas e gorduras pela dosagem da alfa 1 antitripsina fecal e do esteatócrito na avaliação nutricional de crianças com cirrose. [Dissertação]. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR-RS, 1995.
- 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;150(10):4502-4511.
- 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.
- Gottschall CB, Alvares-da-Silva MR, Camargo AC, Burtett RM, da Silveira TR. Nutritional assessment in patients with cirrhosis: the use of indirect calorimetry. Arq Gastroenterol 2004;41(4):220-224.
- 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;60 382-388.
- Greer R, Lehnert M, Lewindon P, Cleghorn GJ, Shepherd RW. Body composition and components of energy expenditure in children with end-stage liver disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003;36(3):358-363.

- 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;48:23-29.
- Gundling F, Teich N, Strebel HM, Schepp W, Pehl C. Ernährung bei leberzirrhose. *Med Klin* 2007;102:435-444.
- Gunsar F, Raimondo ML, Jones S, Terreni N, Wong C, Patch D, *et al.* Nutritional status and prognosis in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24(4):563-572.
- Haqq AM, Farooqi IS, O'Rahilly S, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, *et al.* Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:174-178.
- Hardy S & Kleinman RE. Cirrhosis and chronic liver failure. In: Suchy F, Sokol RJ, Balistreri WF, eds. *Liver disease in children*. 3rd. Cambridge University Press, 2007:97-137.
- Hernsdorff HHM, Vieira MAQM, Monteiro JBR. Leptina e sua influência na patofisiologia de distúrbios alimentares. *Rev Nutr* 2006;19(3):369-379.
- Hewson AK & Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 2000;12:1047-1049.
- Honsawek S, Chaiwatanarat T, Chongsrisawat V, Thawornsuk N, Vejchapipat P, Poovorawan Y. Circulating leptin levels and bone mineral density in children with biliary atresia. *Acta Paediatr* 2008;97(2):206-211.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:909-913.
- 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.
- 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;273:974-977.
- Howard BV. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 1999;84(1):28-32.
- Huang TT, Johnson MS, Goran MI. Development of a prediction equation for insulin sensitivity from anthropometry and fasting insulin in prepubertal and early pubertal children. *Diabetes Care* 2002;25(7):1203-1210.
- Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:551-560.
- Işeri SO, Sener G, Saglam B, Ercan F, Gedik N, Yeğen BC. Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. *Regul Pept* 2008;146(1-3):73-79.

Janeckova R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res* 2001;50(5):443-459.

Kalaitzakis E, Bosaeus I, Ohman L, Björnsön E. Altered postprandial glucose, insulin, leptin, and ghrelin in liver cirrhosis: correlations with energy intake and resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr* 2007;85:808-815.

Kieling CO, Santos JL, Vieira SMG, Ferreira CT, Linhares ARR, Lorentz AL, Silveira TR. Biliary atresia: we still operate too late *J Pediatr (Rio J)* 2008;84(5):436-441.

Kim MS, Yoon CY, Park KH, Shin CS, Park KS, Kim SY, *et al.* Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport* 2003;14(10):1317-1320.

Kim WR, Brown RS Jr, Terrault NA, El-Serag H. Burden of liver disease in the United States. Summary of a workshop. *J Hepatol* 2002;36(1):227-242.

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;15(7):741-745.

Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 2007;8(1):21-34.

Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin-the classical, resistin-the controversial, adiponectin-the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19(4):525-546.

Kojima M & Kangawa K. Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ* 2010;50:185-205.

Kojima M & Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005;85(2):495-522.

Kojima M & Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ* 2008;46:89-115.

Kojima M, Hosoda H, Date Y. Ghrelin is a growthhormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-660.

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;12:118-122.

Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(11):4162-4165.

Kondrup J. Nutrition in end stage liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:547-560.

Korbonits M & Grossman AB. Ghrelin: update on a novel hormonal system. *Eur J Endocrinol* 2004;151(2):67-70.

- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996;379(6566):632-635.
- Leite LD & Brandão-Neto J. Integração Neuroendócrina na regulação da ingestão alimentar. *Neurobiologia* 2009;72(2):127-143.
- Leonis MA & Balistreri WF. Evaluation and Management of end-stage liver disease in children. *Gastroenterology* 2008;134:1741-1751.
- Liu J, Prudom CE, Nass R, Pezzoli SS, Oliveri MC, Johnson ML, *et al.* Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1980-1987.
- Maio R, Dichi JB, Burini RC. Conseqüências nutricionais das alterações metabólicas dos macronutrientes na doença hepática crônica. *Arq Gastroenterol* 2000;(37):52-57.
- Maio R, Dichi JB, Burini RC: Sensibilidade de indicadores da desnutrição protéico-energética em cirróticos com vários graus de disfunção hepatocelular. *Arq Gastroenterol* 2004;41(2):93-99.
- Marchesini G, Bianchi G, Lucidi P, Villanova N, Zoli M, De Feo P. Plasma ghrelin concentrations, food intake, and anorexia in liver failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2136-2141.
- Marra F & Bertolani C. Adipokines in liver disease. *Hepatology* 2009;50:957-969.
- Martos-Moreno GA, Chowen JA, Argente J. Metabolic signals in human puberty: Effects of over and undernutrition. *Mol Cell Endocrinol* 2010. [*in press*]
- Mattar RHGM, Azevedo RA, Speridião PGL, Neto UF, Morais MB. Estado nutricional e absorção intestinal de ferro em crianças com doença hepática crônica com e sem colestase. *J Pediatr* 2005;81(4):317-324.
- Meier U & Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004;50(9):1511-1525.
- Mello, ED. O que significa a avaliação do estado nutricional. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78(5):357-358.
- Mertens I & Van Gaal LF. Visceral fat as a determinant of fibrinolysis and hemostasis. *Semin Vasc Med* 2005;5(1):48-55.
- Mietlicki EG, Nowak EL, Daniels D. The effect of ghrelin on water intake during dipsogenic conditions. *Physiol Behav* 2009;96:37-43.
- Mondal MS, Toshinai K, Ueno H, Koshinaka K, Nakazato M. Characterization of obestatin in rat and human stomach and plasma, and its lack of acute effect on feeding behavior in rodents. *J Endocrinol* 2008;198:339-346.
- Moreira SR, Ferreira AP, Lima RM, Arsa G, Campbell CS, Simões HG, *et al.* Predicting insulin resistance in children: anthropometric and metabolic indicators. *J Pediatr (Rio J)* 2008;84(1):47-52.

- Moreno M, Chaves JF, Sancho-Bru P, Ramalho F, Ramalho LN, Mansego ML, *et al.* Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology* 2010;51(3):974-85.
- 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;283:544-548.
- Murphy KG & Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 2006;444(7121):854-9.
- 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;409:194-198.
- Neary NM, Druce MR, Small CJ, Bloom SR. Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. *Gut* 2006;55:135.
- Nielsen MF, Caumo A, Aagaard NK, Chandramouli V, Schumann WC, Landau BR, *et al.* Contribution of defects in glucose uptake to carbohydrate intolerance in liver cirrhosis: assessment during physiological glucose and insulin concentrations. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(6):1135-1143.
- Nightingale S & Vicky LN. Optimizing nutritional management in children with chronic liver disease. *Pediatr Clin North Am* 2009;56(5):1161-1183.
- Norman K & Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008;11(5):613-619.
- Ockenga J, Bischoff SC, Tillmann HL, Rifai K, Widjaja A, Böker KH, *et al.* Elevated bound leptin correlates with energy expenditure in cirrhotics. *Gastroenterology* 2000;119(6):1656-1662.
- Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, *et al.* Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;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;146:845-850.
- Park HS, Lee KU, Kim YS, Park CY. Relationships between fasting plasma ghrelin levels and metabolic parameters in children and adolescents. *Metabolism* 2005;54(7):925-929.
- Petrides AS, DeFronzo RA. Glucose and insulin metabolism in cirrhosis. *J Hepatol* 1989;8(1):107-114.
- Pierro A, Koletzko B, Carnielli V, Superina RA, Roberts EA, Filler RM, *et al.* energy expenditure is increased in infants and children with extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1989;24(6):534-538.
- Plauth M, Cabre E, Riggio O, Assis-Camilo M, Pirlich M, Kondrup J. ESPEN guidelines on enteral nutrition: liver disease. *Clin Nutr* 2006;25:285-294.

- Plauth M, Schutz ET. Cachexia in liver cirrhosis. *Int J Cardiol* 2002; 85:83-87.
- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-649.
- Raben A & Astrup A. Leptin is influenced both by predisposition to obesity and diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24(4):450-459.
- RDA - National Research Council: Recommended Dietary Allowances, 10th ed. Washington, D.C. National Academy Press, 1989, p205-211.
- RDI - Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary Reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. National Academy Press, Washington, D.C. 1997, p432.
- RDI - Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary Reference intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. The National Academy Press, Washington, D.C. 2001, p773.
- RDI - Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary Reference Intake for Energy, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Aminoacids. Food and Nutrition Board. Washington. DC. National Academy Press:2002 – www.nap.edu
- RDI - Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary Reference intakes for water, potassium, sodium chloride and sulfate. National Academy Press, Washington, D.C. 2005, 603p.
- Ritter L & Gazzola J. Nutritional evaluation of the cirrhotic patient: an objective, subjective or multicompartmental approach? *Arq Gastroenterol* 2006;43(1):66-70.
- Roberts GA, Holt RI, Ghatei MA, Baker AJ, Bloom SR, Miell JP. Serum leptin and insulin in paediatric end-stage liver disease and following successful orthotopic liver transplantation. *Clin Endocrinol* 1998;48(4):401-406.
- Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem* 2002;48(12):2270-2288.
- 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;297(1):134-141.
- 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;145(11):5049-5055.
- Santos JL, Choquette M, Bezerra JA. Cholestatic liver disease in children. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12:30-39.
- 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;58(1):21-26.
- Savino F & Liguori SA. Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. *Clin Nutr* 2008;(27):42-47.

- 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* 2006;65(2):158-162.
- Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, Schiff's. *Disease of the liver*. Lippincott. Williams & Williams. Volume. 10th edition, Philadelphia, 2007:366-392.
- Schneider AC, Pinto RB, Fröhlich PE, Hammes TO, da Silveira TR. Low plasma zinc concentrations in pediatric patients with cirrhosis. *J Pediatr (Rio J)* 2009;85(4):359-364.
- Schneider ACR, Pinto RB, Silveira TR. Determinação de risco nutricional e desnutrição por antropometria em crianças e adolescentes com cirrose. *Arq Gastroenterol* 2007;44(4):345-349.
- Schuppan D & Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(9615):838-851.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404(6778):661-671.
- Schwartz MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med* 2001;222(11):978-981.
- Secker DJ & Jeejeebhoy KN. Subjective Global Nutritional Assessment for children. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(4):1083-1089.
- Seoane LM, Al-Massadi O, Barreiro F, Dieguez C, Casanueva FF. Growth hormone and somatostatin directly inhibit gastric ghrelin secretion. An in vitro organ culture system. *J Endocrinol Invest* 2007;30:22-25.
- Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 2004;53(1):152-158.
- Shepherd DR. Management of chronic liver disease. In: Kelly DA, ed. *Diseases of the liver and biliary system in children*. Oxford: Blackwell Publishing; 2004, p259-81.
- Shiyya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, *et al.* Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:240-244.
- Sigulem DM, Devincenzi UM, Lessa AC. Diagnóstico do estado nutricional da criança e do adolescente. *J Pediatr (Rio J)* 2000;76(3):275-284.
- Silveira TR, Hua CK, Koeche RP, Mello ED, Maia SM, Alves RS. Mortalidade por doença hepática em pacientes com idade entre 30 dias e 15 anos acompanhados no HCPA. Implicações para a instalação de um programa de transplante hepático. *AMRIGS* 1993;37:140-144.
- Smith JT, Mark PJ, Waddell BJ. Developmental increases in plasma leptin binding activity and tissue Ob-R_e mRNA expression in the rat. *J Endocrinol* 2005;184(3):535-541.
- 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.
- 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;18:621-645.

- Soares JB & Moreira AFL. Ghrelin, des-acyl-ghrelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle. *Peptides* 2008;29:1255-1270.
- Sokol RJ & Stall C. Anthropometric evaluation of children with chronic liver disease. *Am J Clin Nutr* 1990;52:203-208.
- Stofkova A. Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr Regul* 2009;43(4):157-168.
- Suviolahti E, Ridderstrale M, Almgren P, Klannemark M, Melander O, Carlsson 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;27(10):1204-1211.
- Tacke F, Brabant G, Kruck E, Horn R, Schoffski P, Hecker H, *et al.* Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol* 2003; 38:447-454.
- Takahashi H, Kato A, Onodera K, Suzuki K. Fasting plasma ghrelin levels reflect malnutrition state in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2006;34:117-123.
- 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;28:829-835b.
- Taylor RM & Dhawan A. Assessing nutritional status in children with chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20(12):1817-1824.
- Teff KL, Elliott SS, Tschoöp 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;89:2963-2972.
- Testa R, Franceschini R, Giannini E, Cataldi A, Botta F, Fasoli A *et al.* Serum leptin levels in patients with viral chronic hepatitis or liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000;33(1):33-37.
- Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, *et al.* Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2006;147:2306-2231
- 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.
- Tsiaousi ET, Hatzitolios AI, Trygonis SK, Savopoulos CG. Malnutrition in end stage liver disease: Recommendations and nutritional support. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008;(23):527-533.
- UNOS – United Network for Organ Sharing. Allocation of livers – Proposed Amended UNOS Policy 3.6 – Approved by OPTN/UNOS Board of Directors. [arquivo online: [capturado 2005]. <http://www.unos.org>

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;7:493-494.

Vanni E, Maria Lorena AML, Gentilcore E, Hickman I, Gambino R, Cassader M, *et al.* Sites and mechanisms of insulin resistance in nonobese, nondiabetic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009;50:697-706.

Volp ACP, Rezende FAC, Alfenas RCG. Insulina: mecanismo de ação e a homeostase metabólica. *Rev Bras Nutr Clin* 2008;23(2):158-164.

Walker M. Obesity, insulin resistance, and its link to non-insulindependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1995;44(9 Suppl 3):18-20.

Wang J, Leclercq I, Brymora JM, Xu N, Ramezani-Moghadam M, London RM, *et al.* Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. *Gastroenterology* 2009;137(2):713-723.

Whatmore AJ, Hall CM, Jones J, Westwood M, Clayton PE. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. *Clin Endocrinol* 2003;59(5):649-654.

WHO Anthro for personal computers, version 3, 2009: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva: WHO, 2009 (<http://www.who.int/childgrowth/software/en/>)

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. WHO (nonserial publication). Geneva, Switzerland: WHO, 2006a.

WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization; 1995a.

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

WHO. Working Group on infant growth: an evaluation of infant growth: the use and interpretation of anthropometry in infants. *Bull World Health Org.* 1995;73:165-174b.

Wilasco MIA. Concentração de grelina, leptina, insulina e glicose em crianças eutróficas previamente híidas. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Winder WW & Hardie DG. "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes". *Am J Physiol* 1999;277(1):1-10.

Woods SC & D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11):37-50.

Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 2000; 51:255-277.

World Health Organization. Training Course on Child Growth Assessment. Version1- November 2006. Geneva, WHO, 2006;13-14b.

Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008;132(3):387-396.

Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M, Yahata K, Suganami T, *et al.* Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2748-2752.

Zanella MT & Ribeiro FFF. Emerging drugs for obesity therapy. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009;53(2):271-280.

Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, *et al.* Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005;310(5750):996-999.

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):425-432.

10 PAPER – GHRELIN AND LEPTIN IN CIRRHOTIC CHILDREN AND ADOLESCENTS: RELATIONSHIP WITH CIRRHOSIS SEVERITY AND UNDERNUTRITION STATE

Ghrelin and leptin levels in cirrhotic children and adolescents: relationship with cirrhosis severity and undernutrition state

*Cristina T. L. Dornelles⁽¹⁾, Helena A. S. Goldani⁽²⁾, Maria Inês A. Wilasco⁽³⁾, Rafael L. Maurer⁽⁴⁾, Carlos O. Kieling⁽⁵⁾, Cristina T. Ferreira⁽⁶⁾, Marilene P. Garrido⁽⁷⁾, Jorge L. Santos⁽⁸⁾, Sandra M.G. Vieira⁽⁹⁾, Themis R. Silveira⁽¹⁰⁾

Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas and Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brazil

- (1) Clinical Dietitian, MSc, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: cleal@hcpa.ufrgs.br
- (2) MD, PhD, Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Email: hgoldani@hcpa.ufrgs.br
- (3) Clinical Dietitian, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: ineswilasco@terra.com.br
- (4) Biologist, MSc, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: rmaurer@hcpa.ufrgs.br
- (5) MD, MSc, Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: ckieling@hcpa.ufrgs.br
- (6) MD, PhD, Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: cristinatarga@terra.com.br
- (7) Biologist, PhD, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: marilene.garrido@pucrs.br
- (7) MD, PhD, Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: kapars@terra.com.br
- (9) MD, PhD, Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: sandramvieira16@yahoo.com.br
- (10) MD, PhD, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: themisrs@terra.com.br

Short title: Ghrelin and leptin in children with cirrhosis.

Conflict of interest: all authors declare no conflict of interest.

***Corresponding author:** Cristina T.L. Dornelles. Rua Ramiro Barcelos 2350, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CEP 900135-903, Porto Alegre-RS, Brazil. Phone: (5551) 3359-7611, fax: (5551) 3359-8183. E-mail: cleal@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Background/aim: Undernutrition state and anorexia are important problems in children and adolescents with cirrhosis. Ghrelin and leptin are hormones involved in the control of food intake and they seem to be associated with anorexia in chronic diseases. This study aimed to investigate the relationship between fasting ghrelin and leptin concentrations; and the nutritional status in pediatric cirrhotic patients, comparing with sex- and age-matched healthy controls.

Methods: Blood samples were collected for total ghrelin, acyl ghrelin, and leptin assays by using a commercial ELISA kit. Severity of liver disease was assessed by Child-Pugh classification, and Pediatric for End Stage Liver Disease (PELD) or Model for End-stage Liver Disease (MELD) scores. Anthropometry parameters used were mid upper arm circumference-for-age ratio, triceps skinfold thickness-for-age ratio (WHO standards).

Results: Thirty-nine patients with cirrhosis and 39 healthy controls matched by sex and age were enrolled. Median (25-75centile) ages of patients and controls were 2.5 (0.7-9.6) and 2.6 (1.3-9.5) years. Plasma ghrelin levels showed an inverse correlation with age. Acyl ghrelin was significantly lower in cirrhotic patients than controls ($p < 0.001$). Ghrelin levels were associated with the severity of Child-Pugh classification and PELD or MELD scores ≥ 15 . Ghrelin levels did not associate with gender and causes of cirrhosis. Leptin levels were correlated positively with anthropometric parameters, hematocrit and hemoglobin. Undernourished cirrhotic patients had lower leptin levels than well-nourished.

Conclusion: This study showed that cirrhosis severity was associated with low ghrelin levels, whereas leptin was associated with undernourishment in children and adolescents with cirrhosis.

Keywords: Cirrhosis, anorexia, undernourishment, ghrelin, leptin, children, adolescents

Introduction

Undernutrition state is common in children and adolescents with cirrhosis (1). High energy and growth requirements make infants and children with cirrhosis vulnerable to the debilitating effects of undernourishment (2,3). Severely malnourished infants with end-stage liver disease are at increased risk for pre- and post-liver transplantation morbidity and mortality (4,5). Anorexia is a great problem in children and adolescents with cirrhosis, and may be an important contributing factor to undernourishment (6,7). Reduced food intake may follow the early satiety associated with the presence of large-volume ascites or hepatosplenomegaly, leading to a clinical picture of functional gastric outlet obstruction. Poor palatability of a restricted diet may also cause anorexia (8). The mechanisms of undernourishment and anorexia in cirrhosis are not completely understood. Both poor dietary intake and increased basal energy expenditure have been reported to contribute to a hypermetabolic state in patients with cirrhosis (1,2).

Ghrelin and leptin are the main hormones involved in the control of food intake and body weight, having antagonistic effects and being associated with anorexia in patients with chronic diseases (9). Circulating ghrelin levels rise shortly before expected food intake and fall shortly after every meal (10,11). The orexigenic properties of acyl ghrelin in order to compensate anorexia-caquexia have been studied, regarding its potential clinical use to stimulate appetite (12). Total fasting ghrelin and acyl ghrelin levels have been found normal or decreased and des-acyl ghrelin increased in adults with cirrhosis (13-16).

Leptin is a hormone produced from fat stores and plays an important role in appetite control, fat metabolism, energy expenditure and body weight regulation (17). Serum leptin levels in biliary atresia (19) and pediatric end-stage liver disease (18) were found lower than in healthy controls (18,19).

Only few studies have assessed the leptin levels in pediatric patients with chronic liver disease and none has evaluated the ghrelin levels. This study aimed to investigate the relationship between fasting ghrelin and leptin concentrations; and also the nutritional status in cirrhotic pediatric patients, comparing with sex- and age-matched healthy controls.

Patients and Methods

This study was approved by the Ethics and Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Informed and written consent was taken from all participants and caretakers.

Thirty-nine children and adolescents with cirrhosis aged 0-15 years and 39 healthy controls matched by sex and age were enrolled in this study from December/2006 to December/2009. Patients were followed up at the Pediatric Gastroenterology and Hepatology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary reference center for pediatric liver diseases and liver transplantation in Southern Brazil.

The diagnosis of cirrhosis was either established histologically or based on the patient's clinical, laboratory, endoscopic, or imaging features. The severity of liver disease was assessed according to Child-Pugh classification (20), and Pediatric for End Stage Liver Disease (PELD) score (21) for patients under 12 years or Model for End-stage Liver Disease (MELD) score (22) for those aged older than 12 years. Higher values indicate more severe disease, and the score 15 was the cut off used for these criteria.

Exclusion criteria were: patients with other chronic diseases (endocrine, renal, respiratory, cardiac or neurologic), any current acute infection, or hepatic encephalopathy at the time of enrollment for the study. All patients underwent laboratory investigation, ultrasound liver scan or gastrointestinal endoscopy as required by the routine clinical management. Most cirrhotic patients were on a regular treatment based on individual clinical

requirement, such as: vitamin A, D, E, K, ursodesoxicolic acid, antacids or proton pump inhibitors, diuretics, and none were on steroid treatment. Overall, patients had marked suppressed appetite as evaluated by the current daily amount of food ingestion, taken as reference the Dietary Reference Intakes (DRI) (23) and Recommended Dietary Allowances (RDA) (24). Three patients were on enteral nutrition with extensively hydrolysed protein, and none was on amino acid supplementation. Five patients had mild ascites detectable by ultrasonography, treated with Spironolactone.

Thirty nine healthy children, scheduled for blood sampling as a part of routine medical check up or as a standard assessment prior to eligible minimal surgeries such as inguinal hernia and hypospadias, were enrolled as controls. Exclusion criteria were: prematurity, chronic or acute disease, current use of any restricted diet, or any medication except for iron and oral vitamins, as well as an impossibility to anthropometry assessment.

All participants were asked to answer a questionnaire in order to identify demographic data and nutritional status. All had 2 mL of blood collected for ghrelin and leptin assessment. Cirrhotic patients had blood sampling for biochemical assessment as done as part of a routine clinical follow-up, according to local specific protocols.

- **Anthropometry assessment**

Anthropometry was measured by using the WHO training course on child growth assessment (25) by the same researcher. The variables used were: z-scores for the length, or height for age ratio (H/A), mid upper arm circumference-for-age ratio (MUAC), triceps skinfold thickness-for-age ratio (TSF), subscapular skinfold thickness-for-age ratio (SSF), according to WHO standards (26,27). WHO *Antho software version 3.0* (27) was used for children under 5 years of age (28,29). WHO *AnthoPlus software* (27) was used for 5-19 years

growth reference data 2007 (30). In cirrhotic patients with ascites we did not consider weight for age (W/A) and body index mass (BMI) since they might underestimate the diagnosis of undernourishment.

Nutritional status of cirrhotic patients, including body fat mass and H/A, were determined and classified according to WHO and Frisancho standard reference (25,31). Undernourishment was defined based on the z-score for H/A and MUAC or TSF below z-score -2.00 or both, according to standard Frisancho 2008 (31), based on age and sex. All controls were healthy and well-nourished children according to the WHO standard reference, determined and classified by BMI-for-age values within -2.00 and +2.00 SD for children under 5 years and within -2.00 and +1.00 SD for children over 5 years (29).

- **Ghrelin and leptin assessment**

Blood samples for ghrelin and leptin concentrations were collected between 08:00 and 12:00 hours in the morning, following a period of at least 3-hour fasting. Plasma and serum were immediately separated by centrifugation for 10 minutes at 3000rpm (4°C) and then stored at -80°C until subsequent analysis. For the ghrelin determinations the blood was taken into tubes containing EDTA-2Na (1,25mg/mL) and aprotinin (500U/mL). The tubes were centrifuged immediately, acidified and stored. For the leptin determinations the blood was taken into serum tubes, centrifuged and stored. Plasma total ghrelin and acyl ghrelin, as well as serum leptin concentrations, were measured in duplicate using a commercial ELISA kit (Linco Research, St Charles-MI, USA). Des-acyl ghrelin concentration was calculated subtracting acyl ghrelin from total ghrelin.

Statistical analysis

Data were processed and analyzed using SPSS 17.0 *version*. Patients were grouped according to categorical variables. Comparisons between groups were tested using nonparametric analysis (Mann-Whitney *U* test). Chi-square test was used, whenever appropriate, to compare prevalence. Spearman's rank correlation was calculated to quantify the degree of association between two variables. Linear regression analysis was used to associate ghrelin levels with nutritional status, cholestasis, ascites, severity of cirrhosis, creatinin and hematocrit; and leptin levels with anthropometric data (WA, MUAC, TSF, and SSF), nutritional status, ascites, albumin, INR, hemoglobin, hematocrit and gender.

Results

The clinical and demographic findings of the patients and controls are shown in table 1. The majority of patients were under 2 years old (51.3%) and the main cause of cirrhosis in all patients was biliary atresia (66.7%). Twenty-seven (81%) had PELD score below the cutoff point 15. Six patients were assessed by the MELD score, and all were below the cutoff point 15.

Ghrelin, acyl ghrelin and leptin concentration values are shown in table 1. The concentration of acyl ghrelin was significantly lower in cirrhotic patients than controls ($P=0.001$) (figure 1). There was a trend for the total ghrelin to be lower in cirrhotic patients compared with controls ($P= 0.060$). Leptin levels were not significantly different between cirrhotic patients and controls.

The correlation among total ghrelin, acyl and des-acyl grelin, and leptin was not significant in both cirrhotic patients and controls. The median period of fasting for the assessment of laboratory tests was not different between cirrhotic patients [4.0 (3 to 8.3) hours] and controls [4.5 (3 to 12.4) hours] ($P= 0.103$); and was not correlated with any of the

variables studied. Hematocrit values from cirrhotic patients were significantly lower than controls [$34.1 \pm 5.2\%$ vs $36.8 \pm 2.75\%$, $P=0.008$]. Hemoglobin values from cirrhotic patients were significantly lower than controls [11.3 ± 1.87 g/dL vs 12.1 ± 0.87 g/dL, $P=0.005$]. In cirrhotic patients, the mean or median values of other laboratory tests were as follows: albumin 3.8 g/dL ± 0.55 , total bilirubin 1.4 mg/dL (0.6-4.8), creatinine 0.36 mg/dL ± 0.10 and INR 1.14 ± 0.17 ; and direct bilirubin measured in 35 patients was 1.0 mg/dL (0.2-5.9). There was no association between these variables and the outcomes studied. Among the cirrhotic patients, in whom direct bilirubin was measured, 34.3% had values ≥ 2 mg/dL.

- **Fasting plasma ghrelin in children and adolescents with cirrhosis**

Total ghrelin ($r_s = -0.450$, $P = 0.004$), acyl ghrelin ($r_s = -0.367$, $P = 0.022$) and des-acyl ghrelin ($r_s = -0.417$, $P = 0.008$) showed an inverse correlation with age in the bivariate analysis. Total ghrelin and acyl ghrelin were not correlated with anthropometric parameters (figure 2).

There was a trend for total ghrelin [984 (858-1506) pg/mL vs 879 (715-1235) pg/mL, $P=0.055$], and des-acyl ghrelin [867 (728-1395) pg/mL vs 749 (548-981) pg/mL, $P=0.052$] to be higher in undernourished patients compared to well-nourished cirrhotic patients; and for cirrhotic patients with cholestasis [1323 (793-2113) pg/mL vs 896 (725-1304) pg/mL, $P=0.099$] compared with other cirrhotic patients [992 (672-1912) pg/mL vs 775 (725-1024) pg/mL, $P=0.099$]. Total ghrelin [1530 (1055-3680) pg/mL vs 904 (748-1239) pg/mL; $P=0.049$] and des-acyl ghrelin [1461 (943-3253) pg/mL vs 791 (622-1019) pg/mL; $P=0.031$] values were significantly higher in cirrhotic patients with ascites. Ghrelin concentrations were neither associated with sex, nor the biliary or non-biliary cause of cirrhosis.

Total ghrelin, acyl ghrelin and des-acyl ghrelin levels were associated with the severity of liver disease in cirrhotic patients. Acyl ghrelin concentrations were significantly

lower in patients with more severe disease, classified as Child-Pugh B+C compared with Child A [133 (69-177) ng/mL vs 184 (113-400) pg/mL, $P= 0.043$] on bivariate analysis (figure 1). Total ghrelin [1489 (1263-3294) pg/mL vs 901 (722-1215) pg/mL, $P= 0.016$] and des-acyl ghrelin [1395 (917-2793) pg/mL vs 782 (599-994) pg/mL, $P= 0.008$] values were higher in cirrhotic patients with more severe disease (severity score PELD/MELD ≥ 15) when compared with other cirrhotic patients on bivariate analysis. After multivariate analysis, total ghrelin and acyl ghrelin concentrations remained associated with age. Acyl ghrelin levels remained associated with Child-Pugh; and des-acyl ghrelin was associated with the severity of cirrhosis (PELD/MELD score ≥ 15) (table 2).

- **Fasting serum leptin in children and adolescents with cirrhosis**

Leptin levels were positively correlated with z-score of H/A ($r_s= 0.440$, $P=0.005$), BMI ($r_s=0.398$, $P=0.020$), MUAC ($r_s= 0.497$, $P=0.002$), TSF ($r_s= 0.592$, $P<0.001$), SSF ($r_s=0.595$, $P<0.001$) (figure 3), hematocrit ($r_s=0.384$, $P=0.016$) and hemoglobin ($r_s=0.325$, $P=0.043$) on bivariate analysis. There was significant difference in leptin levels between genders; female [2.40 (1.54-4.21) ng/mL] had higher leptin than male [1.31 (0.78-2.30) pg/mL] patients, ($P= 0.038$). Cirrhotic patients with ascites presented significantly lower leptin levels than cirrhotic patients with no ascites [1.04 (0.32-1.36) ng/mL vs 2.03 (1.28-3.80) ng/mL, $P=0.012$]. Undernourished cirrhotic patients had lower serum concentrations of leptin than well-nourished cirrhotic patients [1.45 (0.57-2.03) ng/mL vs 3.08 (1.35-4.42) ng/mL, $P=0.005$] patients. Leptin levels were not associated with age, biliary vs non-biliary cause of cirrhosis, presence of cholestasis and severity of liver disease. In a multivariate analysis after adjustment levels of leptin remained associated with height for age and female gender (table 3).

Discussion

In the present study, we evaluated the levels of ghrelin and leptin in children and adolescents with cirrhosis in comparison with healthy controls. This is the first study to assess plasma ghrelin levels in children and adolescents with cirrhosis comparing with controls. Moreover, we also evaluated more than one ghrelin isoform - total ghrelin and acyl ghrelin. We found that fasting acyl ghrelin and leptin concentrations were lower in cirrhotic children than in healthy controls.

We found that acyl ghrelin levels were associated with cirrhosis severity but did not correlate with anthropometric parameters. It is known that circulating ghrelin has two main isoforms: acylated and unacylated (des-acyl) (9). The acylated form is thought to be essential for biological orexigenic activity, whereas des-acyl ghrelin has recently been shown to influence anorexigenic effect in animals (32). Our results showed that fasting plasma acyl ghrelin levels in children and adolescents with cirrhosis were approximately 16% of total ghrelin, and controls 20%. In adults, fasting plasma ghrelin levels have been described in cirrhotic patients either unchanged (14), elevated (13,33), or decreased (16,35) in patients with cirrhosis compared with control subjects. It has been shown that ghrelin may have a short-term role on regulation of food intake and long-term role on regulation of body weight (36).

In our study, total ghrelin may be a reflection of increased des-acyl ghrelin and this might be one of the multifactorial causes of poor appetite, low food intake and undernourishment in children with cirrhosis. Acyl ghrelin levels were associated with the severity of cirrhosis and were significantly lower in patients classified as Child-Pugh B+C when compared with Child-Pugh A and controls. This finding might suggest an impaired appetite in patients with a more severe disease. Child-Pugh B and C patients were put together

as there was a few number of Child-Pugh C patients. This latter might be a limitation of the study; nevertheless it might show that the group of patients of this study was highly selected, particularly Child-Pugh C patients since they are likely to have a more compensated cirrhosis, without hepatic encephalopathy or current infection. In adult cirrhotic patients, it has been shown that total fasting plasma ghrelin level may be increased in Child-Pugh C patients with ascites, hepatic encephalopathy, and previous gastrointestinal bleeding (13). In our study, total ghrelin showed an inverse correlation with age, and was not associated with gender and cirrhosis etiology. We did not find any correlation between anthropometric parameters and ghrelin levels probably due to the small number of Child-Pugh C patients.

In regard of leptin levels, they were correlated with anthropometric parameters and undernourishment in cirrhotic patients although they were not significantly different when compared with controls. Nevertheless, leptin levels in cirrhotic patients had a positive correlation with z-score anthropometric parameters (H/A, BMI, MUAC, TSF, SSF) suggesting that leptin may play a physiological role on body composition maintenance in cirrhotic children and adolescents. Roberts *et al.* (18) showed low serum leptin levels in children with end-stage liver disease without correlation with measurements of body fat mass. In addition, Honsawek *et al.* (19) showed that patients with biliary atresia also had lower leptin than healthy controls, but it was associated with age, BMI and bone mineral density. Low levels of leptin might be due to alterations in the hormone regulation on undernourished state associated with inflammatory process in cirrhosis (37), particularly in end-stage liver disease. In our study, leptin was not associated with age, cause of cirrhosis, presence of cholestasis, or severity of liver disease. Leptin was correlated positively with hematocrit and hemoglobin probably as a reflection of disease severity (13). We found higher leptin concentration in female than male patients and this was in accordance with other studies in cirrhotic adults and children (38).

In summary, the cause of undernourishment and anorexia in children and adolescents with cirrhosis is multifactorial, although insufficient dietary intake is probably the most important cause. Cirrhotic children and adolescents often develop anorexia and subsequently exhibit body weight and muscle loss. Because ghrelin is one of the key hormones modulating feeding behavior and calorie status, biological actions of ghrelin may be highly linked with undernourishment in patients with cirrhosis. Cohort studies assessing cirrhotic patients before and after liver transplantation might be helpful to evaluate the real role of ghrelin on undernourishment in cirrhotic patients. Ghrelin seems to have an anti-inflammatory activity (33), whilst leptin seems to have pro-inflammatory effects (37,38). Possible abnormalities in ghrelin regulation may be associated with the development of undernourishment during the inflammatory process in cirrhosis. Ghrelin also seems to have antifibrotic effect on the liver and may represent a novel antifibrotic therapy (33). Furthermore, clinical trials using ghrelin for its orexigenic, anabolic, and anti-inflammatory properties in order to ameliorate anorexia-caquexia syndrome in patients with liver cirrhosis would be helpful (36).

In conclusion, this study showed that cirrhosis severity was associated with low ghrelin levels whereas leptin was associated with undernourishment in children and adolescents with cirrhosis. Further studies are needed to better clarify the pathophysiological and therapeutic roles of ghrelin and leptin in children and adolescents with cirrhosis and undernutrition state.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Criança e Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Fundo de Incentivo a Pesquisa, Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the financial support.

References:

1. Hardy S, Kleinman RE. Cirrhosis and chronic liver failure. In: Suchy F, Sokol RJ, Balistreri WF, eds. *Liver disease in children*. 3rd ed. Cambridge University Press 2007:97-137.
2. Leonis MA, Balistreri WF. Evaluation and management of end-stage liver disease in children. *Gastroenterology* 2008;134:1741-1751.
3. Nightingale S, Vicky Ng L. Optimizing nutritional management in children with chronic liver disease. *Pediatr Clin North Am* 2009;56:1161–83.
4. Shepherd RW, Chin SE, Cleghorn GJ, Patrick M, Ong TH, Lynch SV *et al*. Undernutrition in children with chronic liver disease accepted for liver transplantation: clinical profile and effect on outcome. *J Paediatr Child Health* 1991;27:295-9.
5. DeRusso PA, Ye W, Shepherd R, Haber BA, Shneider BL, Whittington PF *et al*. Biliary Atresia Research Consortium. Growth failure and outcomes in infants with biliary atresia: a report from the Biliary Atresia Research Consortium. *Hepatology* 2007;46:1632-8.
6. Plauth M, Schutz ET. Cachexia in liver cirrhosis. *Int J Cardiol* 2002; 85:83–87.
7. Tsiaousi ET, Hatzitolios AI, Trygonis SK, Savopoulos CG. Undernutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:527-33.
8. Feranchak AP, Sokol RJ. Medical and nutritional management of cholestasis in infants and children. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF, eds. *Liver disease in children*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007:190–231.
9. Kojima M, Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ* 2008;46:89-115.
10. Selberg O, Böttcher J, Tusch G, Pichlmayr R, Henkel E, Muller MJ. Identification of high- and low-risk patients before liver transplantation: a prospective cohort study of nutritional and metabolic parameters in 150 patients. *Hepatology* 1997;25:652–7.
11. McCullough AJ, Tavill AS. Disordered energy and protein metabolism in liver disease. *Sem Liv Dis* 1991;11:265–77.
12. Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* 2010;31:44-60.
13. Tacke F, Brabant G, Kruck E, Horn R, Schoffski P, Hecker H *et al*. Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol* 2003;38:447–454.
14. Marchesini G, Bianchi G, Lucidi P, Villanova N, Zoli M, De Feo P. Plasma ghrelin concentrations, food intake, and anorexia in liver failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2136–2141.

15. Takahashi H, Kato A, Onodera K, Suzuki K. Fasting plasma ghrelin levels reflect undernutrition state in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2006;34:117–123.
16. Diz-Lois MT, Garcia-Buela J, Suarez F, Sangiao-Alvarellos S, Vidal O, Cordido F. Fasting and postprandial plasma ghrelin levels are decreased in patients with liver failure previous to liver transplantation. *Endocrine* 2009;35:467-76.
17. Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res* 2000; 10:81–92.
18. Roberts GA, Holt RI, Ghatei MA, Baker AJ, Bloom SR, Miell JP. Serum leptin and insulin in paediatric end-stage liver disease and following successful orthotopic liver transplantation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:401-6.
19. Honsawek S, Chaiwatanarat T, Chongsrisawat V, Thawornsuk N, Vejchapipat P, Poovorawan Y. Circulating leptin levels and bone mineral density in children with biliary atresia. *Acta Paediatr* 2008;97:206-11.
20. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646–649.
21. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL *et al.* A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464-70.
22. UNOS – United Network for Organ Sharing. Allocation of livers – Proposed Amended UNOS Policy 3.6 – Approved by OPTN/UNOS Board of Directors 2005 <http://www.unos.org>
23. RDA - National Research Council: Recommended Dietary Allowances, 10th ed. Washington, D.C. National Academy Press, 1989. p.205-11.
24. RDI - Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary Reference Intake for Energy, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Aminoacids. Food and Nutrition Board. Washington. DC. National Academy Press:2002 – www.nap.edu
25. World Health Organization. Training Course on Child Growth Assessment. Geneva, WHO, 2008.
26. 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.
27. 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.
28. WHO Anthro for personal computers, version 3, 2009: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva: WHO, 2009 (<http://www.who.int/childgrowth/software/en/>).

29. WHO AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva: WHO, 2009 (<http://www.who.int/growthref/tools/en/>).
30. De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ* 2007;85:660-7
31. Frisancho AR. Anthropometric standards: an interactive nutritional reference of body composition for children and adults. The University of Michigan Press. Ann Arbor, 2008. p:149-55.
32. 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;61:430-481.
33. Işeri SO, Sener G, Saglam B, Ercan F, Gedik N, Yeğen BC. Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. *Regul Pept* 2008;146:73-9.
34. Moreno M, Chaves JF, Sancho-Bru P, Ramalho F, Ramalho LN, Mansego ML *et al.* Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology* 2010;51:974-85.
35. Breidert M, Zimmermann TF, Schneider R, Ehninger G, Brabant G. Ghrelin/leptin-imbalance in patients with primary biliary cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004;112:123-6.
36. De Vriese C, Perret J, Delporte C. Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition* 2010 (*in press*)
37. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver disease. *Hepatology* 2009;50:957-69.
38. Martos-Moreno GA, Chowen JA, Argente J. Metabolic signals in human puberty: effects of over and undernutrition. *Mol Cell Endocrinol* 2010 (*in press*)

Table 1 - Clinical and demographic characteristics of patients with cirrhosis and controls

Variables	Cirrhotics (n= 39)	Controls (n= 39)	<i>P</i>
Age (years)	2.5 (0.7-9.6)	2.6 (1.3-9.5)	0.667†
0-2	20 (51.3)	20 (51.3)	
2-5	5 (12.8)	5 (12.8)	
5-10	5 (12.8)	6 (15.4)	
10-15	9 (23.1)	8 (20.5)	
Gender – female	20 (51.3)	20 (51.3)	1.000†
Nutritional status*			<0.001†
Well-nourished	22 (56)	39 (100)**	
Undernourished	17 (44)**	0 (0.0)	
Causes of cirrhosis			
Biliary atresia	26 (66.7)		
Choledocal cyst	01 (2.6)		
Autoimmune hepatitis	03 (7.7)		
Alpha-1 antitrypsin deficiency	02 (5.1)		
Cryptogenic	07 (17.9)		
Ascites	05 (12.8)		
Cholestasis (BD≥2 mg%) (n=35)	12 (34.3)		
Child-Pugh classification			
A	20 (51.3)		
B	16 (41.0)		
C	03 (7.7)		
B + C	19 (49.0)		
PELD score	33 (85.0)		
MELD score	06 (15.0)		
Ghrelin (pg/mL)			
Total	907 (755-1.432)	1.391 (814-1.995)	0.060††
Acyl	142 (93-278)	275 (208-481)	0.001 ††
Des-acyl	815 (625-1.045)	1001 (688-1.624)	0.163††
Leptin (ng/mL)	1.6 (1.1-3.5)	2.3 (1.3-4.2)	0.421††

Data are expressed as median (25th-75th percentile) or absolute number (%)

* based on height/age and triceps skinfold z-score <2.00

** Statistically significant association by adjusted residual test (*P* <0.05)

† Chi-square test

†† Mann-Whitney *U*-test

Table 2 - Linear regression for ghrelin stepwise variables

Variables	Linear Regression Model	
	β	<i>P</i>
Total ghrelin*		
Age (years)	-0.438	0.009
Acyl ghrelin **		
Age (years)	-0.461	0.002
Child B/C class	-0.576	<0.001
Des-acyl ghrelin ***		
PELD/MELD score \geq 15	0.445	0.007

* $F(1,33) = 7.83$, $P = 0.009$, $R_2 = 19.2\%$ and adjusted for nutritional status, creatinin, cholestasis, severity of cirrhosis PELD/MELD and ascites.

** $F(2,33) = 11.3$, $P < 0.001$, $R_2 = 40.6\%$ and adjusted to creatinine and hematocrit

*** $F(1,33) = 8.16$, $P = 0.007$, $R_2 = 19.8\%$ and adjusted for age, nutritional status, creatinin, cholestasis, and ascites.

Numbers are transformed by logarithm scales

Table 3 - Linear regression for leptin stepwise variables

Variables	Linear Regression Model	
	β	<i>P</i>
Height for age (z-score)	0.438	0.007
Sex female	0.388	0.016

* F (4,26) = 6.99, *P* = 0.001, R_2 = 44.4% and adjusted for the Z-BMI, Z-H/A, Z-MUAC, Z-TSF and Z-SSF, nutritional status, ascites, hemoglobin, hematocrit, albumin and INR.

Numbers are transformed by logarithm scales

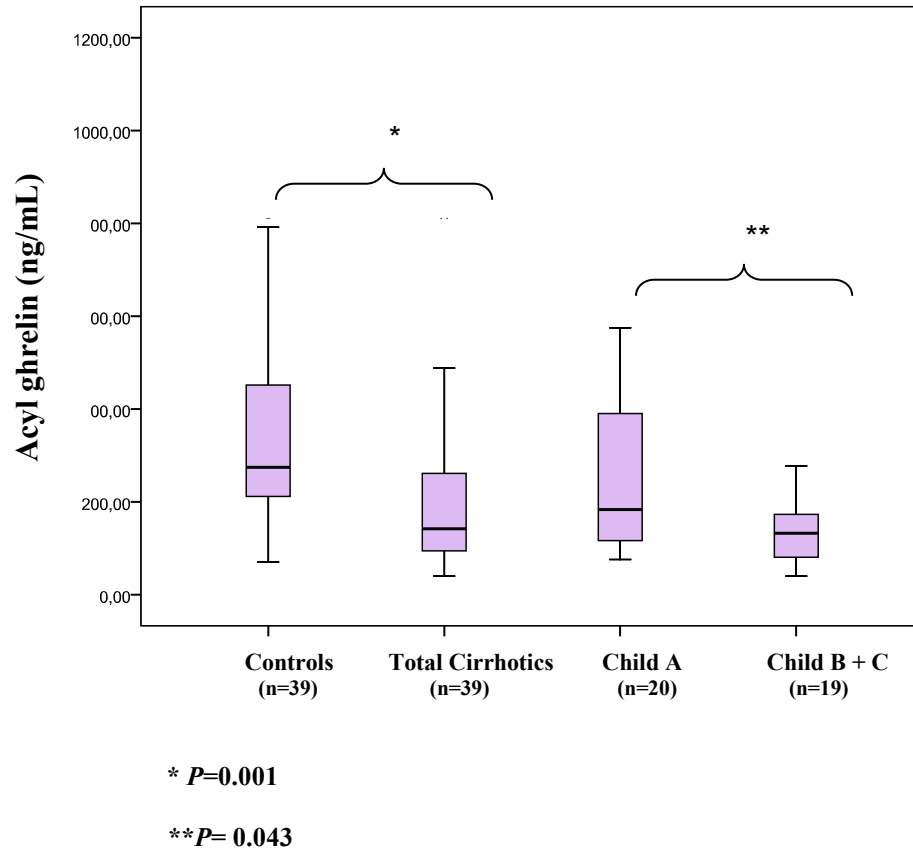
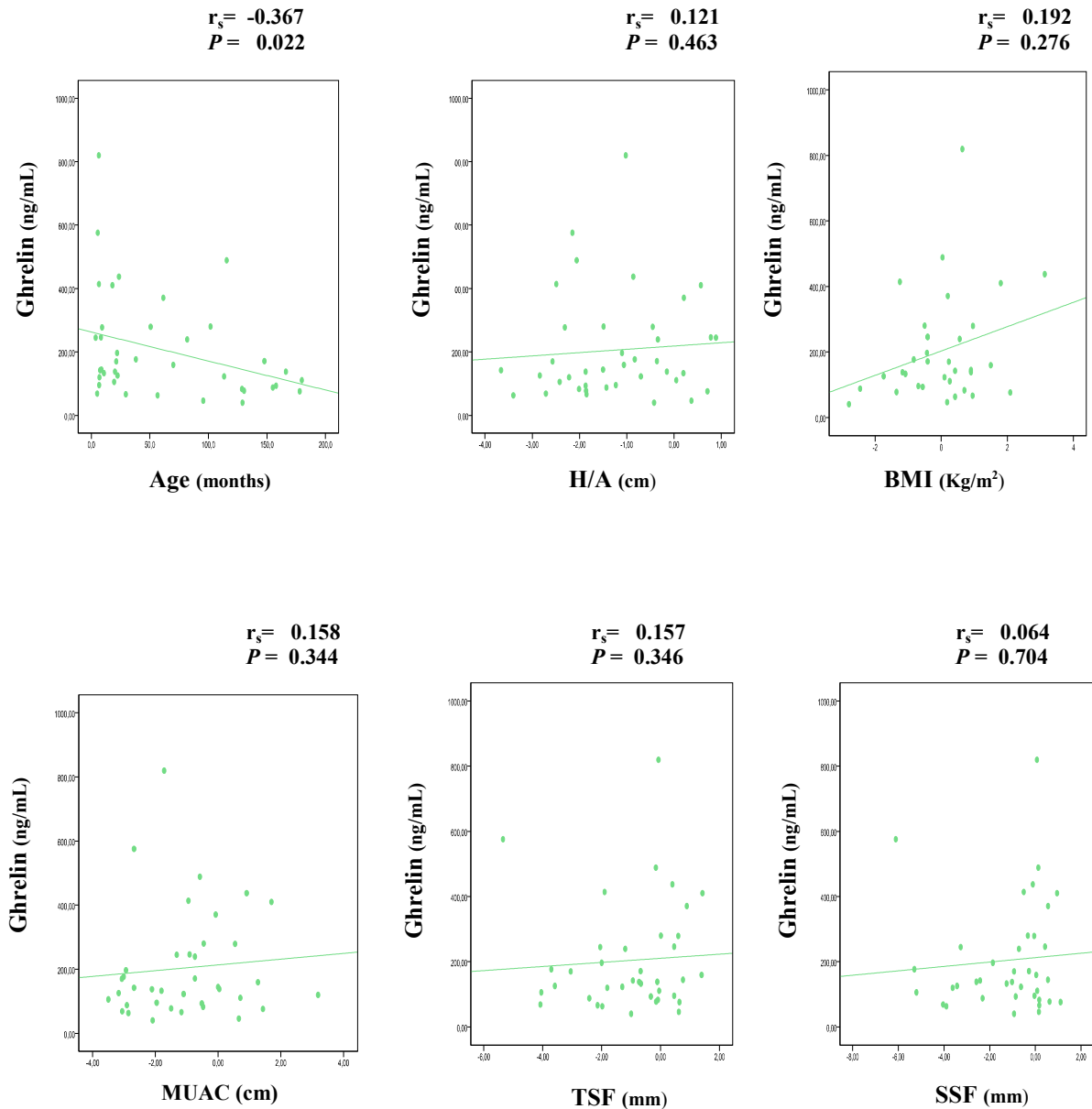
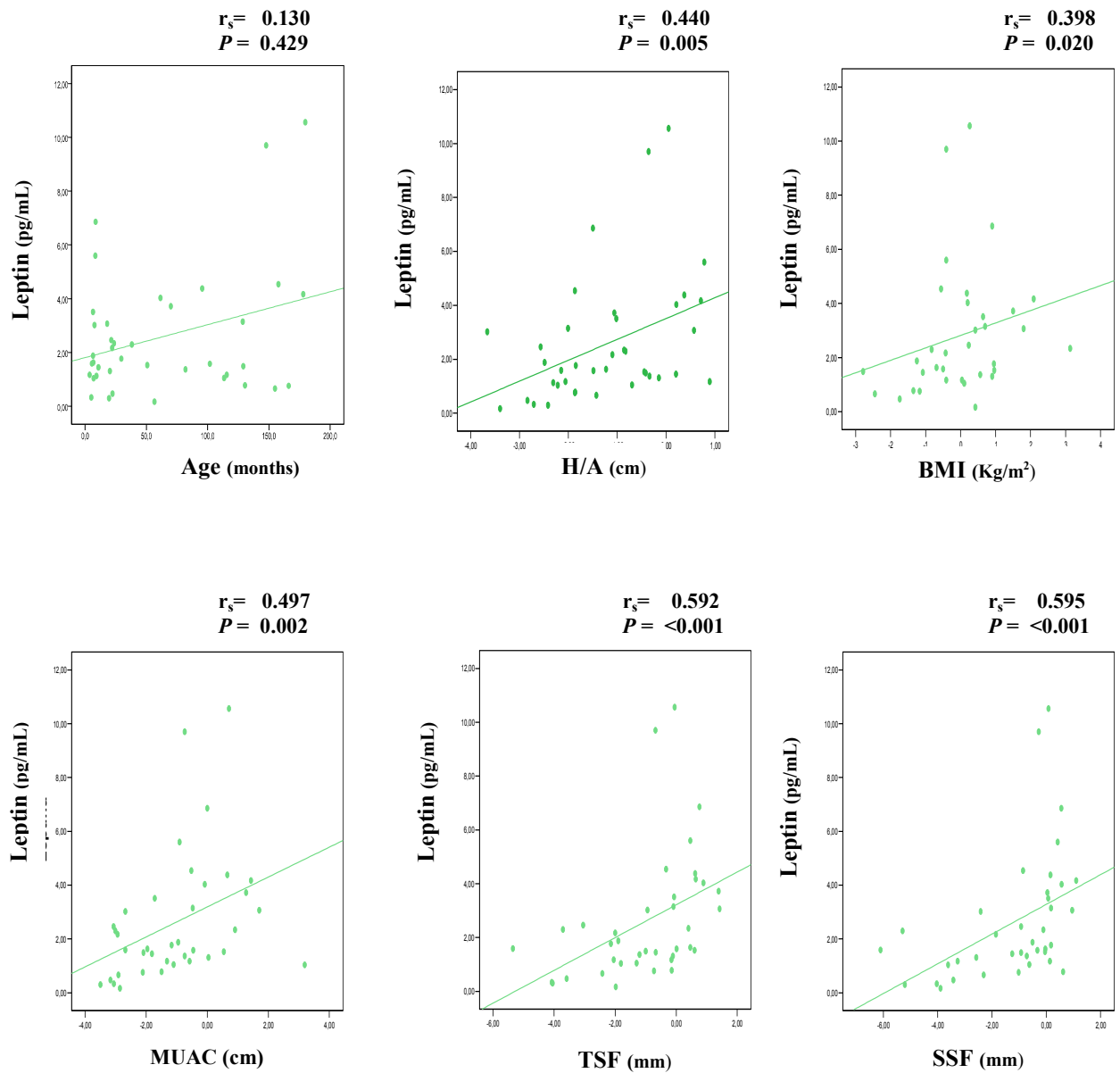


Figure 1 - Plasma acyl ghrelin levels in cirrhotic patients according to Child-Pugh classification and controls



H/A:height/age; BMI: body index mass; MUAC: mid upper arm circumference-for-age
 TSF triceps skinfold thickness-for-age; SSF: subscapular skinfold thickness-for-age

Figure 2 – Relationship between acyl ghrelin levels and antropometric parameters: age, H/A, BMI, MUAC, TSF, SSF



H/A: height/age; BMI: body index mass; MUAC: mid upper arm circumference-for-age
 TSF triceps skinfold thickness-for-age; SSF: subscapular skinfold thickness-for-age

Figure 3 – Relation between leptin levels and antropometric parameters: age, H/A, BMI, MUAC, TSF, SSF

11 ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido (casos)

Nome do estudo : Avaliação dos níveis plasmáticos de grelina e leptina em crianças com cirrose.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS

Pesquisadores responsáveis: Dra. Themis Reverbel da Silveira (51-2101 8350) e Nutricionista Cristina Toscani Leal Dornelles (51-84213130)

1. Justificativa e objetivo deste estudo:

A GRELINA é um hormônio que aumenta o apetite e a LEPTINA diminui o apetite.

As crianças com cirrose apresentam pouco apetite, com ganho de peso e crescimento insuficientes. 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, classificar o estado nutricional e a quantidade de alimentos que a criança está comendo.

2. Procedimento:

Serão coletados 2 ml de sangue para dosagem dos hormônios, das crianças com cirrose, em acompanhamento no Serviço de Pediatria/Unidade de Gastroenterologia, que necessitarão fazer coleta de sangue para o seu devido tratamento ou revisão de saúde. Não será realizada coleta adicional. Serão realizadas medidas de peso e comprimento ou estatura, circunferência do braço, prega cutânea tripectral e prega subescapular. Será solicitado também o preenchimento de um registro de tudo o que a criança comer e beber durante 3 dias, para ser calculado.

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 em cirróticos poderão, no futuro, beneficiar outras crianças em situações semelhantes à de meu (minha) filho(a) atuando na prevenção da desnutrição.

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 confidenciais e utilizadas apenas com finalidade científica.

7. Perguntas:

Uma das pesquisadoras discutiu as informações e ofereceu-se para responder perguntas e/ou dúvidas. No decorrer do estudo, poderei contactá-la no fone: 51-2101 7611.

8. Consentimento:

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e autorizo o armazenamento do sangue coletado e utilização em pesquisas futuras por até 5 anos. Outras pesquisa só serão realizadas após aprovação do Comitê de Ética em 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 de coleta de dados dos cirróticos

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Ficha nº: _____

Nome do paciente: _____ Reg: _____
 Nome do responsável: _____ Data: _____
 Sexo: () Masc () Fem Grupo racial: () Cauc () NC Data de nascimento: ____/____/____
 Nacionalidade: _____ Naturalidade: _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ CEP: _____ Cidade: _____
 Telefones para contato: _____

2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

2.1. Fator etiológico da cirrose

Anomalias congênitas	Doenças genéticas/ metabólicas
() Atresia de vias biliares extra-hepática	() Deficiência de alfa-1 antitripsina
() Síndrome de Alagille/ Hipoplasia biliar não sindrômica	() Fibrose cística
() Cisto de colédoco	() Galactosemia
	() Frutosemia
	() Glicogenose tipo III e IV
	() Tirosinemia
	() Hemocromatose
	() Doença de Wilson
	() Outras _____
Hepatite	
() Hepatite B	
() Hepatite C	
() Hepatite auto-imune	

2.2. Gravidade da doença – Classificação de Child-Pugh

Avaliação clínica e bioquímica	Pontuação 01	Pontuação 02	Pontuação 03
Encefalopatia (grau)	Ausente	Discreta	Moderada/Grave
Ascite	Ausente	Discreta	Moderada/Grave
Bilirrubina (mg/dl)	1 – 2	2 - 3	> 3
Albumina (g/dl)	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8
Prolongamento do tempo de protrombina (segundos)	1 – 4	4 - 6	> 6

Intensidade: **Child-Pugh** () A (leve) < 6 () B (moderada) 7 - 9 () C (severa) > 9

2.3. Uso de medicamentos? Quais?

.....

2.4. Alterações ao exame físico:

- () Icterícia
- () Circulação colateral
- () Baqueteamento digital
- () Ascite
- () Esplenomegalia.....
- () Hepatomegalia
- () Petéquias
- () Equimoses

ANEXO 3

REGISTRO DA INGESTÃO ALIMENTAR**INSTRUÇÕES PARA O COMPLETO PREENCHIMENTO DO RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 3 DIAS:**

1. Anotar o que foi ingerido em 3 dias, dois dias da semana e 1 dia do final de semana. Preferencialmente não preencher nos feriados ou férias.
2. As informações devem ser claras, constando também os métodos e ingredientes usados para a preparação dos alimentos, por exemplo: frito, assado ou cozido.
3. A quantidade ingerida dos alimentos deve ser registrada, por exemplo: colher de sopa, sobremesa ou chá, xícara ou copo, se possível medir em mililitros (ml) os líquidos.
4. Lembrar de escrever todos os ingredientes, por exemplo: açúcar, maionese, manteiga ou margarina, tempero para saladas; bem como os alimentos ingeridos fora do horário das refeições.
5. Anotar sempre a quantidade de alimento que foi ingerida pelo paciente e não a quantidade servida.

TODOS OS DADOS DEVEM SER PREENCHIDOS CORRETAMENTE, POIS SÃO MUITO IMPORTANTES PARA QUE O NUTRICIONISTA POSSA CALCULAR AS QUANTIDADES DE CALORIAS, PROTEÍNAS E DEMAIS NUTRIENTES INGERIDOS NA DIETA.

NOME DO PACIENTE: _____ DATA DE

NASCIMENTO: _____

DATA: _____ PESO: _____ FONE PARA CONTATO: _____

1º dia Data: ___/___/___	ALIMENTOS INGERIDOS	QUANTIDADE INGERIDA (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)
CAFÉ DA MANHÃ Horário: _____		
LANCHE DA MANHÃ Horário: _____		
ALMOÇO Horário: _____		
LANCHE DA TARDE Horário: _____		
JANTAR Horário: _____		
CEIA Horário: _____		
INTERVALO DAS REFEIÇÕES		

APETITE:POUCO () NORMAL () MUITO ()

2º dia Data: ___/___/___	ALIMENTOS INGERIDOS	QUANTIDADE INGERIDA (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)
CAFÉ DA MANHÃ Horário: _____		
LANCHE DA MANHÃ Horário: _____		
ALMOÇO Horário: _____		
LANCHE DA TARDE Horário: _____		
JANTAR Horário: _____		
CEIA Horário: _____		
INTERVALO DAS REFEIÇÕES		

APETITE:POUCO () NORMAL () MUITO ()

3º dia Data: ___/___/___	ALIMENTOS INGERIDOS	QUANTIDADE INGERIDA (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)
CAFÉ DA MANHÃ Horário: _____		
LANCHE DA MANHÃ Horário: _____		
ALMOÇO Horário: _____		
LANCHE DA TARDE Horário: _____		
JANTAR Horário: _____		
CEIA Horário: _____		
INTERVALO DAS REFEIÇÕES		

APETITE:POUCO () NORMAL () MUITO ()

ANEXO 4 - Termo de consentimento livre e esclarecido (controles)

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS

Pesquisadores responsáveis: Dra. Themis Reverbel da Silveira (51-2101 8350) e Nutricionista Cristina Toscani Leal Dornelles (51-84213130)

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, classificar o estado nutricional e a quantidade de alimentos que a criança está comendo.

2. Procedimento:

Será coletado 2 ml de sangue para dosagem dos hormônios nas 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. Serão realizadas medidas de peso e comprimento ou estatura, circunferência do braço, prega cutânea tricipital e prega subescapular. Será solicitado também o preenchimento de um registro de tudo o que a criança comer e beber durante 3 dias, para ser calculado.

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:

Os entendimentos dos hormônios que agem no controle da fome poderão, no futuro, beneficiar outros indivíduos, atuando na prevenção da desnutrição.

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 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 contactá-la no fone: 2101 7611.

8. Consentimento:

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e autorizo o armazenamento do sangue coletado e utilização em pesquisas futuras, por até 5 anos. Outras pesquisa só serão realizadas após aprovação do Comitê de Ética em pesquisa.

() **sim** () **não**

Assinatura do(a) responsável pela criança: _____

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

Assinatura do investigador responsável: _____

Porto Alegre, ____/____/____

ANEXO 6

**Protocolo de coleta e armazenamento do plasma
(grelina)**

1°	Preparar os tubos de vidro: Para 1,0 ml de sangue: colocar: 50 µl de Aprotinina + 15 µl de EDTA 2Na Para 1,5 ml de sangue: colocar: 75 µl de Aprotinina + 22,5 µl de EDTA 2Na 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.
2°	Identificar o tubo com nome do paciente, n° do prontuário, data e hora da coleta.
3°	Colocar o sangue coletado e tampar o tubo.
4°	Fazer movimentos de inversão, gentilmente, por oito vezes (para misturar o sangue com o anticoagulante).
5°	Colocar no isopor com gelo reciclável (gel).
6°	Colocar na centrífuga refrigerada (4° C) por 10 min a 1500xg ou 3000 RPM. *Vai ficar em duas fases: <u>Em cima: PLASMA</u> <u>Em baixo:</u> elementos figurados (hemácias/leucócitos/plaquetas) *Cada 1 ml de sangue gera ± 500 de plasma. *Verificar a quantidade de soro e adicionar o HCl (1 mol / L) 100 µl / ml de sangue. Ex: 500 µl de soro adicionar 50 µl HCl 600 µl de soro adicionar 60 µl HCl 700 µl de soro adicionar 70 µl HCl
7°	Pipetar o sobrenadante (PLASMA) e transferir para o microtubo.
8°	Adicionar o HCl conforme a quantidade de plasma que foi pipetada.
9°	Agitar ou colocar no Vortex alguns segundos.
10°	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 G e o n° seqüencial do paciente. Ex: G1, G2, G3 ... Colar na parte superior do microtubo.
11°	Colocar o microtubo direto no freezer a – 80°C.

ANEXO 7

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

1°	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.
2°	Identificar o tubo de vidro com nome do paciente, n° do prontuário, data e hora da coleta.
3°	Colocar o sangue coletado (\pm 1,5 ml) e tampar o tubo.
4°	Colocar no isopor com gelo reciclável (gel).
5°	Deixar na bancada por 30 – 45 min até reter o coágulo (fica uma massa gelatinosa em cima).
6°	Colocar na centrífuga refrigerada (4° C) por 15 min a 1500xg ou 3000 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.
7°	Pipetar o sobrenadante (SORO) e transferir para o microtubo.
8°	Preencher a etiqueta retangular a lápis. Enrolar com durex. <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 L e o n° seqüencial do paciente, ex: L1, L2, L3 ... Colar na parte superior do microtubo.</p>
9°	Colocar o microtubo direto no freezer a – 80°C.

ANEXO 8

Protocolo do teste de ELISA - grelina total

1. Fazer o desenho da placa, conforme anexo 15.
2. Diluir os padrões.
3. Identificar 5 microtubos: 100 pg/ml – 200 pg/ml – 500 pg/ml – 1000 pg/ml – 2000 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 1000 pg/ml. No 2000 adicionar 0,600 ml de tampão de ensaio (TE) + 0,400 ml de padrão 5 ng/ml, para obter o padrão 2000 pg/m.
4. Identificar 2 microtubos: QC1 – QC2.
5. Reconstituir a Grelina Humana QC1 e a Grelina Humana QC2 com 0,5 ml de água destilada para cada e inverte vagarosamente até completa dissolução.
6. Colocar nos tubos respectivos.
7. Colocar os microtubos no agitador por 10 segundos cada um.
8. Misturar o conteúdo total da Grelina Humana com o Detector de Anticorpo e o antígeno a uma proporção de 1:1. Inverter gentilmente. Deixar em uma temperatura ≤ 20 °C até utilização (não congelar).
9. Diluir os dois frascos de tampão de lavagem (TL) em 900 ml de água destilada.
10. 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.
11. Adicionar 20 μ L de solução matriz (SM) aos brancos, controles de qualidade (QC1 e QC2) e Padrões (100, 200, 500, 1000, 2000, 5000).
12. Adicional 30 μ L de Tampão de Ensaio (TE) em cada poço de branco e amostras.
13. Adicionar 10 μ L de TE em cada Padrão e Controle de Qualidade.
14. Adicionar 20 μ L dos Padrões Grelina nos poços específicos.
15. Adicionar 20 μ L do QC1 e QC2 nos poços específicos.
16. Adicionar 20 μ L de cada amostra em cada poço previamente determinado no desenho da placa.
17. Adicionar 50 μ L da solução previamente preparada com o anticorpo que está na geladeira.
18. Colocar papel selante na placa e levar ao *shaker* por duas horas a uma velocidade de 400 a 500 rpm.
19. Retirar o papel selante e retirar toda a solução que está na placa batendo-a em papel papel absorvente.
20. 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.
21. 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.
22. Retirar o selante, bater a placa em papel absorvente para remover os resíduos.
23. 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.
24. 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.
25. Remover o selante a 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.
- 26.

Obs: Para determinar a concentração da grelina total 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 9

Protocolo do teste de ELISA - grelina acilada

1. Fazer o desenho da placa, conforme anexo 15.
2. Diluir os padrões.
3. Identificar 6 microtubos: 25 pg/ml – 50 pg/ml – 100 pg/ml – 200 pg/ml – 500 pg/ml – 1000 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 1000 adicionar 0,500 ml de TE + 0,500 ml de padrão 2 ng/ml, para obter o padrão 1000 pg/ml.
4. Identificar 2 microtubos: QC1 – QC2
5. Reconstituir a Grelina Humana QC1 e a Grelina Humana QC2 com 0,5 ml de água destilada para cada e inverter vagarosamente até completa dissolução.
6. Colocar nos tubos respectivos.
7. Colocar os microtubos no agitador por 10 segundos cada um..
8. Misturar o conteúdo total da Grelina Humana com o Detector de Anticorpo e o antígeno a uma proporção de 1:1. Inverta gentilmente. Deixar em uma temperatura ≤ 20 °C até utilização (não congelar).
9. Diluir os dois frascos de tampão de lavagem (TL) em 900 ml de água destilada.
10. 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.
11. Adicionar 20 μ L de solução matriz (SM) aos brancos, controles de qualidade (QC1 e QC2) e Padrões (100, 200, 500, 1000, 2000, 5000).
12. Adicional 30 μ L de Tampão de Ensaio (TE) em cada poço de branco e amostras.
13. Adicionar 10 μ L de TE em cada Padrão e Controle de Qualidade.
14. Adicionar 20 μ L dos Padrões Grelina nos poços específicos.
15. Adicionar 20 μ L do QC1 e QC2 nos poços específicos.
16. Adicionar 20 μ L de cada amostra em cada poço previamente determinado no desenho da placa.
17. Adicionar 50 μ L da solução previamente preparada com o anticorpo que está na geladeira.
18. Colocar papel selante na placa e levar ao *shaker* por duas horas a uma velocidade de 400 a 500 rpm.
19. Retirar o papel selante e retirar toda a solução que está na placa batendo-a em papel papel absorvente.
20. 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.
21. 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.
22. Retirar o selante, bater a placa em papel absorvente para remover os resíduos.
23. 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.
24. 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.
25. Remover 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.

Obs: Para determinar a concentração da grelina acilada 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 10

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 11

Protocolo do teste de ELISA – leptina (0,5ng/ml – 100ng/ml)

Inicialmente, retirar todos os reagentes do freezer e geladeira e deixar a temperatura ambiente antes do ensaio. Seguem-se as etapas do protocolo:

1. Diluir os dois frascos do tampão concentrado de lavagem (*Wash Buffer*) em 900ml de H₂O destilada.
2. Adicionar 300ml 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 75µL do tampão de ensaio (*Assay Buffer*) em cada poço.
5. Adicionar, em duplicata, 25µL do tampão do ensaio nos brancos. Cada branco terá 100µL do tampão.
6. Adicionar, em duplicata, 25µL dos padrões de leptina humana em ordem crescente de concentração. Seguido de 25µL de QC1 e 25 µL de QC2 nos poços apropriados em duplicata e 25µL dos soros (amostras) nos poços restantes.

Todos os procedimentos anteriores devem ser realizados em no máximo 1 hora.

7. 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.
8. Remover o selador e bater a placa para retirar o líquido e
9. Lavar a placa 3 vezes com o tampão de lavagem, 300µL por poço.
10. Adicionar 100µL de detector de anticorpo (*Detection Antibody*) em cada poço. Cobrir a placa e incubar por 30 minutos no *shaker* em temperatura ambiente.
11. Remover o selador e bater a placa para retirar o líquido.
12. Adicionar 100µL de solução enzimática (*Enzyme Solution*) 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. Lavar 5 vezes com o tampão de lavagem, 300µL por poço. Bater a placa.
15. Adicionar 100µL de solução substrato (*Substrate Solution*) em cada poço, cobrir a placa e agitar no *shaker* por 5 minutos.
16. Remover o selador e adicionar 100µL de solução preparada (*Stop Solution*) em cada poço e agitar manualmente até misturar todo produto.
17. Ler em 450nm e 590nm dentro de 5 minutos.

Obs: 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 12

Protocolo do teste de ELISA - insulina

1. Coletar o sangue em tubo de vidro sem anticoagulante;
2. Deixar a temperatura ambiente por 30 minutos para reter o coágulo;
3. Centrifugar a 3000 RPM/15 min a 4°C;
4. Aliquotar as amostras e congelar a -80°C;
5. Retirar o kit ELISA Active Insulina do refrigerador e deixar até atingir a temperatura ambiente;
6. Retirar o soro dos pacientes para descongelar;
7. Reconstituir os padrões de insulina com água deionizada. Adicionar 1 ml ao padrão A e 0,5 ml aos padrões B-F;
8. Reconstituir os controles de insulina com 0,5 ml de água deionizada;
9. Preparar a solução de lavagem diluindo o concentrado de lavagem em 1500 ml de água deionizada;
10. 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;
11. Para a realizar o Ensaio Regular: utilizar 25 µL dos padrões A-E, controles e amostras em duplicatas nas cavidades apropriadas;
12. Para o Ensaio com Limite Estendido: pipetar 10 µL dos padrões A e C-F, controles e amostras em duplicatas nas cavidades apropriadas;
13. Adicionar 100 µL de solução conjugado anticorpo-enzima em cada cavidade;
14. Incubar a placa em agitador orbital a 200 RPM por 1 hora a temperatura ambiente;
15. Aspirar e lavar 5x a placa com solução de lavagem adicionando 400 µL em cada cavidade;
16. Após o término das lavagens, inverter a placa e bater em papel absorvente;
17. Pipetar 100 µL de solução de TMB a cada cavidade;
18. Cobrir a placa e incubar em agitador orbital a velocidade de 200 RPM/10 min em temperatura ambiente;
19. Adicionar 100 µL de solução de parada (ácido sulfúrico 0,2 M) em cada cavidade;
20. Ler, dentro de 30 minutos, em leitor de microplacas ajustado para 450 nm com filtro de referência de 600 ou 620 nm.
21. Calcular as médias dos padrões, controles e amostras;
22. 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 13**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.

<p>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</p>
--

ANEXO 14

Tabelas dos resultados completos

Tabela 11 – Análise da correlação dos dados antropométricos e a ingestão alimentar nos cirróticos

Variáveis	Idade (n=39)	EI (n=39)	IMC/I-Z (n=34)	CB-Z (n=38)	DCT-Z (n=38)	DCS-Z (n=38)	%RDI (n=36)
	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)
Grelina total	-0,450 (0,004)	0,030 (0,858)	-0,105 (0,556)	-0,007 (0,966)	-0,072 (0,666)	-0,182 (0,274)	-0,036 (0,833)
Grelina acilada	-0,367 (0,022)	0,121 (0,463)	0,192 (0,276)	0,158 (0,344)	0,157 (0,346)	0,064 (0,704)	0,201 (0,241)
Grelina desacilada	-0,447 (0,008)	0,022 (0,892)	-0,129 (0,466)	-0,012 (0,941)	-0,062 (0,712)	-0,141 (0,397)	-0,062 (0,721)
Leptina	0,130 (0,429)	0,440 (0,005)	0,398 (0,020)	0,497 (0,002)	0,592 (<0,001)	0,595 (<0,001)	0,318 (0,059)
Insulina	0,041 (0,804)	-0,064 (0,697)	-0,099 (0,577)	0,080 (0,634)	0,042 (0,800)	-0,111 (0,506)	-0,063 (0,717)
Glicose^(**)	0,448 (0,004)	0,091 (0,583)	-0,115 (0,519)	0,239 (0,149)	0,210 (0,205)	0,224 (0,176)	-0,517 (0,001)

IMC/I-Z= Escore-z do índice de massa corporal; E/I-Z= Escore-z da estatura para idade;

(*) Coeficiente de Correlação de Spearman; (**) Coeficiente de correlação de Pearson.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a insulina com os desfechos em estudo ($P > 0,10$).

Tabela 12 – Análise da correlação entre os exames laboratoriais nos cirróticos

Variáveis	Ht (n=39)	Hb (n=39)	Albumina (n=39)	BT (n=39)	BD (n=35)	Cr (n=39)	INR (n=39)
	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)	r_s^* (P)
Grelina total	-0,122 (0,459)	-0,137 (0,406)	-0,006 (0,972)	0,099 (0,547)	0,083 (0,634)	-0,340 (0,034)	-0,039 (0,813)
Grelina acilada	0,233 (0,154)	0,205 (0,210)	0,85 (0,607)	-0,148 (0,367)	-0,155 (0,375)	-0,283 (0,081)	-0,171 (0,297)
Grelina desacilada	-0,142 (0,388)	-0,157 (0,339)	-0,010 (0,954)	0,114 (0,489)	0,093 (0,597)	-0,292 (0,071)	0,025 (0,879)
Leptina	0,384 (0,016)	0,325 (0,043)	0,262 (0,107)	-0,198 (0,228)	-0,163 (0,351)	0,245 (0,132)	-0,306 (0,058)
Insulina	-0,129 (0,434)	-0,140 (0,394)	-0,087 (0,600)	0,230 (0,159)	0,228 (0,188)	0,169 (0,303)	0,074 (0,654)
Glicose^(**)	0,153 (0,353)	0,182 (0,268)	0,282 (0,082)	-0,087 (0,597)	-0,055 (0,756)	0,331 (0,039)	0,039 (0,815)

Ht= Hematócrito; Hb= Hemoglobina; BT= Bilirrubina Total; BD= Bilirrubina Direta;

Cr=Creatinina; INR=International Normalized Ratio

(*) Coeficiente de Correlação de Spearman; (**) Coeficiente de correlação de Pearson.

Não houve associação estatisticamente significativa entre grelina acilada, desacilada e insulina com os desfechos em estudo ($P > 0,10$).

Tabela 13 – Análise da correlação entre os hormônios e glicose na amostra total

Variáveis	Grelina total (n=39) r_s^* (P)	Grelina acilada (n=39) r_s^* (P)	Grelina desacilada (n=39) r_s^* (P)	Leptina (n=39) r_s^* (P)	Insulina (n=39) r_s^* (P)	Glicose (n=39) r_s^* (P)
Grelina total	-	-	-	-	-	-
Grelina acilada	0,744 (<0,001)	-	-	-	-	-
Grelina desacilada	0,981 (<0,001)	0,638 (<0,001)	-	-	-	-
Leptina	-0,175 (0,125)	-0,017 (0,880)	-0,203 (0,075)	-	-	-
Insulina	0,007 (0,954)	-0,181 (0,112)	0,044 (0,705)	0,147 (0,199)	-	-
Glicose	-0,093 (0,416)	-0,202 (0,077)	-0,070 (0,545)	0,098 (0,393)	0,156 (0,172)	-

(*) Coeficiente de Correlação de Spearman

Não houve associação estatisticamente significativa entre os hormônios e glicose quando relacionados entre si, na amostra total ($P > 0,10$).

Tabela 14 – Análise da correlação entre os hormônios e glicose nos cirróticos

Variáveis	Grelina total (n=39) r_s^* (P)	Grelina acilada (n=39) r_s^* (P)	Grelina desacilada (n=39) r_s^* (P)	Leptina (n=39) r_s^* (P)	Insulina (n=39) r_s^* (P)	Glicose (n=39) r_s^* (P)
Grelina total	-	-	-	-	-	-
Grelina acilada	0,600 (<0,001)	-	-	-	-	-
Grelina desacilada	0,979 (<0,001)	0,481 (0,002)	-	-	-	-
Leptina	-0,130 (0,430)	0,199 (0,225)	-0,142 (0,388)	-	-	-
Insulina	0,114 (0,488)	-0,216 (0,186)	0,150 (0,363)	0,036 (0,829)	-	-
Glicose	0,001 (0,994)	-0,236 (0,147)	0,039 (0,813)	0,033 (0,840)	0,214 (0,190)	-

(*) Coeficiente de Correlação de Spearman

Não houve associação estatisticamente significativa entre os hormônios e glicose quando relacionados entre si, nos cirróticos ($P > 0,10$).

Tabela 15 – Concentração plasmática da grelina nos cirróticos

Características	Total (pg/ml)	Acilada (pg/ml)	Desacilada (pg/ml)
Sexo			
Feminino - n=20	946 (738-1.417)	146 (94-280)	856 (575-1.065)
Masculino - n=19	907 (755-1.432)	142 (88-245)	801 (628-1.021)
<i>P</i> *	0,945	0,923	0,989
Estado nutricional			
Bem nutridos – n= 22	879 (715-1.235)	143 (91-280)	749 (548-981)
Desnutridos - n=17	749 (548-981)	133 (92-261)	867 (728-1.395)
<i>P</i> *	0,055	0,790	0,052
Causas da cirrose			
Biliar - n=30	904 (772-1.436)	143 (95-278)	833 (622-1.052)
Não biliar - n=09	919 (591-1.280)	138 (83-274)	801 (497-1.009)
<i>P</i> *	0,706	0,682	0,706
Alimentação Insuficiente			
Presente - n=22	904 (743-1.340)	129 (92-207)	778 (624-1.100)
Ausente - n=17	930 (755-1.457)	171 (93-412)	867 (599-1.058)
<i>P</i> *	0,664	0,146	0,747
Ascite			
Sim - n=06	1.530 (1.055-3.680)	120 (87,4-427)	1.461 (943-3.253)
Não - n=33	904 (748-1239)	143(92-254)	791 (622-1.019)
<i>P</i> *	0,049	0,984	0,031
Colestase			
Presença - n=12	1.323 (793-2.113)	143 (82-270)	992 (672-1.912)
Ausência -- n=23	896 (725-1.304)	160 (88-280)	775 (725-1.024)
<i>P</i> *	0,099	0,959	0,099
Child-Pugh			
Child A - n=20	904 (740-1.443)	184 (113-400)	817 (625-1.065)
Child B - n=16	913 (761-1.055)	135 (67-175)	791 (621-941)
Child C - n=03	1.447 (664-4.452)	120 (106-278)	1.328 (558-1.174)
<i>P</i> *	0,641	0,119	0,559
Child A - n=20	904 (740-1.443)	184 (113-400)	817 (625-1.065)
Child B + C - n=19	919 (755-1433)	133 (69-177)	801 (613-1019)
<i>P</i> *	0,879	0,004	0,945
PELD/MELD			
≥ 15 pontos - n=06	1489 (1263-3294)	210 (107-454)	1395 (917-2793)
< 15 pontos - n=33	901 (722-1215)	138 (91-246)	782 (599-994)
<i>P</i> *	0,016	0,412	0,018

(*) Teste de Mann-Wihtney

Não houve associação estatisticamente significativa entre as variáveis em estudo com o sexo, a causa da cirrose, história de alimentação insuficiente e colestase ($P > 0,10$).

Tabela 16 – Concentração sérica de leptina, insulina e glicose nos cirróticos

Características	Leptina (ng/ml)	Insulina (μ UI/ml)	Glicose** (mg/ml)
Sexo			
Feminino - n=20	2,40 (1,54-4,22)	21,9 (13,5-28,5)	88,4 (\pm 16,7)
Masculino - n=19	1,31 (0,78-2,30)	17,0 (13,8-31,1)	83,2 (\pm 14)
<i>P</i> *	0,038	0,923	0,301
Estado nutricional			
Bem nutridos - n= 22	3,08 (1,35-4,42)	16,6 (13,5-28,9)	90,3 (\pm 16,6)
Desnutridos – n=17	1,45 (0,57-2,03)	26,3 (13,9-33,5)	80,1 (\pm 12,0)
<i>P</i> *	0,005	0,424	0,039
Causas da cirrose			
Biliar - n=30	1,70 (1,16-3,24)	19,0 (13,5-33,3)	84,3 (\pm 15,1)
Não biliar - n=09	1,49 (0,77-6,87)	17,0 (13,6-27,3)	91,2 (\pm 16,2)
<i>P</i> *	0,961	0,682	0,242
Alimentação Insuficiente			
Presente - n=22	1,34 (0,78-1,77)	16,7 (14,0-27,4)	86,4 (\pm 14,7)
Ausente - n=17	3,51 (1,82-4,99)	26,3(12,6-42,7)	85,2 (\pm 16,9)
<i>P</i> *	<0,001	0,585	0,825
Ascite			
Sim - n=06	1,04 (0,32-1,36)	26,3 (19,2-68,1)	86,8 (\pm 18,0)
Não - n=33	2,03 (1,28-3,80)	17,0 (3,5-29,8)	85,7 (\pm 15,4)
<i>P</i> *	0,012	0,192	0,888
Colestase			
Com - n=12	1,68 (1,14-4,04)	24,7 (15,7-30,7)	87,4 (\pm 20,4)
Sem - n=23	1,63 (1,17-3,15)	16,3 (13,5-30,0)	83,3 (\pm 11,5)
<i>P</i> *	0,878	0,221	0,449
Child-Pugh			
Child A - n=20	1,88 (1,21-3,67)	17,0 (13,5-27,7)	85,4 (\pm 10,9)
Child B - n=16	1,83 (1,24-4,04)	19,1 (13,7-30,7)	87,4 (\pm 20,5)
Child C - n=03	1,04 (0,30-1,13)	42,6 (15,2)	81,3 (\pm 14,5)
<i>P</i> *	0,108	0,349	0,207
Child A - n=20	1,88 (1,21-3,67)	17,0 (13,5-27,7)	85,4 (\pm 10,9)
Child B + C – n=19	1,63 (1,04-3,02)	20,1 (14,4-42,6)	86,4 (\pm 19,5)
<i>P</i> *	0,478	0,396	0,832
PELD/MELD			
\geq 15 pontos - n=06	1,36 (0,86-2,16)	24,7 (16,8-46,7)	85,0 (\pm 16,8)
< 15 pontos - n=33	1,77 (1,17-3,88)	17,0 (13,5-29,9)	86,0 (\pm 15,5)
<i>P</i> *	0,242	0,258	0,883

(*) Teste de Mann-Wihtney; (**) Teste t-Student

Não houve associação estatisticamente significativa entre as variáveis em estudo com o a causa da cirrose, a colestase e na gravidade da doença hepática pela classificação de Child-Pugh e pelos escores de PELD/MELD ($P > 0,10$).

ANEXO 15

Desenho da placa de 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

ANEXO 16

Albumina, bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), creatinina, INR, TPs

Caso	Albumina (g/dl)	BT (mg/dl)	BD (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	INR	TPs
1	4,3	15,6	12,0	0,30	1,06	4,3
2	3,6	0,3	0,1	0,30	1,46	3,6
3	3,8	1,3	0,8	0,30	1,11	3,8
4	4,4	0,5	0,2	0,30	1,03	4,4
5	5,0	0,3	0,1	0,30	1,04	5,0
6	3,3	1,3	1,4	0,40	0,95	3,3
7	4,2	0,4	0,1	0,30	1,04	4,2
8	3,5	2,3	1,1	0,30	1,31	3,5
9	4,2	0,7	0,3	0,40	1,08	4,2
10	3,8	12,5	9,0	0,30	0,94	3,8
11	4,5	0,5	0,1	0,30	1,13	4,5
12	3,5	3,6	2,6	0,30	1,05	3,5
13	3,7	1,4	-	0,30	1,29	3,7
14	3,6	2,1	1,9	0,50	1,03	3,6
15	3,1	14,4	11,1	0,30	1,32	3,1
16	4,6	0,6	0,2	0,60	1,12	4,6
17	3,7	2,4	1,1	0,30	1,12	3,7
18	4,0	1,3	-	0,50	1,50	4,0
19	3,6	13,0	8,6	0,30	1,40	3,6
20	3,9	4,6	2,8	0,30	0,97	3,9
21	3,9	3,1	-	0,50	1,09	3,9
22	3,8	1,3	0,5	0,50	0,97	3,8
23	3,9	1,1	-	0,50	1,25	3,9
24	4,6	0,4	0,1	0,30	1,25	4,6
25	3,2	4,8	3,1	0,30	1,29	3,2
26	4,1	0,8	0,3	0,50	1,16	4,1
27	3,7	1,8	0,9	0,30	1,44	3,7
28	3,0	8,5	5,9	0,30	1,08	3,0
29	3,5	3,2	1,0	0,30	0,87	3,5
30	2,7	18,0	11,7	0,39	0,93	2,7
31	4,5	0,3	0,1	0,34	1,05	4,5
32	3,9	1,3	0,7	0,30	1,07	3,9
33	3,9	11,1	7,3	0,30	1,05	3,9
34	4,5	0,5	0,2	0,73	1,03	4,5
35	4,6	0,3	0,1	0,30	1,01	4,6
36	4,0	0,6	0,2	0,30	0,93	4,0
37	3,7	3,1	1,0	0,38	1,55	3,7
38	2,4	13,1	9,4	0,30	1,20	2,4
39	3,1	19,1	13,5	0,30	1,26	3,1

Valores de Referência: Albumina : 3,4 - 4,8 g/dl; Bilirrubina total - 0,3 - 1,2 mg/dl;
Bilirrubina direta até 0,2 mg/dl; Creatinina - 0,6 - 1,1 mg/d

ANEXO 17

Grelina total, acilada e desacilada, leptina, insulina e glicose

Caso	Grelina Total (pg/ml)	Grelina Acilada (pg/ml)	Grelina Desacilada (pg/ml)	Leptina (ng/ml)	Insulina (µU/ml)	Glicose (mg/dl)
1	983,8	132,9	850,9	1,5	20,8	95,0
2	977,6	176,9	800,7	2,3	13,5	64,0
3	777,5	95,7	681,8	1,6	12,8	72,0
4	895,9	138,3	757,6	1,3	10,6	74,0
5	867,3	239,5	627,8	1,4	14,1	86,0
6	814,2	170,0	644,1	2,5	9,0	85,0
7	1324,3	279,3	1045,0	1,5	13,6	73,0
8	930,0	63,3	866,7	0,2	56,4	70,0
9	391,7	83,0	308,7	3,2	14,2	94,0
10	2306,7	245,1	2061,5	1,2	14,4	82,0
11	1943,1	488,8	1454,4	1,2	9,0	99,0
12	595,3	66,5	528,8	1,8	9,0	75,0
13	592,5	122,9	469,6	1,1	9,0	75,0
14	399,5	40,4	359,2	1,5	16,3	89,0
15	4451,5	277,6	4173,9	1,1	15,2	72,0
16	475,4	110,7	364,8	10,6	24,5	82,0
17	725,1	437,5	287,6	2,3	13,5	76,0
18	919,4	137,9	781,5	0,8	43,0	119,0
19	1530,4	68,8	1461,6	0,3	23,2	113,0
20	907,5	46,4	861,1	4,4	54,3	138,0
21	833,5	93,4	740,1	4,5	15,9	97,0
22	1304,1	280,2	1023,9	1,6	17,1	102,0
23	1063,5	171,0	892,6	9,7	28,2	93,0
24	1496,6	370,7	1125,9	4,0	17,0	94,0
25	1447,4	119,9	1327,5	1,0	93,6	98,0
26	706,6	77,7	628,9	0,8	13,8	105,0
27	900,9	125,8	775,1	0,5	30,0	82,0
28	718,1	144,5	573,6	6,9	29,8	72,0
29	664,0	106,0	558,1	0,3	42,6	74,0
30	1432,5	414,0	1018,5	1,9	31,1	72,0
31	784,3	159,5	624,8	3,7	56,0	96,0
32	1218,0	196,8	1021,2	2,2	36,0	76,0
33	1212,5	246,1	966,3	5,6	28,7	77,0
34	890,9	76,1	814,8	4,2	116,6	96,0
35	1481,9	410,2	1071,8	3,1	26,3	79,0
36	3542,1	819,5	2722,7	3,5	11,8	72,0
37	907,5	87,9	819,6	0,7	26,5	76,0
38	2908,6	575,5	2333,1	1,6	26,3	77,0
39	755,3	142,3	613,0	3,0	17,4	78,0