MARCIO CORRÊA MANCINI

**Perfil de secreção de hormônio de crescimento e
ghrelina antes e após cirurgia bariátrica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Halpern

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mancini, Marcio Corrêa

**Perfil de secreção de hormônio de crescimento e ghrelina antes e após
cirurgia bariátrica** / Marcio Corrêa Mancini. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientador: Alfredo Halpern.

Descritores: 1.HORMÔNIO DO CRESCIMENTO/secreção
2.PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DO SISTEMA DIGESTÓRIO/classificação
3.DERIVAÇÃO GÁSTRICA/métodos 4.ANASTOMOSE EM Y-DE-ROUX/
métodos 5.OBESIDADE MÓRBIDA/cirurgia 6.ANTROPOMETRIA/métodos

USP/FM/SBD-147/05

*Aos meus pais
Peppino e Elza,
pelo amor e devoção*

AGRADECIMENTOS

Nunca poderei manifestar plenamente meu reconhecimento por Alfredo. Obrigado pela confiança depositada, pelos tantos projetos e manuscritos compartilhados, pela valiosa orientação, pela crença zelosa nesta tese e neste orientando, pelos ensinamentos passados como médico e como pessoa, e pela grande amizade e simbiose que partilhamos.

Quero exprimir também imensa gratidão a uma pessoa que admiro pela objetividade, pela organização, pelo talento e pela didática, minha amiga Cíntia, cujas poucas palavras num corredor do hospital deram luz a este projeto, bem como ao Adriano, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo companheirismo.

Meus agradecimentos se estendem à Ana Paula, pela generosa ajuda.

Estou grato a Margaret e César Luis Boguszewski, a Luiz Roberto Salgado e a Herlon Saraiva Martins pela cordialidade franca dificilmente observada nos dias atuais e pela disponibilidade e interesse sincero em colaborar com o projeto.

Estou igualmente agradecido a José Gilberto Henriques Vieira, Omar Magid Hauache e colegas do Laboratório Fleury, e também a Marcelo Cidade Batista, Daniel Giannella Neto e Dalva Marreiro Rocha pelo auxílio nos procedimentos, dosagens e interpretação das dosagens laboratoriais, pelas preciosas informações, apoio técnico, interesse e atenção depositados.

Da mesma forma, desejo agradecer a Bernardo Liberman e Mirta Knoepfelmacher pelas considerações, idéias, conselhos e críticas que colaboraram para a construção deste projeto.

Agradeço de coração a Sten Rosberg e Kerstin Albertsson-Wikland, colegas do Centro de Pesquisa em Hormônio de Crescimento da Universidade de Gotemburgo, pelas minuciosas análises dos perfis de GH; a Sandra e João Villares, pelos ensinamentos e apoio técnico durante as incontáveis horas compartilhadas no IML e no criostato do Laboratório de Psicobiologia da UNIFESP, seccionando hipotálamos no projeto inicial de tese; a Giselle Antoun, pelo auxílio no levantamento bibliográfico; a Flávia Libanori, pela cuidadosa revisão do texto e a Isac Castro, pelas análises estatísticas iniciais.

Meu reconhecimento se aplica ainda aos meus filhos e aos meus irmãos; especialmente à minha irmã Maria Elisa, médica, que me introduziu no campo da Medicina.

Finalmente, seria imperdoável não mencionar a pessoa maravilhosa que tocou a minha vida e que irradia permanentemente alegria e inspirações, Maria Edna, Mulher amada e talentosa, que colaborou de corpo e alma com o seu amparo físico e emocional, mas também com suas críticas oportunas, revisões, conselhos e sugestões perspicazes, para a conclusão desta obra.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	GH E GHRELINA	5
1.2	GH E OBESIDADE.....	8
1.3	GHRELINA E OBESIDADE.....	12
2	OBJETIVOS	15
3	MÉTODOS	17
3.1	MODELO DO ESTUDO E CRITÉRIOS DE SELEÇÃO	18
3.2	VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS	20
3.2.1	Medida do peso corporal, estatura e IMC	20
3.2.2	Medida da circunferência abdominal	20
3.2.3	Determinação da gordura corporal	21
3.3	VARIÁVEIS METABÓLICAS E HORMONAIS	21
3.3.1	Dosagem de glicemia de jejum.....	21
3.3.2	Dosagem de insulina.....	21
3.3.3	Cálculo do HOMA-IR	22
3.3.4	Taxa metabólica de repouso	22
3.3.5	Dosagem de GH	22
3.3.6	Dosagem de IGF-I	24
3.3.7	Dosagem de IGFBP-3.....	24
3.3.8	Dosagem de ghrelina	24
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4	RESULTADOS.....	26
4.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASAIS	27
4.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PÓS-CIRURGIA	27
4.3	PERFIL DE SECREÇÃO DE GH BASAL	28
4.4	PERFIL DE SECREÇÃO DE GH PÓS-CIRURGIA.....	28
4.5	IGF-I E IGFBP-3 BASAL E PÓS-CIRURGIA	34
4.6	PERFIL DE SECREÇÃO DE GHRELINA PRÉ E PÓS-CIRURGIA	34
4.7	DADOS BIOQUÍMICOS BASAIS E PÓS-CIRURGIA	35
4.8	RELAÇÃO ENTRE SECREÇÃO DE GH E VARIÁVEIS CLÍNICAS E METABÓLICAS	36
4.9	RELAÇÃO ENTRE GHRELINA E VARIÁVEIS CLÍNICAS E METABÓLICAS	41
4.10	RESULTADOS INDIVIDUAIS DE TODAS AS PACIENTES E OUTROS RESULTADOS.....	41
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÕES	60
7	ANEXOS	62
8	REFERÊNCIAS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AUC	área sob a curva
AUC _b	área sob a curva acima do valor basal
BPG	gastroplastia vertical com derivação gastrojejunal em Y-de-Roux ou derivação gástrica ou “bypass” gástrico
BP	proteína ligadora
CA	circunferência abdominal
DEXA	absorciometria por dupla emissão de raios X
DP	desvio(s)-padrão
EDTA	ácido diaminotetracético
GH	hormônio de crescimento
GHBP	proteína ligadora de hormônio de crescimento
GHRH	hormônio liberador de hormônio de crescimento
GHRP	peptídeo liberador de hormônio de crescimento
HOMA-IR	cálculo do modelo de homeostase ou “homeostasis model assesment”
icv	intracerebroventricular
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína ligadora do fator de crescimento semelhante à insulina
IMC	índice de massa corpórea
IRMA	método imunorradiométrico
MA	massa adiposa
MM	massa magra
NPY	neuropeptídeo Y
RIA	radioimunoensaio
SS	somatostatina
TMR	taxa metabólica de repouso

RESUMO

Mancini MC. *Perfil de secreção de hormônio de crescimento e ghrelina antes e após cirurgia bariátrica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 100p.

INTRODUÇÃO: A secreção do hormônio de crescimento (GH) está diminuída em obesos. Existem controvérsias se esta diminuição é consequência ou um dos fatores causais da obesidade. Perda de peso leva a alguma recuperação da secreção de GH. Não há estudos publicados sobre o efeito da derivação gástrica (gastrojejunal) com anastomose em Y-de-Roux (BPG) sobre o perfil de secreção de 24 h de GH. Por outro lado, a ghrelina é um peptídeo secretagogo de GH produzido no estômago, orexigênico, lipogênico e adipogênico, cujos níveis oscilam ao longo do dia e estão diminuídos na obesidade. As variações circadianas de ghrelina têm papel no controle da homeostase energética e secreção de GH. O nível de ghrelina eleva-se com perda de peso induzida por dieta, mas os dados são controversos sobre mudanças desses níveis após cirurgias bariátricas. Este estudo tem por objetivo caracterizar os perfis de secreção de GH e ghrelina em mulheres com obesidade grau III antes e após BPG e suas correlações com variáveis metabólicas. **MÉTODOS:** Coletas de sangue a cada 20 minutos por 24 horas foram realizadas em obesas mórbidas não diabéticas na pré-menopausa antes e seis meses após BPG. O procedimento foi realizado em balanço calórico neutro por quatro dias. Foram dosados glicose e insulina; GH em todas as amostras e ghrelina às 08:00h, 10:00h, 12:00h, 19:00h e 02:00h. A taxa metabólica de repouso (TMR) foi avaliada por calorimetria indireta e as massas adiposa (MA) e magra (MM) foram medidas por DEXA. **RESULTADOS:** Houve uma redução de 27% do peso corporal e IMC (de $55,9 \pm 6,2 \text{ kg/m}^2$ para $40,7 \pm 5,8 \text{ kg/m}^2$, $p < 0,001$) com elevação de vários parâmetros de secreção de GH (GH basal, GH médio, $p < 0,05$; área, amplitude e número de picos, $p \leq 0,001$); redução de glicemia ($p = 0,03$), insulinemia de jejum ($p = 0,005$) e HOMA ($p = 0,004$). Não houve diferença nos níveis de ghrelina basal, pós-prandial e médio. O GH médio apresentou correlação negativa com as mudanças no peso ($p = 0,003$; $r = -0,631$), IMC ($p < 0,001$; $r = -0,731$), MA ($p = 0,003$; $r = -0,635$), MM ($p = 0,02$; $r = -0,507$), circunferência abdominal ($p = 0,01$; $r = -0,555$), TMR ($p = 0,01$; $r = -0,539$), insulina de jejum ($p = 0,014$, $r = -0,538$) e HOMA ($p = 0,01$; $r = -0,560$), mas não com a glicemia de jejum ($p = 0,13$; $r = -0,354$) e a ghrelina ($p = 0,6$; $r = 0,118$). O melhor determinante da secreção de GH foi o IMC sendo responsável por 54% da variação do GH médio ($r^2 = 0,54$). **CONCLUSÕES:** Há uma recuperação parcial da secreção de GH, reduzida no pré-operatório em obesas mórbidas, após perda de peso induzida seis meses após a cirurgia, indicando que a secreção reduzida não é um fator primário ou causal da obesidade, mas sim uma consequência da obesidade e essa recuperação é independente do perfil de secreção de ghrelina.

Descritores: 1.HORMÔNIO DO CRESCIMENTO/secreção 2.PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DO SISTEMA DIGESTÓRIO/classificação 3.DERIVAÇÃO GÁSTRICA/métodos 4. ANASTOMOSE EM Y-DE-ROUX/métodos 5.OBESIDADE MÓRBIDA/cirurgia 6.ANTROPOMETRIA/métodos

SUMMARY

Mancini MC. *Secretory profile of growth hormone and ghrelin before and after bariatric surgery* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 100p.

INTRODUCTION: Growth hormone (GH) concentration is decreased in obesity. It is not clear if reduced GH secretion is consequence or cause of the obese state. GH secretion is partially restored by weight loss. There are no published studies about the effect of Roux-en-Y gastric bypass (RYGBP) on GH secretory profile. Ghrelin is a GH releasing peptide produced by stomach, with orexigenic, lipogenic and adipogenic actions. Ghrelin levels oscillate throughout the day and are low in obesity. Circadian changes in ghrelin levels have a role both in energy homeostasis control and GH secretion. Ghrelin levels rise after diet-induced weight loss, but results are controverse in relation to changes in ghrelin levels after bariatric surgeries. In this study, we analyzed GH and ghrelin concentrations in morbidly obese women before and after RYGBP and its relationships with metabolic parameters. **METHODS:** Blood was sampled at 20-minute intervals during 24 hours in non diabetic pre-menopausal morbid obese women before and six months after RYGBP. The study was done after four days in neutral caloric balance. Fasting glucose and insulin were determined in basal samples. GH concentrations were measured in all samples and ghrelin in serum collected at 08:00h, 10:00h, 12:00h, 19:00h e 02:00h. Resting metabolic rate (RMR) was evaluated by indirect calorimetry and fat mass (FM) and free-fat mass (FFM) were measured by DEXA. **RESULTS:** A 27% drop in body weight and BMI ($55.9 \pm 6.2 \text{ kg/m}^2$ to $40.7 \pm 5.8 \text{ kg/m}^2$, $p < 0.001$), augmentation of spontaneous GH secretory episodes (basal and mean levels, $p < 0.05$; area, amplitude and peak frequency, $p \leq 0.001$); and reduction of fasting glucose ($p = 0.03$), insulinemia ($p = 0.005$) and HOMA ($p = 0.004$) were observed. Neither basal, post-prandial or mean ghrelin were changed. A negative correlation was found between mean GH levels and weight changes ($p = 0.003$, $r = -0.631$), BMI ($p < 0.001$, $r = -0.731$), FM ($p = 0.003$, $r = -0.635$), FFM ($p = 0.02$, $r = -0.507$), waist ($p = 0.01$, $r = -0.555$), RMR ($p = 0.01$, $p = -0.539$), fasting insulin ($p = 0.014$, $r = -0.538$), as well as HOMA ($p = 0.01$, $r = -0.560$), but not between mean GH levels and glucose ($p = 0.13$, $r = -0.354$) or ghrelin ($p = 0.6$, $r = 0.118$). BMI accounted for 54% of the mean GH variation ($r^2 = 0.54$). **CONCLUSIONS:** There is a partial recovery of GH secretion after weight loss induced by RYGBP, suggesting that a blunted secretion is not a primary or causal factor of obesity, but a consequence of the obese state. This recovery is independent of ghrelin secretory profile.

Descriptors: 1.GROWTH HORMONE/secretion 2.DIGESTIVE SYSTEM SURGICAL PROCEDURES/classification 3.GASTRIC BYPASS/methods 4. ANASTOMOSIS, ROUX-EN-Y/methods 5.MORBID OBESITY/surgery 6.ANTHROPOMETRY/ methods

1 INTRODUÇÃO

A somatotrofina ou hormônio de crescimento (GH) é um polipeptídeo não glicosilado com algumas variantes, das quais as duas mais abundantes apresentam 22 kDa e 20 kDa^(1;2). O GH é fundamental para o crescimento linear e interfere no metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas, água e eletrólitos⁽³⁾.

A análise de amostras de sangue colhidas durante 24 h em indivíduos saudáveis mostra que a secreção de GH é pulsátil, apresentando de 10 a 20 picos por dia. Nos intervalos entre os picos o GH é indetectável em uma quantidade considerável das amostras.

A secreção de GH é aumentada na circulação fetal, com picos de aproximadamente 150 ng/ml no segundo trimestre da gestação. O nível neonatal é menor, aproximadamente 30 ng/ml e é ainda menor na infância, aproximadamente 7 ng/ml. Na puberdade há um aumento da secreção de GH, caracterizada por um aumento da amplitude, mas sem alteração da frequência de pulsos. As amplitudes dos pulsos de GH diminuem a partir do fim da puberdade, sendo que os níveis de GH no adulto correspondem a cerca de 15% dos níveis puberais⁽⁴⁾.

A secreção de GH pelos somatotrofos é regulada por um complexo sistema de controle neuroendócrino. Existem dois reguladores hipotalâmicos principais: o hormônio liberador de GH (GHRH) e a somatostatina (SS), que sofrem regulação por outros peptídeos hipotalâmicos e por influências metabólicas e endócrinas. O GHRH exerce influências estimulatórias da síntese e da liberação de GH, enquanto que a SS

inibe a liberação, mas não a síntese de GH pela célula somatotrófica. O pico de uma liberação episódica de GH reflete estímulo apropriado (como a secreção endógena de GHRH, com ou sem outros secretagogos) no contexto de células somatotróficas responsivas (ou seja, que não estejam inibidas ao máximo pela SS) e estoques liberáveis de GH na hipófise anterior⁽⁵⁾.

O principal mediador tissular do GH é o fator de crescimento símile à insulina-I (IGF-I), que juntamente com o IGF-II pode induzir uma retroalimentação negativa para o GH diretamente na hipófise e no hipotálamo^(6,7). O IGF-I tem participação no funcionamento e no crescimento de virtualmente todos os órgãos, e é sintetizado primariamente no fígado, muito embora seja produzido em outros sítios do corpo humano⁽⁸⁾. O IGF-I apresenta semelhança estrutural com IGF-II e insulina, com a qual tem em comum 60% dos aminoácidos. No entanto, diferentemente da insulina, que circula em concentração picomolar e tem meia-vida curta, os IGF-I e -II circulam em concentração nanomolar e têm meia-vida muito mais longa, porque a maior parte deles está ligada a proteínas ligadoras (BPs), das quais seis foram caracterizadas. Após o nascimento, a principal função do IGF-I é a regulação do crescimento, enquanto que a função do IGF-II ainda é desconhecida⁽⁹⁾.

Essas BPs, do mesmo modo que os IGFs, são sintetizadas pela maioria dos tecidos. As BPs circulantes modulam a atividade dos IGFs limitando seu acesso e disponibilidade a tecidos e receptores específicos. A IGFBP-3 liga-se a mais que 95% dos IGFs circulantes, formando um complexo ternário com a subunidade ácido-lábil, que tem uma meia-vida sérica de muitas horas. Uma vez liberado desse complexo, o IGF pode atingir os tecidos-alvo com a ajuda de outra BP⁽⁸⁾.

Além da neuroregulação exercida pelo próprio GH, pelo GHRH, pela SS e pelos IGFs, outras substâncias, como neurotransmissores, nutrientes e hormônios também influenciam a secreção de GH.

Entre os vários neurotransmissores que modulam a secreção de GH, as evidências de influências mais importantes recaem sobre a acetilcolina, que ativa a secreção de GH através das vias muscarínicas colinérgicas^(10;11). As catecolaminas causam liberação de GH quando agonistas dopaminérgicos são administrados agudamente⁽¹²⁾, e também após estimulação de receptores adrenérgicos α_2 ou antagonismo de receptores adrenérgicos α_1 ⁽¹³⁻¹⁵⁾, havendo, porém, um efeito inibitório mediado pelos receptores adrenérgicos β ⁽⁶⁾. Evidências menos persuasivas apontam para um papel facilitador da liberação de GH através de vias reguladas pelo receptor subtipo 1D da serotonina⁽¹⁶⁾, pelo receptor seletivo H3 da histamina⁽¹⁷⁻²²⁾ e pelo ácido γ -aminobutírico⁽²³⁻²⁷⁾. Neurotransmissores envolvidos na homeostase energética, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a galanina também estão presentes em vias neuronais reguladoras da secreção do GH^(28;29). Foi observada expressão do receptor de GH em neurônios que secretam NPY no núcleo arqueado (onde o GHRH ocorre em elevada concentração)⁽³⁰⁾, no hipotálamo anterior e nos núcleos dorsomedial e ventromedial onde o GHRH colocaliza-se com neurônios que produzem NPY⁽³⁰⁾ e galanina⁽³¹⁾, podendo ainda ser detectado no plasma e no duodeno⁽³²⁾.

Nutrientes como glicose, aminoácidos e ácidos graxos livres podem participar da regulação da secreção de GH. Em humanos, a hipoglicemia estimula a secreção de GH, sendo a hipoglicemia induzida pela insulina usada clinicamente como teste provocativo de liberação de GH em crianças e adultos⁽³³⁾. A administração de glicose, por sua vez, inibe a secreção de GH em humanos não

diabéticos, embora depois ocorra uma liberação rebote⁽³⁴⁾. Aminoácidos são poderosos estimuladores da secreção de GH, seja através de administração parenteral, seja no contexto de uma refeição rica em proteínas⁽³⁵⁾. Os ácidos graxos não esterificados destacam-se entre os fatores periféricos controladores da secreção de GH. A redução farmacológica de ácidos graxos circulantes promove elevação do GH⁽³⁶⁾, enquanto que a administração de ácidos graxos de cadeia média leva à redução da secreção de GH e abole a resposta de GH a vários estímulos⁽³⁷⁻³⁹⁾.

1.1 GH E GHRELINA

Oligopeptídeos sintéticos com alto poder de liberação de GH foram desenvolvidos em laboratório há cerca de 25 anos, como derivados da encefalina⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ e como análogos não peptídicos⁽⁴³⁻⁴⁶⁾. Acreditava-se que esses peptídeos liberadores de GH (GHRP) funcionassem de maneira semelhante a moléculas efetoras endógenas de estrutura e identidade ainda não conhecidas àquela época, uma vez que a liberação de GH ocorre proporcionalmente à dose em várias espécies animais, via receptores específicos, àquela ocasião ainda órfãos, expressos no hipotálamo e na hipófise^(42;47). Além disso, a administração crônica de GHRP a roedores, cães ou humanos promove, além da secreção de GH, aumento do peso corporal e das concentrações de IGF-I e IGFBP-3⁽⁴⁸⁻⁵³⁾.

O mecanismo de ação dos GHRP mostra-se independente do GHRH, já que os efeitos dos dois sobre a liberação de GH são sinérgicos^(42;54). A quantidade de GH liberado após a administração de GHRP é muito maior do que a secretada após a

administração de GHRH^(55;56). GHRP, em combinação com GHRH ou L-arginina provoca liberação de GH em humanos idosos⁽⁵⁷⁾ e em obesos⁽⁵⁸⁾. Além do efeito liberador de GH, os GHRPs, após infusão intracerebroventricular (icv) em roedores, estimulam a ingestão de alimento⁽⁵⁹⁾, possivelmente por aumentarem a atividade eletrofisiológica no núcleo arqueado e ativarem a transcrição de NPY^(60;61). Dois receptores de GHRP foram identificados: o receptor tipo 1a e o 1b, sendo este biologicamente inativo⁽⁶²⁻⁶⁸⁾.

A ghrelina, que foi identificada em 1999 por Kojima et al⁽⁶⁹⁾, é um ligante efetor fisiológico do receptor tipo 1a. A ghrelina é encontrada no trato gastrointestinal, com maior concentração no fundo gástrico, onde é produzida por um tipo particular de células endócrinas chamadas de X/A-símile localizadas nas glândulas oxínticas produtoras de ácido⁽⁷⁰⁾. Embora a maior parte da ghrelina seja produzida no estômago, ela pode ser encontrada em menor quantidade no duodeno, e em quantidade bem menor em outros tecidos, incluindo hipófise, pulmão, pâncreas, vesícula biliar, esôfago, cólon, fígado, baço, tireóide e coração⁽⁷¹⁻⁷³⁾. A função fisiológica da ghrelina derivada das fontes não gastrintestinais é pouco compreendida.

É possível que a ghrelina possa interagir com outros subtipos de receptores de GHRP ainda não identificados. A ausência de um ligante conhecido do receptor de GHRP tipo 1b sugere a existência de outra molécula endógena ainda desconhecida que module a via sinalizadora desse receptor⁽⁷⁴⁾. O receptor tipo 1a é mais abundante na hipófise e detectado em quantidade menor na tireóide, pâncreas, baço, coração e adrenais, contrastando com o receptor tipo 1b, achado mais comumente na pele, miocárdio e hipófise, com uma distribuição periférica semelhante à da ghrelina^(75;76).

O efeito da ghrelina sobre a secreção de GH pelas células somatotróficas é específico, potente, dependente da dose e sinérgico com o GHRH^(70;77-80), como previamente observado em relação ao efeito de outros GHRPs^(42;54-56). Alvarez-Castro et al.⁽⁸¹⁾ compararam a resposta de GH ao GHRH, à ghrelina e a ambos em seis mulheres com obesidade grau II e em seis mulheres com peso normal. Após administração de GHRH, ghrelina, e GHRH e ghrelina, as pacientes do grupo controle apresentaram picos, respectivamente, de 25; 69 e 118 ng/ml, enquanto que nas pacientes obesas, os picos foram, respectivamente, de 2,4; 24 e 40 ng/ml. Os autores observaram que a resposta marcadamente reduzida a GHRH nas obesas contrasta com a resposta apenas atenuada à ghrelina isolada ou associada a GHRH e formularam a hipótese de que a secreção alterada de ghrelina pode ter um papel importante na secreção diminuída de GH na obesidade. Poykko et al.⁽⁸²⁾ avaliaram as concentrações de ghrelina e IGF-I em mil indivíduos adultos com graus variados de adiposidade e resistência à insulina e observaram que os níveis de IGF-I apresentaram associação negativa com a ghrelina, e que a associação foi menor em indivíduos não resistentes à insulina ($r^2 = 0,065$) e maior em homens no tercil superior de IMC em indivíduos com resistência à insulina ($r^2 = 0,21$), e principalmente com diabetes melito tipo 2 ($r^2 = 0,25$) sugerindo um papel para a ghrelinemia no desenvolvimento de alterações da secreção de GH.

A ghrelina estimula a liberação de GH em células hipofisárias isoladas *in vitro*⁽⁶⁹⁾ e também estimula a liberação de outros hormônios, como hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol, aldosterona, prolactina e adrenalina, não afetando os níveis de gonadotrofinas ou a liberação de hormônio tireotrófico *in vivo*^(83;84).

1.2 GH E OBESIDADE

A secreção de GH está diminuída na obesidade, sendo esta um dos estados de hipossomatotrofismo mais comuns. É controverso se essa alteração é devida à própria obesidade (ou a um consumo energético excessivo frequentemente associado a ela) ou se representa um distúrbio neuroendócrino envolvido no desencadeamento da obesidade⁽⁸⁾. Não está estabelecido, também, se o comprometimento da secreção de GH correlaciona-se com o excesso de gordura total ou mais especificamente com o excesso de gordura visceral.

Sabe-se que o GH promove lipólise, e parece exercer um papel importante na manutenção de uma composição corporal normal na vida adulta⁽⁸⁵⁾. Indivíduos com deficiência relativa e absoluta de GH apresentam aumento marcante da gordura corporal total (que acumula-se preferencialmente em depósitos viscerais) e redução de massa muscular, alterações estas que são corrigidas com a administração de GH. Por outro lado, pacientes com acromegalia apresentam redução da massa adiposa⁽⁸⁾.

A obesidade, algumas manifestações do envelhecimento e outros estados associados a hipossomatotrofismo podem, em parte, ser atribuídos à diminuição da massa de eclosões secretórias de GH⁽⁸⁾. Nos homens, parece que os níveis de GH não se correlacionam com os níveis de testosterona livre⁽⁸⁶⁾. Já nas mulheres, são correlacionados com a concentração de estradiol livre, que parece amplificar a regulação neuroendócrina da liberação de GH, influenciando sua secreção⁽⁸⁷⁾.

Inúmeros estudos descreveram, em indivíduos obesos, uma redução considerável de níveis plasmáticos basais de GH, bem como uma liberação diminuída de GH após estímulos provocativos⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾, incluindo o GHRH

exógeno^(92;93). A redução da secreção basal de GH na obesidade é atribuída em parte à diminuição da produção e da meia-vida do GH^(94;95). Porém, esses mesmos estudos são controversos em relação à diminuição ou não do número de picos de GH no ritmo de 24 h.

Os estudos também apresentam controvérsias em relação ao nível plasmático de IGF-I, que pode estar normal, baixo ou elevado⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾ e ao nível plasmático de IGFBP-3, que pode estar normal ou elevado^(99;100) em indivíduos obesos. Não obstante, alterações agudas e crônicas do estado nutricional podem afetar de modo marcante as concentrações de IGF-I em indivíduos normais. Jejum prolongado e restrições proteico-calóricas, por exemplo, causam graus variados de resistência ao GH, com conseqüente redução da produção hepática de IGF-I^(9;101-104). Como obesos freqüentemente fazem dietas restritivas e/ou apresentam consumos calóricos exagerados, faz sentido esperar que resultados variáveis em relação aos níveis de IGF-I possam ser verificados.

Para tentar explicar os valores normais ou elevados de IGF-I, um marcador da bioatividade do GH, na obesidade, foi sugerida e documentada a existência de um aumento da responsividade periférica ao mesmo^(105;106). De fato, o nível circulante da proteína ligadora de GH (GHBP), que corresponde ao domínio extracelular do receptor de GH e tem sido usada como medida indireta do número de receptores de GH⁽¹⁰⁷⁾, está elevado na obesidade⁽¹⁰⁸⁾.

Boa parte das anormalidades metabólicas da obesidade é revertida ou atenuada pela reposição de GH, fazendo alguns autores postularem que a deficiência de GH explica parte das anormalidades metabólicas da obesidade humana^(104;109-111).

Não fica claro se o hipossomatotrofismo associado à obesidade é fundamental na deposição de gordura visceral (como fator causal) ou simplesmente exacerba essa deposição, se considerarmos os efeitos metabólicos do GH e as características dos pacientes com deficiência do mesmo.

Poucos estudos avaliaram o ritmo de GH em obesos, particularmente após restrição calórica. Riedel et al., em 1995⁽¹⁰⁴⁾ estudaram o ritmo de GH em magros e obesos antes e depois de jejum de 96 h, demonstrando que a secreção de 24 h de GH aumentou após o jejum apenas no grupo não obeso. Por outro lado, não houve diferenças no nível do IGF-I nem da IGFBP-3, quando comparados os grupos de obesos e não obesos antes e depois do jejum.

Rasmussen et al., em 1995⁽⁸⁵⁾ avaliaram o ritmo de GH, os níveis plasmáticos de IGF-I, IGFBP-3 e GH urinário de 24 h, bem como a resposta de GH à hipoglicemia induzida por insulina e à L-arginina em nove obesos com IMC médio de 38,5 kg/m². Submeteu-os a uma dieta hipocalórica líquida e repetiu a avaliação após perda de aproximadamente 30 kg (IMC médio de 27,8 kg/m²). O grupo de pacientes obesos apresentou, num primeiro momento, redução da liberação de GH, da resposta de GH a testes provocativos e do nível de IGF-I quando comparado com o grupo não obeso, enquanto que o nível de IGFBP-3 foi similar em obesos e não obesos. As alterações, nos obesos, normalizaram-se após o emagrecimento, particularmente a relação molar entre IGF-I e IGFBP-3, diminuída nos pacientes obesos retornou ao normal após a perda de peso, mas a IGFBP-3 não se alterou com o emagrecimento. Os autores sugeriram, então, que o hipossomatotrofismo é uma alteração transitória da obesidade e não um defeito pré-existente.

Estes resultados estão em concordância com outros estudos que demonstraram que a perda de peso pode corrigir a liberação reduzida de GH em obesos, sugerindo que esta alteração decorre do excesso de peso; não é causa do acúmulo de gordura corporal^(93;112-113).

Por outro lado, Pijl et al.,⁽¹¹⁴⁾ estudando 15 mulheres com obesidade grau II na pré-menopausa (sendo 7 mulheres com relação abdômen-quadril $<0,80$ e 8 mulheres com relação abdômen-quadril $>0,95$), observaram uma redução dos parâmetros de secreção de GH de 24 h apenas nas mulheres com obesidade predominantemente visceral. Além disso, não verificaram elevação da secreção de GH após perda de 50% do excesso ponderal no grupo com acúmulo de gordura visceral, sugerindo que a insuficiência somatotrófica da obesidade é um fator primário, podendo estar relacionado à deposição preferencial de gordura no abdômen.

De Marinis et al.⁽¹¹⁵⁾ estudaram a resposta de GH ao GHRH em mulheres obesas na pré-menopausa antes e cerca de 20 meses após cirurgia de derivação biliopancreática. Após a cirurgia, a despeito de uma elevação na resposta de GH ao GHRH, os níveis de IGF-I e de IGFBP-3 (que já apresentavam-se reduzidos em relação aos controles normais) permaneceram inalterados, sugerindo uma redução de sensibilidade periférica ao GH.

Assim, o estudo do padrão de secreção espontânea de GH na obesidade reveste-se de grande importância, uma vez que a manutenção de uma liberação reduzida poderia contribuir para a perpetuação da obesidade e ter efeitos potenciais na distribuição de gordura corporal, devido a um estado lipolítico diminuído, a uma facilitação do depósito de triglicérides em células adiposas viscerais e a uma redução na massa magra.

Por outro lado, nenhum estudo avaliou a secreção de GH de 24 horas, correlacionando-a com variáveis antropométricas e hormonais antes e após perda de peso com cirurgia bariátrica em pacientes portadoras de obesidade grau III (obesidade mórbida).

1.3 GHRELINA E OBESIDADE

O mecanismo neuroregulatório exato da relação inversa entre massa de gordura e secreção de GH não está completamente compreendido, mas a descoberta da ghrelina deu origem a várias hipóteses plausíveis.

A ação neuroendócrina da ghrelina sobre outros hormônios (ACTH, cortisol, aldosterona, adrenalina, etc.)^(79;83;84), pode ser interpretada, do ponto de vista evolucionário, como uma resposta adaptativa fisiológica a serviço da sobrevivência. Durante períodos de escassez de comida e agressão ambiental, a liberação de ghrelina e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, ativando hormônios contrarreguladores para mobilização de substrato, teriam como objetivo defender o indivíduo e restaurar o balanço energético. Em ratos, a ghrelina tem sido implicada em atividades ligadas a geração de ansiedade e à retenção de memória^(116;117), associadas à habilidade de processar e memorizar experiências prévias relacionadas à busca e consumo de alimentos. Em concordância com essas informações, sítios de ligação da ghrelina foram detectados no hipocampo, indicando que os mecanismos de aprendizado, memória e geração de ansiedade podem estar ligados aos papéis da ghrelina nas respostas neuroendócrinas ao estresse e ao comportamento alimentar⁽¹¹⁸⁾.

A ghrelina tem importantes propriedades orexigênicas e adipogênicas, oferecendo sinais ao hipotálamo quando um aumento dos substratos metabólicos é necessário. A presença da ghrelina e do seu receptor no núcleo arqueado do hipotálamo sugere que a ghrelina tenha ação central regulando a ingestão de alimentos^(74;75). A injeção icv de ghrelina é um potente estímulo à alimentação, enquanto que anticorpos anti-ghrelina reduzem a alimentação de ratos⁽¹¹⁹⁾. Além disso, tanto a ingestão, quanto o peso corporal aumentam proporcionalmente à dose administrada de ghrelina^(120;121), e esse aumento independe do GH⁽¹²²⁾. A administração intravenosa (iv) de ghrelina estimula a fome e a ingestão de alimento em voluntários saudáveis^(123;124). O aumento pré-prandial e a queda pós-prandial da ghrelina plasmática dão suporte à teoria de que a ghrelina é um iniciador fisiológico da refeição em humanos^(125;126), sendo essa supressão pós-prandial da ghrelina defeituosa em indivíduos obesos⁽¹²⁷⁾. Apesar dessas observações, o mecanismo pelo qual a alimentação promove a redução dos níveis de ghrelina não foi ainda totalmente elucidado. Observações iniciais de que a administração periférica de insulina e glicose não suprimiu os níveis de ghrelina⁽¹²⁸⁾, levaram alguns autores a refutar um efeito regulador da insulina sobre os níveis de ghrelina⁽¹²⁹⁾. Porém, estudos com clamp euglicêmico hiperinsulinêmico demonstram dramática redução da ghrelina plasmática, que retorna ao seu nível basal após a suspensão da infusão⁽¹³⁰⁾, evidenciando uma interrelação fisiológica entre a ghrelina e a insulina, o que foi fortalecido por outros estudos^(131;132).

A ghrelina é suprimida na obesidade⁽¹³³⁾, elevada em transtornos alimentares como a anorexia nervosa e a bulimia nervosa⁽¹³⁴⁻¹³⁸⁾ e os seus níveis elevam-se como uma resposta adaptativa à perda de peso induzida por restrição calórica⁽¹³⁹⁾. Por outro

lado, neste mesmo estudo⁽¹³⁹⁾, Cummings et al. demonstraram, em um grupo de cinco pacientes submetidos a gastroplastia vertical com derivação gastrojejunal e reconstrução em Y-de-Roux (derivação gástrica ou “bypass” gástrico — BPG), que a ghrelina plasmática apresentou uma queda marcante e perdeu as oscilações relacionadas às refeições após a cirurgia, ao contrário do que sucedeu com pacientes obesos não operados que perderam peso com dieta hipocalórica, nos quais houve elevação dos níveis basais de ghrelina e oscilações ultradianas. Ressalte-se que, neste estudo, a ghrelinemia não foi dosada nesses cinco pacientes no período pré-operatório⁽¹³⁹⁾.

Outros trabalhos apresentam resultados controversos em relação à dosagem de ghrelina em pacientes submetidos a BPG, sendo documentadas elevação⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾, redução^(139;143-145) e manutenção dos seus níveis^(146;147). Em comparação com o BPG, níveis de ghrelina mais elevados foram documentados após operações bariátricas que conservam o contato direto do fundo gástrico com o alimento ingerido, como a banda gástrica de silicone ajustável^(145;146;148-150) e a derivação biliopancreática^(146;151;152), tendo estas diferenças sido atribuídas à integridade funcional do fundo gástrico⁽¹⁵³⁾.

Sumarizando, as publicações científicas sobre o ritmo circadiano de GH em obesos mórbidos e sua relação com o ritmo de ghrelina são escassas e contraditórias, razão pela qual realizamos nosso estudo.

Nossa hipótese é que a provável alteração do ritmo de GH em pacientes com obesidade mórbida possa ser pelo menos parcialmente corrigida após a cirurgia bariátrica, quer devido à redução parcial do excesso de peso, quer a possíveis mudanças na neurotransmissão advinda de modificações anatômico-funcionais pelo BPG. Nesse contexto, interessou-nos particularmente o papel da possível modificação no ritmo de ghrelina como responsável por essa provável recuperação, após o procedimento cirúrgico.

2 OBJETIVOS

O objetivo primário do estudo é caracterizar a secreção de GH de 24 h em mulheres obesas mórbidas na pré-menopausa, antes e após perda de peso induzida seis meses após a cirurgia.

O objetivo secundário do estudo é correlacionar uma possível modificação desse perfil após a cirurgia com variações do ritmo de ghrelina.

3 MÉTODOS

3.1 MODELO DO ESTUDO E CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

O estudo do eixo somatotrópico foi realizado através de uma análise de perfil longitudinal prospectiva, avaliando-se, particularmente, variáveis antropométricas e fatores metabólicos e bioquímicos.

O protocolo de pesquisa, bem como seu termo de consentimento informado, foram aprovados pelos Comitês de Ética do Departamento de Clínica Médica e pelo Comitê de Pesquisa do HC-FMUSP. As pacientes, que participaram de protocolo de pesquisa prévio⁽¹⁵⁴⁾, receberam informações sobre o novo protocolo e deram seu consentimento por escrito através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme as recomendações da Resolução Nº 196 de 10/10/1996, do Conselho Nacional de Saúde.

Foram estudadas, entre o segundo semestre do ano 1999 e o segundo semestre do ano 2000, 10 pacientes de 20 a 45 anos, com IMC ≥ 40 kg/m², eumenorréicas (ciclos menstruais regulares de 28 a 30 dias por pelo menos 3 meses anteriormente ao estudo) que foram eletivamente submetidas a cirurgia bariátrica com BPG, efetuada pelo mesmo cirurgião (Prof. Dr. Arthur B. Garrido Júnior) no HC-FMUSP. As pacientes foram avaliadas por uma psicóloga com experiência na área no sentido de excluir possíveis contraindicações psicológicas para a cirurgia.

Foram excluídas da avaliação as pacientes que tiveram variação de peso recente (>2 kg nos últimos 3 meses); doenças sistêmicas como hipertensão arterial, doença hepática, cardiovascular e/ou renal; doenças endócrinas que predispõem a obesidade; tabagismo; uso de medicações anorexígenas nos últimos três meses e glicemia de jejum ≥ 110 mg/dl.

As pacientes foram internadas por 4 dias, recebendo uma dieta balanceada com 30 kcal/kg de peso por dia em horários fixos de desjejum, almoço, jantar e lanche noturno (08:00 h, 12:00 h, 19:00 h, 22:00 h) sendo a porcentagem de calorias ingeridas respectivamente de 20%, 30%, 40%, 10% do total calórico diário. Nesses pacientes, a variação de peso foi inferior a 1 kg. Na coleta posterior à cirurgia, a dieta foi pastosa, mantendo a composição e densidade calórica (30 kcal/kg). A luz dos quartos foi apagada às 22:30 h.

No quarto dia, antes da coleta do ritmo de 24 h, foram realizadas as medidas antropométricas. A venopunção na região antecubital foi realizada às 07:00 h, mantendo-se a veia pérvia através de gotejamento de soro fisiológico. A partir das 08:00 h, uma coleta de 6 ml de sangue em tubo seco foi realizada a cada 20 minutos durante 24 h, num total de 73 coletas por paciente, sendo preenchido um rígido protocolo para determinar a atividade do paciente. O sangue foi centrifugado até no máximo 1 h após a coleta e o soro foi congelado e armazenado a -20 °C até a realização das dosagens.

Variáveis antropométricas, metabólicas e hormonais foram avaliadas antes do BPG. As mesmas variáveis foram realizadas em nova internação 6 meses após a cirurgia. O tempo de seguimento de cada paciente foi de 6 meses.

3.2 VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS

3.2.1 Medida do peso corporal, estatura e IMC

O peso corporal foi medido às 07:30 h, em kg, com a paciente em trajes íntimos através de balança Filizola modelo ID-1500, na Enfermaria de Endocrinologia do HC-FMUSP, com capacidade máxima de carga de 300 kg e nível de precisão de 0,1 kg.

Foram realizadas três medidas consecutivas em metros (m) da estatura das pacientes no estadiômetro da Enfermaria de Endocrinologia do HC-FMUSP no período da manhã do dia da admissão das mesmas, considerando-se a média das três medidas. O nível de precisão foi de 0,001 m.

O IMC foi calculado pela divisão do peso pelo quadrado da estatura e expresso em kg/m^2 .

3.2.2 Medida da circunferência abdominal

Foram realizadas três medidas consecutivas, com fita plástica inelástica com 0,7 cm de largura, da circunferência abdominal (CA) no perímetro médio entre a última costela e a crista ilíaca, com a paciente em pé, despida, com os braços ligeiramente separados do corpo e em expiração, considerando-se a média das três medidas. O nível de precisão foi de 1 cm.

3.2.3 Determinação da gordura corporal

A medida da gordura corporal foi realizada pelo método de absorciometria por dupla emissão de raios X (DEXA) através da técnica de Pencil-beam, no Setor de Radiologia do HC-FMUSP. Os feixes de raios gama de dupla energia são diferentemente atenuados pelo tecido ósseo, muscular e adiposo e um detector de cintilação capta a radiação atenuada, correlacionando-a com a massa adiposa (MA) e com a massa magra (MM), definida como a massa corporal total menos a MA. O coeficiente de variação do método foi de 0,8% para a MA e 1,0% para MM.

3.3 VARIÁVEIS METABÓLICAS E HORMONAIS

3.3.1 Dosagem de glicemia de jejum

A determinação de glicemia plasmática de jejum (na amostra basal às 08:00 h) foi realizada pelo Laboratório Central do HC-FMUSP através de analisador automático, modelo Cobas Integra da Roche, pelo método enzimático colorimétrico, utilizando a hexoquinase. Os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dl) de plasma. O intervalo de referência considerado para os valores normais de glicemia foi de 70 a 110 mg/dl.

3.3.2 Dosagem de insulina

A concentração sérica de insulina foi determinada pelo Laboratório Central do HC-FMUSP através de estojo diagnóstico DSL-1000 (Diagnostic Systems

Laboratories). Os valores foram expressos em microunidades por mililitro ($\mu\text{UI/ml}$) de soro. As análises foram realizadas em duplicata. O limite mínimo de detecção do ensaio de insulina é de $0,98 \mu\text{UI/ml}$. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram, respectivamente, 6,0% e 9,2%.

3.3.3 Cálculo do HOMA-IR

O cálculo do modelo de homeostase (*homeostasis model assessment* — HOMA-IR) é um modelo matemático que se baseia na interação da glicose com a insulina⁽¹⁵⁵⁾ e que se propõe a avaliar a sensibilidade à insulina a partir das concentrações de insulina e glicose de jejum. Neste modelo, resultados mais elevados denotam baixa sensibilidade à insulina. Para o seu cálculo, multiplica-se o valor da insulina ($\mu\text{UI/ml}$) pelo valor da glicemia (mmol/l) e divide-se este produto por 22,5.

3.3.4 Taxa metabólica de repouso

A avaliação da taxa metabólica de repouso (TMR) foi realizada através de calorimetria indireta utilizando-se o monitor metabólico Deltatrac, com medidas constantes de concentrações de O_2 e CO_2 inspirados, no Ambulatório de Endocrinologia do HC-FMUSP. Através da relação entre a quantidade de O_2 usado e a quantidade de CO_2 produzido (coeficiente respiratório, ou CO_2 formado/ O_2 usado), a TMR é calculada.

3.3.5 Dosagem de GH

As dosagens de GH (perfil de 24 h) foram realizadas em todas as 146 amostras por paciente (total de 1460 dosagens) pelo método imunorradiométrico (IRMA) utilizando-se estojo diagnóstico GH IRMA Immunotech (valores expressos

em nanogramas por mililitro — ng/ml) pelo Laboratório de Investigação Médica LIM 25. As análises foram realizadas em duplicata. O limite mínimo de detecção do ensaio de GH é de 0,02 ng/ml. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram, respectivamente, 3,46% e 3,74%. A curva-padrão foi calibrada com a preparação de 22 kDa de acordo com os padrões do “WHO 1st International Standard (80/505)” para GH purificado de hipófises humanas, bem como do “WHO 1st International Reference Reagent (88/624)” para GH recombinante.

O estudo dos perfis dos padrões de secreção pulsátil das concentrações de GH de 24 h foi feito através de um programa de computador baseado em algoritmos que permitem a detecção e análise de pulsos hormonais discretos (Pulsar)⁽¹⁵⁶⁾ no Centro de Pesquisa em Hormônio de Crescimento do Instituto da Mulher e da Criança da Universidade de Gotemburgo.

Os seguintes termos foram adotados para descrever os fenômenos cíclicos da secreção hormonal: período circadiano ou diurno (de um dia), período ultradiano (menor que um dia), valor basal (média aritmética dos valores que representam flutuações da linha de base, expresso em ng/ml), média (média aritmética de todos os valores do ciclo, expressa em ng/ml), picos (níveis máximos ultradianos medidos e inferidos através de algoritmos matemáticos, expressos em N° de picos/24 h), amplitude de pico acima do valor basal (diferença entre o nível máximo e a média das flutuações da linha de base, expressa em ng/ml), amplitude de pico (diferença entre o nível máximo e zero, expressa em ng/ml), área de picos (área calculada do valor dos picos de secreção, expressa em ng/ml.min⁻¹), área sob a curva acima do basal (área de toda a curva secretória acima da média das flutuações da linha de base, expressa em ng/ml.min⁻¹), área sob a curva (área total da curva secretória acima de zero, expressa em ng/ml.min⁻¹).

3.3.6 Dosagem de IGF-I

As dosagens de IGF-I (basal) foram realizadas por IRMA pós-extração pelo Laboratório Fleury na amostra das 08:00 h, em soro congelado por cerca de 4 anos. Os valores foram expressos em nanogramas por mililitro (ng/ml) de soro. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram, respectivamente, 8,2% e 6,5% (concentração de 30 ng/ml) e, respectivamente, 8,2% e 7,2% (concentração de 70 ng/ml).

3.3.7 Dosagem de IGFBP-3

As dosagens de IGFBP-3 (basal) foram realizadas IRMA pelo Laboratório Fleury na amostra das 08:00 h, em soro congelado por cerca de 4 anos. Os valores foram expressos em nanogramas por mililitro (ng/ml) de soro. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram, respectivamente, 2,9% e 3,2% (concentração de 4 ng/ml) e, respectivamente, 2,3% e 5,0% (concentração de 40 ng/ml).

3.3.8 Dosagem de ghrelina

As dosagens de ghrelina total (08:00 h, 10:00 h, 12:00 h, 19:00 h, 02:00 h) foram realizadas em cinco amostras por paciente (total de cem dosagens) pelo método de radioimunoensaio (RIA) utilizando-se estojo diagnóstico (Cat. No. GHRT-89HK) Ghrelin (total) RIA Linco Research, Inc. (valores expressos em picogramas por mililitro — pg/ml), que dosa ghrelina total, pelo Laboratório de Investigação Médica LIM 25, em um único ensaio e em uma única dosagem por horário, em soro congelado por cerca de 4 anos. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 1,35%.

Os seguintes termos foram adotados para descrever os fenômenos cíclicos da secreção hormonal da ghrelina: período circadiano ou diurno (de um dia), período ultradiano (menor que um dia), valor basal (amostra colhida em jejum às 08:00 h), média (média aritmética dos valores dosados), valor ou nadir pós-prandial (amostra colhida às 10:00 h), todos expressos em pg/ml.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos foram inicialmente comparados com a curva normal utilizando o teste de distância K-S (Kolmogorov-Smirnov) estabelecendo-se se os dados tinham comportamento paramétrico (expressos em média $\pm$ desvio-padrão) ou não paramétrico (expressos em mediana e intervalos interquartis).

Para comparação da evolução dos dados ao longo do tempo (pré *versus* pós) foi utilizado o teste de t de Student pareado e para análise dos momentos pré e pós-cirurgia de dados com comportamento não paramétrico, foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Para as correlações envolvendo dados contínuos com distribuição normal, foi utilizada a correlação de Pearson e para as correlações entre dados ordinais não paramétricos foi usado o coeficiente de correlação de Spearman.

Para determinar os efeitos independentes das variáveis sobre os parâmetros de secreção de GH, foi utilizada a análise de regressão gradual (“stepwise forward regression analysis”).

Foi considerado para todo estudo, o risco alfa menor ou igual a 5% de cometer erro tipo I ou de primeira espécie e risco beta menor ou igual a 20% de cometer erro tipo II ou de segunda espécie.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASAIS

Todas as pacientes eram mulheres na pré-menopausa com obesidade mórbida (com IMC ≥ 40 kg/m² ou grau III). A média de idade das pacientes foi de $34,4 \pm 7,7$ anos, a média de altura foi de $1,62 \pm 0,09$ m, a média de peso inicial foi de $145,1 \pm 18,2$ kg e a média de IMC foi de $55,9 \pm 6,2$ kg/m².

4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PÓS-CIRURGIA

As pacientes apresentaram uma redução significativa do peso corpóreo ($p < 0,001$) e do IMC ($p < 0,001$) seis meses após a cirurgia bariátrica (Tabela 1). A média da perda de peso absoluta foi de $37,7 \pm 7,4$ kg e a relativa foi de $26,1\% \pm 4,8\%$.

Tabela 1 – Variação de peso e índice de massa corporal antes e seis meses depois da cirurgia.

PARÂMETRO	PRÉ-CIRURGIA	PÓS-CIRURGIA	SIGNIFICÂNCIA
PESO (kg)	$145,1 \pm 18,2$	$107,3 \pm 16,6$	$p < 0,001$
IMC (kg/m ²)	$55,9 \pm 6,2$	$40,7 \pm 5,8$	$p < 0,001$

Dados expressos em média e desvios-padrão ($X \pm DP$) comparadas pelo teste t pareado

4.3 PERFIL DE SECREÇÃO DE GH BASAL

Todos os parâmetros secretórios de 24 h apresentavam-se reduzidos antes da cirurgia e estão mostrados na Tabela 2. Os parâmetros número de picos, amplitude de picos e área de picos das pacientes 4 e 7 não puderam ser calculados em função da ausência completa de picos secretórios de GH.

4.4 PERFIL DE SECREÇÃO DE GH PÓS-CIRURGIA

Os parâmetros de secreção de 24 h de GH também estão mostrados na Tabela 2. Houve, seis meses após a cirurgia, um aumento de todos os parâmetros em todas as pacientes, incluindo as pacientes 4 e 7 que apresentaram picos de secreção de GH.

Após a cirurgia, houve uma elevação do nível basal de GH em 50%. O nível médio de 24 h elevou-se em 400% e o número de picos aumentou 200%. A área sob a curva acima do valor basal (AUCb) aumentou 560%.

Na Figura 1 está representado a média e desvios-padrão do nível de GH de todas as pacientes durante 24 h antes e seis meses depois da cirurgia bariátrica. As Figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mostram as variações de cada parâmetro antes e depois da cirurgia. Observou-se uma elevação significativa do nível basal e do nível médio de GH (Figuras 2 e 3), do número de picos e da amplitude de picos (Figuras 4 e 5), e da área de picos e da AUCb (Figuras 6 e 7) após a cirurgia.

Tabela 2 – Nível basal; nível médio; número, amplitude e área de picos, e área sob a curva acima do nível basal (AUCb) do perfil de secreção de GH de 24 h antes (pré) e seis meses após a cirurgia (pós)

PARÂMETRO	PRÉ	PÓS	p
NÍVEL BASAL (ng/ml)	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,019
NÍVEL MÉDIO (ng/ml)	0,20 ± 0,13	0,79 ± 0,49	0,003
NÚMERO DE PICOS (Nº/24 h)	5,50 ± 2,20	10,80 ± 1,80	<0,001
AMPLITUDE DE PICOS (ng/ml)	0,89 ± 0,57	2,76 ± 1,12	0,001
ÁREA DE PICOS (ng/ml min ⁻¹)	0,54 ± 0,40	1,81 ± 0,78	0,001
AUCb (ng/ml min ⁻¹)	3,74 ± 3,11	20,80 ± 9,64	0,001

Dados expressos em média e desvios-padrão ($X \pm DP$) comparadas pelo teste t pareado

Figura 1 – Média e desvios-padrão das 73 dosagens de GH durante 24 h antes (linha azul) e seis meses depois da cirurgia bariátrica (linha vermelha)

Figura 2 – Nível de GH basal antes e seis meses após a cirurgia ($p = 0,019$)

Figura 3 – Nível de GH médio antes e seis meses após a cirurgia ($p = 0,003$)

Figura 4 – Número de picos de GH antes e seis meses após a cirurgia ($p < 0,001$)

Figura 5 – Amplitude de picos de GH antes e seis meses após a cirurgia ($p = 0,001$)

Figura 6 – Área de picos de GH antes e seis meses após a cirurgia ($p = 0,001$)

Figura 7 – Área sob a curva acima do valor basal de GH antes e seis meses após a cirurgia ($p = 0,001$)

O nível basal de GH correlacionou-se com os parâmetros de secreção de GH de 24 h: GH médio, número de picos, amplitude de picos e AUCb (Tabela 3). O GH médio e a AUCb apresentaram correlação fortemente positiva e quase perfeita ($r = 0,999$; $p < 0,001$)(Figura 8).

Tabela 3 – Correlação entre o GH basal e parâmetros do perfil de secreção de GH em todas as pacientes estudadas ($n = 20$).

VARIÁVEL	GH BASAL (ng/ml)
GH MÉDIO (ng/ml)	<0,001 (0,842)
Nº DE PICOS	<0,001 (0,736)
AMPLITUDE DE PICOS (ng/ml)	<0,001 (0,714)
AUCb (ng/ml min ⁻¹)	<0,001 (0,818)

AUCb: área sob a curva acima do nível basal

Figura 8 – Correlação entre GH médio e AUCb (área sob a curva acima do nível basal)($n = 20$; $r = 0,999$; $p < 0,001$)

4.5 IGF-I E IGFBP-3 BASAL E PÓS-CIRURGIA

O nível de IGF-I não apresentou variação significativa quando comparados os momentos pré e pós-cirurgia ($p = 0,125$). Não houve diferença significativa entre as dosagens de IGF-I pré e pós-operatório, que se elevou de 8 para 11,5 ng/ml, valores extremamente reduzidos e indosáveis até, na maior parte das pacientes. O nível de IGFBP-3 também não apresentou diferença quando comparados os momentos pré e pós-cirurgia ($p = 0,550$). O valor de IGFBP-3 das pacientes no pré-operatório foi 1815 ± 531 ng/ml. Estas dosagens foram realizadas no soro colhido quatro anos antes e mantido congelado a -20°C , motivo pelo qual dosamos esses parâmetros em seis pacientes do Ambulatório de Obesidade pareadas para idade e IMC ($55,7 \pm 9,3$ kg/m²) com as pacientes no pré-operatório (teste t de Student, $p = 0,95$). Os resultados de IGF-I dessas pacientes (controle) variaram de 85 a 180 ng/ml. O valor médio de IGFBP-3 desse mesmo grupo de seis pacientes-controle de peso semelhante foi claramente superior ao das nossas pacientes no pré-operatório (3048 ± 756 ng/ml, $p = 0,002$).

4.6 PERFIL DE SECREÇÃO DE GHRELINA PRÉ E PÓS-CIRURGIA

Os valores de ghrelina basal, média e pós-prandial estão mostrados na Tabela 4. Não houve diferença entre os valores pré e pós-cirúrgicos.

Tabela 4 – Variação de ghrelina antes e seis meses depois da cirurgia bariátrica

PARÂMETRO	PRÉ-CIRURGIA	PÓS-CIRURGIA	SIGNIFICÂNCIA
GHRELINA MÉDIA	694 ± 130	699 ± 97	P = 0,91
GHRELINA BASAL	742 ± 174	765 ± 258	P = 0,82
GHRELINA PÓS-PRANDIAL	647 ± 260	810 ± 302	P = 0,22

Dados expressos em média (pg/ml) e desvios-padrão ($X \pm DP$) comparadas por análise de variância do tipo bidirecional

4.7 DADOS BIOQUÍMICOS BASAIS E PÓS-CIRURGIA

Os valores de glicemia de jejum, insulinemia de jejum e HOMA-IR antes e seis meses depois da cirurgia estão mostrados na Tabela 5. Verificou-se diferença entre estes parâmetros antes e após a cirurgia.

Tabela 5 – Nível de glicemia e insulinemia de jejum, bem como do HOMA-IR antes (pré) e seis meses após a cirurgia (pós)

PARÂMETRO	PRÉ	PÓS	P
GLICEMIA DE JEJUM (mg/dl)	88 ± 7	76 ± 13	0,03
INSULINEMIA DE JEJUM (μ UI/ml)	62 ± 41	16 ± 10	0,005
HOMA-IR	13,2 ± 8,6	3,0 ± 1,9	0,004

Dados expressos em média e desvios-padrão ($X \pm DP$) comparadas pelo teste t pareado

4.8 RELAÇÃO ENTRE SECREÇÃO DE GH E VARIÁVEIS CLÍNICAS E METABÓLICAS

Uma análise de regressão linear foi realizada em todas as pacientes (pré e pós-cirurgia), entre GH médio e AUCb como variáveis dependentes e peso, IMC, MA (absoluta e percentual), MM (absoluta e percentual), CA, TMR, insulina, HOMA-IR e ghrelina média como variáveis independentes. Houve uma correlação negativa entre GH médio e peso, IMC (Figura 9), MA absoluta (Figura 10), MA percentual, MM absoluta, CA, TMR, insulinemia de jejum (Figura 11) e HOMA-IR (Figura 12). Houve também correlação, mas positiva entre GH médio e MM percentual. A AUCb apresentou correlação negativa com peso, IMC, MA absoluta, MA percentual, MM absoluta, CA, TMR, insulinemia de jejum e HOMA-IR. A correlação entre AUCb e MM percentual foi positiva. O GH médio e a AUCb não apresentaram correlação com o nível de glicose de jejum, tampouco com a ghrelina média (Figura 13). Todas as correlações estão apresentadas na Tabela 6.

Foi realizada uma análise de regressão gradual (“forward stepwise regression”) para identificar a melhor variável antropométrica ou metabólica determinante da secreção de GH (representada pelo GH médio). O IMC foi um determinante significativo inversamente associado à secreção de GH, explicando 54% ($r^2 = 0,54$) da variação do GH médio ($p < 0,001$), sendo superior às outras variáveis (MA absoluta, MA percentual, MM absoluta, MM percentual, CA, TMR, glicemia de jejum, insulinemia de jejum e HOMA-IR).

Figura 9 – Correlação entre GH médio e IMC ($n = 20$; $r = -0,731$; $p < 0,001$)

Figura 10 – Correlação entre GH médio e massa adiposa em valor absoluto ($n = 20$; $r = -0,635$; $p = 0,003$)

Figura 11 – Correlação entre GH médio e insulinemia de jejum (n = 20; $r = -0,538$; $p = 0,014$)

Figura 12 – Correlação entre GH médio e HOMA-IR (n = 20; $r = -0,560$; $p = 0,01$)

Tabela 6 – Correlação entre GH médio e AUCb, e variáveis antropométricas e metabólicas em todas as pacientes (n = 20).

VARIÁVEL	GH MÉDIO (ng/ml)	AUCb (ng/ml min ⁻¹)
PESO (kg)	0,003 (-0,631)	0,006 (-0,626)
IMC (kg/m ²)	<0,001 (-0,731)	<0,001 (-0,721)
MA (kg)	0,003 (-0,635)	0,005 (-0,626)
MA (%)	0,003 (-0,627)	0,006 (-0,614)
MM (kg)	0,02 (-0,507)	0,03 (-0,500)
MM (%)	0,003 (0,627)	0,007 (0,614)
CA (cm)	0,01 (-0,555)	0,02 (-0,545)
TMR (kcal/24h)	0,01 (-0,539)	0,02 (-0,300)
GLICEMIA (mg/dl)	0,13 (-0,354)	0,13 (-0,347)
INSULINA (μUI/ml)	0,014 (-0,538)*	0,016 (-0,530)*
HOMA-IR	0,01 (-0,560)*	0,009 (-0,569)*
GHRELINA (pg/ml)	0,6 (0,118)	0,5 (0,155)

AUCb: área sob a curva acima do valor basal; IMC: índice de massa corpórea; MA: massa adiposa; MM: massa magra; CA: circunferência abdominal; TMR: taxa metabólica de repouso; HOMA-IR: cálculo do modelo de homeostase

São apresentados o valor de p e do coeficiente de correlação (r, entre parênteses)

Correlação de Pearson, exceto por *Coeficiente de correlação de Spearman

Como o envelhecimento leva à diminuição na secreção de GH, dividimos as pacientes por idade em dois grupos, um com mais que 30 anos ($n = 4$) e outro com 30 anos ou menos ($n = 6$). Antes da cirurgia, o nível médio de GH de 24 h foi maior no grupo de pacientes mais jovens em comparação com as pacientes com idade superior a 30 anos ($0,24 \pm 0,14$ versus $0,13 \pm 0,08$ ng/ml), embora a diferença não tenha atingido significância estatística ($p = 0,18$). Após a cirurgia, o nível médio de GH desses dois grupos de pacientes foi, respectivamente, $0,85 \pm 0,59$ e $0,71 \pm 0,37$ ng/ml, também sem diferença entre os dois grupos.

Figura 13 – Ausência de correlação entre nível médio de GH e nível médio de ghrelin ($n = 20$; $r = -0,118$; $p = 0,6$)

4.9 RELAÇÃO ENTRE GHRELINA E VARIÁVEIS CLÍNICAS E METABÓLICAS

Uma análise de regressão linear foi realizada em todas as pacientes (pré e pós-cirurgia), entre nível médio de ghrelina como variável dependente e peso, IMC, MA (absoluta e porcentual), MM (absoluta e porcentual), CA, TMR, insulina e HOMA-IR como variáveis independentes, não havendo correlação entre nenhuma das variáveis.

4.10 RESULTADOS INDIVIDUAIS DE TODAS AS PACIENTES E OUTROS RESULTADOS

As características demográficas e antropométricas de cada paciente antes e seis meses após a cirurgia estão relacionadas, respectivamente, nos Anexos A e B.

Os parâmetros de secreção do GH pré e pós-cirurgia de cada paciente são mostrados, respectivamente, nos Anexos C e D.

Os valores de glicemia e insulina de jejum, e HOMA-IR de todas as pacientes no pré e no pós-operatório são mostrados, respectivamente, nos Anexos E e F.

Os valores do perfil de secreção de ghrelina de todas as pacientes no pré e no pós-operatório são mostrados, respectivamente, nos Anexos G e H.

Os valores de IFG-I e IGFBP-3 de todas as pacientes, bem como as variações medianas e intervalos interquartis no pré e no pós-operatório são mostrados, respectivamente, nos Anexos I e J.

Os valores de IGF-I e IGFBP-3 de seis pacientes do sexo feminino, na menacme e com IMC semelhante (controle) ao das pacientes no pré-operatório são mostrados no Anexo K.

As correlações entre a ghrelina e dados antropométricos e metabólicos são mostradas no Anexo L.

As figuras com 73 dosagens do perfil de secreção de GH antes e após a cirurgia são mostradas no Anexo M.

5 DISCUSSÃO

As pacientes estudadas, mulheres obesas não diabéticas antes da menopausa, apresentaram hipossomatotrofismo, ou redução da secreção de GH, ilustrada por valores diminuídos de todos os parâmetros estudados do perfil secretório e pouca variação entre o nível basal e os pulsos. Chama a atenção que duas das 10 pacientes estudadas, ambas com IMC de $57,2 \text{ kg/m}^2$, não apresentaram picos de secreção. Todas as 10 pacientes apresentavam obesidade grau III (obesidade mórbida), definida por um IMC $\geq 40 \text{ kg/m}^2$, mas seis delas enquadravam-se numa categoria denominada super-obesidade, definida por uma faixa de IMC acima do percentil 95⁽¹⁵⁷⁾, equivalente a IMC $\geq 55 \text{ kg/m}^2$. As pacientes apresentavam também hiperinsulinemia e elevação do escore de HOMA-IR.

O grupo de Veldhuis estudou os níveis de GH de 24 h em homens obesos mostrando uma redução de 75% em relação a homens de peso normal com idade semelhante⁽⁹⁴⁾ e para cada unidade de aumento do IMC, houve uma redução da secreção de GH da ordem de 6%⁽⁹⁵⁾.

Dividindo-se as pacientes em grupos com 30 anos ou mais e menos que 30 anos, não houve diferença em relação à idade no nível médio de GH ($p = 0,18$). Após a cirurgia, o nível médio de GH desses dois grupos de pacientes foi semelhante, mostrando que não houve influência do fator idade na menor secreção de GH. É bastante conhecido que a concentração de GH é maior em crianças que em adultos e que essa concentração diminui com o avanço da idade. Rudman et al.⁽¹⁵⁸⁾, estudando

o nível de GH e de IGF-I de 94 indivíduos com peso normal (85-115% do peso corporal ideal) de 21 a 86 anos de idade, demonstraram que ocorre um declínio progressivo na secreção de GH e de IGF-I plasmáticos entre a terceira e a nona décadas, havendo uma correlação robusta entre a liberação de GH e a concentração de IGF-I, que pode ser usado como indicador do status endógeno de GH. Porém, analisando cada década, há uma grande variabilidade no nível de GH entre os indivíduos, o que pode explicar a ausência de diferença estatística nas nossas pacientes. Ainda no mesmo estudo, a taxa de declínio da secreção de GH foi inversamente proporcional ao IMC ($r = -0,58$), em concordância com estudos ainda anteriores, que analisaram a liberação de GH após estímulo farmacológico⁽¹⁵⁹⁾.

Após a cirurgia, as nossas pacientes tiveram perda de aproximadamente 26% do peso corporal (equivalente a cerca de 47% do excesso de peso) em seis meses, e no momento em que foram reestudadas, o IMC médio do grupo foi de 40,7 kg/m². Das 10 pacientes, duas atingiram obesidade grau I (IMC de 30 a 34,9 kg/m²), duas obesidade grau II (IMC de 35 a 39,9 kg/m²) e seis ainda permaneciam na categoria obesidade grau III. Todas as seis pacientes que preenchiam o critério de super-obesidade no pré-operatório saíram dessa categoria com a perda de peso.

Houve uma modificação de todos os parâmetros avaliados do ritmo de GH seis meses após a cirurgia. O padrão temporal de secreção do GH pré-cirurgia consistiu de pequenas variações diurnas, com elevação significativa após a cirurgia dos níveis de GH basal e médio, assim como do número, amplitude e área dos picos secretórios, e da AUCb, o que reflete uma recuperação ao menos parcial da secreção de GH. As duas pacientes que não apresentavam picos passaram a apresentar 4 e 6 eclosões secretórias em 24 h, evidenciando que a perda de peso induz uma elevação

dos níveis de GH mesmo sem a normalização do peso corporal. Após a perda de peso, houve também uma redução dos níveis de glicemia de jejum (embora fossem normais no pré-operatório), de insulinemia de jejum e do HOMA-IR.

A secreção de GH em adultos jovens exibe um ritmo circadiano, e ao longo das 24 h, é caracterizada por uma massa de secreção noturna maior, que independe do início do sono, mas que é facilitada quando coincidem o pico de secreção circadiana e o sono de ondas lentas⁽¹⁶⁰⁾. Sob condições normais, o GH é baixo durante a maior parte do tempo, com um ritmo ultradiano de cerca de 10 pulsos secretórios nos homens e de 20 nas mulheres normais⁽⁸⁶⁾. Ambos os sexos apresentam uma frequência de pulsos elevada durante a noite, porém, as mulheres, além de apresentarem uma frequência maior de pulsos que os homens, apresentam pulsos de magnitude mais uniforme⁽⁸⁶⁾. Nossas pacientes apresentavam um ritmo ultradiano caracterizado por pulsos diurnos e no início da noite, porém o número de pulsos, bem como a amplitude, apresentavam-se extremamente reduzidos no pré-operatório. Seis meses depois da cirurgia, houve um aumento expressivo da amplitude e o número de pulsos dobrou, muito embora a frequência de pulsos fosse ainda cerca de 50% menor que a descrita em mulheres de peso normal⁽⁸⁶⁾.

O nível basal de GH apresentou uma correlação bastante forte com o perfil de secreção de GH, mas particularmente com parâmetros que refletem a massa de GH secretado nas 24 h, como o GH médio ($p < 0,001$, $r = 0,84$) e a AUCb ($p < 0,001$, $r = 0,82$). Estes dois parâmetros (GH médio e AUCb) apresentaram uma correlação quase perfeita ($p < 0,001$, $r = 0,999$), sendo usados como representativos da secreção circadiana de GH nas análises de correlação e regressão.

Esses mesmos parâmetros apresentaram correlação negativa com o peso corporal, o IMC, a medida da CA, a MA em valor absoluto e percentual, a MM em valor absoluto e a TMR e apresentaram correlação positiva com a MM percentual. A análise de regressão gradual apontou o IMC como a variável que melhor explicou a variação do GH médio de 24 h ($p < 0,001$). Estes resultados são facilmente compreensíveis, uma vez que é bastante conhecido o efeito inibidor da obesidade sobre a secreção de GH, bem como o efeito estimulador do emagrecimento sobre essa secreção, em pacientes com menor grau de adiposidade que as nossas pacientes^(90;94;95). A correlação negativa entre parâmetros que refletem adiposidade e secreção de GH não foi consistentemente observada: o mesmo grupo de Veldhuis, estudando mulheres com IMC entre 20 e 35 kg/m², não obteve correlação entre a AUCb e o IMC ($r = -0,19$; $p = 0,29$) ou a MA percentual ($r = -0,29$; $p = 0,11$)⁽¹⁶¹⁾. Apesar da diferença no grau de sobrepeso das pacientes estudadas, esses dados contrastam com nossos, que mostram correlação entre a AUCb e o IMC ($r = -0,721$; $p < 0,001$) ou a MA percentual ($r = -0,614$; $p = 0,006$) em mulheres com obesidade mórbida.

Van Dam et al.⁽¹⁶²⁾ não observou correlação negativa entre a resposta de GH a GHRP-2 e IMC, CA ou níveis de glicose e insulina, mas outros autores^(92;163;164) documentaram uma correlação negativa entre a resposta de GH após vários testes de estímulo e o IMC ou o peso corporal ideal. Nossas pacientes apresentaram correlação positiva da secreção de GH com a massa magra percentual, provavelmente porque o emagrecimento promove uma redução tanto da massa adiposa como da massa magra, mas proporcionalmente o decréscimo é maior da primeira, acarretando portanto uma elevação da fração percentual da massa magra.

Alguns estudos avaliaram a secreção de GH em relação à distribuição regional de gordura. Kanaley et al.⁽¹⁶⁵⁾ demonstraram uma resposta de GH reduzida ao exercício em mulheres obesas comparadas com mulheres magras, mas não houve diferença entre mulheres com obesidade andróide ou ginóide avaliadas por antropometria. No entanto, Pijl et al.⁽¹¹⁴⁾ demonstraram que a secreção de GH é diminuída em mulheres obesas com adiposidade visceral em relação àquelas sem distribuição central de gordura com IMC semelhante e Weltman et al.⁽¹⁶⁶⁾ investigaram a secreção de GH em mulheres com mais que 60 anos de idade e documentaram uma redução do GH de 24 h em mulheres com adiposidade visceral comparadas com mulheres sem adiposidade visceral, mas de peso menor. Buijs et al.⁽¹⁶⁷⁾ também demonstraram um GH médio 50% menor em oito mulheres com obesidade grau I e adiposidade central comparadas com seis mulheres de peso normal. Em vários estudos, a obesidade visceral foi associada a níveis reduzidos de GH, mesmo em indivíduos não obesos, sendo um determinante negativo da secreção de GH de 24 h⁽¹⁶⁸⁻¹⁷¹⁾, mas em crianças, a porcentagem de gordura do tronco medida por DEXA, embora tenha se correlacionado negativamente com a AUCb, foi responsável por apenas 20% da variabilidade da secreção de GH⁽¹⁷²⁾. Um estudo⁽¹⁷³⁾ recente investigou os níveis de GH em mulheres com peso normal e aumento da adiposidade truncal, comparando-as com mulheres com IMC semelhante sem distribuição central de gordura. Esse estudo demonstrou que aquelas mulheres apresentavam níveis de GH reduzidos e a gordura truncal medida por densitometria foi um determinante mais importante do nível endógeno de GH do que o IMC ou a massa adiposa total, embora não tenha podido excluir a possibilidade de que uma secreção endógena reduzida de GH naquelas pacientes tenha sido o fator que contribuiu para a deposição central de gordura. Apesar da correlação inversa significativa entre o GH

médio e a CA ($r = -0,555$; $p = 0,01$), nossos resultados não apontaram a adiposidade central medida pela CA como determinante mais importante da secreção de GH de 24 h. Variações na adiposidade medida pelo IMC foram mais importantes do que a CA na determinação do nível de GH nas nossas pacientes. Diferente das 15 pacientes (oito com gordura truncal e sete sem) estudadas por Miller et al.⁽¹⁷³⁾, que apresentavam peso normal, a CA das nossas pacientes variou de 109 a 153 cm no pré-operatório e de 92 a 129 cm no pós-operatório, ou seja, todas elas apresentavam aumento do perímetro abdominal em ambas as avaliações. É importante ressaltar a dificuldade de medida da CA em pacientes com obesidade extrema, que com frequência apresentam um panículo adiposo subcutâneo abdominal tão exuberante que dificulta a escolha do ponto mais adequado para a medida. Após a perda de peso induzida seis meses após a cirurgia, é comum a presença de redundâncias de pele e de abdômen “em avental”, adicionando mais um complicador na medição.

A patogênese da insuficiência somatotrófica da obesidade não está esclarecida e um dos mecanismos propostos é a alteração do tônus somatostatinérgico, com uma resposta funcional compensatória a sinais aferentes alterados^(163;174). No entanto, GHRH, SS e ghrelina provavelmente não são os únicos sinais reguladores da secreção dos somatotrofos. Vários sinais periféricos regulam a secreção de GH. Alguns autores estudaram em crianças⁽¹⁷²⁾ e adolescentes⁽¹⁷⁵⁾ as relações temporais entre as variações de ácidos graxos livres, leptina e GH e sugeriram que os ácidos graxos livres e a leptina poderiam agir como sinalizadores metabólicos regulando a secreção de GH, mas um estudo recente mostrou que a inibição da secreção de GH não é mediada pelos níveis altos de leptina na obesidade humana⁽¹⁷⁶⁾.

Os fatores relacionados à ingestão calórica e ao metabolismo energético são de particular importância, uma vez que eles provêm uma sinalização entre tecidos periféricos e centros hipotalâmicos, regulando outras vias homeostáticas além dos neurônios hipofiseotróficos clássicos^(6;8). Entre os vários gatilhos de liberação de GH estão incluídos reduções nas concentrações de glicemia (mesmo em níveis normais), hipoglicemia absoluta, exercício e elevada ingestão de proteínas. Anorexia nervosa e desnutrição são causas patológicas de elevação de GH. Acredita-se que muitos desses gatilhos agem através de mecanismos finais comuns de retirada de ação da somatostatina e conseqüente desinibição da secreção de GH. Em contraste, a hiperglicemia pós-prandial, a infusão de glicose, o aumento da concentração sérica de ácidos graxos livres, a resistência à insulina com ou sem diabetes melito tipo 2 e a obesidade estão todos associados a inibição da secreção de GH^(6;8).

Observamos uma redução significativa da glicemia de jejum, das concentrações de insulina de jejum e do HOMA-IR em nossas pacientes não diabéticas seis meses após a cirurgia. Além disso, observamos correlação entre o nível médio de GH e entre a AUCb e variações da insulina de jejum (respectivamente, $p = 0,014$ e $p = 0,016$) e do HOMA-IR (respectivamente, $p = 0,01$ e $p = 0,009$), mas não houve correlação entre esses parâmetros do perfil secretório de GH e variações da glicemia de jejum. Entretanto, estes parâmetros metabólicos não se mostraram os melhores determinantes da secreção de GH de 24 h na análise de regressão gradual. Os níveis elevados de insulina e de resistência à insulina no pré-operatório fazem-nos imaginar que pudessem estar influenciando negativamente a secreção de GH. Não podemos descartar a possibilidade de a associação inversa entre os parâmetros de secreção de GH e a insulinemia ou o HOMA serem um

epifenômeno, refletindo a conhecida associação entre hiperinsulinemia, resistência à insulina e obesidade.

Alguns estudos postulam que os níveis de insulina e de ácidos graxos livres são os fatores mais importantes envolvidos na regulação da secreção de GH em graus variados de adiposidade⁽⁹²⁾. A insulina reduz a liberação de GH da hipófise de ratos *in vitro*, provavelmente por um efeito IGF-I-símile⁽¹⁷⁷⁾. Alguns autores acreditam que a perda de peso induzindo redução do nível de insulina pode estar diretamente envolvida na restauração do perfil de GH de 24 h⁽¹⁰⁴⁾. Hiperinsulinemia, resistência à insulina, síndrome metabólica e obesidade estão associadas a níveis baixos de IGFBP-1⁽¹⁷⁸⁻¹⁸³⁾. Elevações agudas e crônicas da insulina suprimem a produção hepática e o nível circulante de IGFBP-1⁽¹⁸⁴⁾, que por sua vez regula a biodisponibilidade de IGF-I circulante⁽¹⁸⁵⁾ e já foi sugerido que IGFBP-1 aumenta a atividade do IGF-I nos tecidos-alvo, regulando seu transporte do plasma para os tecidos⁽¹⁸⁶⁾. Além disso, a IGFBP-1 sérica é sensível à ingestão de nutrientes e energia; enquanto a ingestão de alimento reduz de modo marcante o nível sérico de IGFBP-1⁽¹⁸⁵⁾, a restrição proteica e o jejum têm efeito oposto⁽¹⁸⁷⁾. Um estudo recente que avaliou 30 indivíduos de peso normal apontou os níveis de insulina, leptina e sensibilidade à insulina medida por “clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico como as variáveis com maior valor preditivo dos níveis de IGFBP-1⁽¹⁸⁸⁾.

Apesar da demonstração *in vitro* de que a hiperinsulinemia da obesidade pode contribuir diretamente para a inibição da secreção de GH (em concentração consideravelmente maior do que a observada em indivíduos obesos)⁽¹⁷⁷⁾, alguns autores acreditam que, em concentrações fisiológicas ela não tem um papel importante na regulação da secreção de GH⁽¹⁷⁵⁾. Entretanto,

De Marinis et al.⁽¹¹⁵⁾ observaram que a insulinemia de jejum foi responsável por 59% da variabilidade tanto do pico de GH como da área sob a curva de GH em resposta a GHRH em mulheres antes e depois de serem submetidas a derivação biliopancreática.

Parece, porém, haver também uma relação entre o nível de GH e a sensibilidade à insulina. Ocorre redução de secreção de GH em pacientes diabéticos tipo 2 não obesos^(189;190), há redução da tolerância à glicose em adultos com síndrome de Laron⁽¹⁹¹⁾ e a sensibilidade à insulina aumenta após tratamento com GH em adultos com deficiência de GH⁽¹⁹²⁾. Estes dados em conjunto sugerem que os níveis de GH podem influenciar a resistência à insulina.

Um aumento da depuração de GH pode contribuir para a redução dos seus níveis na obesidade^(94;168;193;194). De fato, a fração de GH que é removida da circulação pelos rins aumenta proporcionalmente com o peso⁽¹⁹⁴⁾.

O GH tem um efeito lipolítico direto no tecido adiposo, levando a liberação de ácidos graxos⁽¹⁹⁵⁾ e, por outro lado, uma concentração circulante elevada de ácidos graxos livres pode também estar envolvida na patogênese do hipossomatotrofismo da obesidade^(39;196-198). Estudos *in vivo*^(199;200) e *in vitro*⁽³⁹⁾ demonstraram que os ácidos graxos livres podem exercer uma inibição dose-dependente da secreção de GH, bloqueando diretamente a célula somatotrófica. Por outro lado, Kelijman e Frohman⁽¹¹³⁾ estudaram a resposta de GH a estímulo com GHRH antes e após jejum de 72 h em 10 obesas e observaram um aumento da resposta, apesar dos ácidos graxos livres plasmáticos, que já eram elevados, terem aumentado ainda mais com o jejum. Dados semelhantes foram documentados pelo grupo de Veldhuis que documentou uma amplificação da secreção circadiana de GH em indivíduos de peso normal antes, no

primeiro e no quinto dia de jejum, apesar de uma elevação de cinco vezes no nível de ácidos graxos livres⁽⁹⁴⁾.

Um trabalho recente avaliou 98 indivíduos normais e obesos, demonstrando que homens e mulheres (tanto no período pré como no pós-menopausal) obesos têm uma resposta maior de IGF-I a um único bolo de 7 mg de GH recombinante. O incremento de IGF-I, que evidencia um aumento da responsividade periférica ao GH, apresentou associação com o nível de GHBP, uma medida indireta do número de receptores de GH⁽²⁰¹⁾. A GHBP está associada a marcadores da obesidade, como secreção de insulina, resistência à insulina e leptina^(202;203).

As dosagens do IGF-I apresentaram valores extremamente reduzidos e foram indosáveis até, na maior parte das nossas pacientes. O nível de IGF-I das pacientes estudadas foi muito inferior ao nível esperado para o sexo e a idade⁽²⁰⁴⁾, e até mesmo inferior ao nível encontrado em adultos com deficiência grave de GH desde a infância⁽²⁰⁵⁾, tanto no pré-operatório como seis meses após a cirurgia. Apesar do aumento da secreção de GH no pós-operatório, não houve diferença significativa entre o nível de IGF-I pré e pós-operatório, que se elevou de <8 ng/ml para 11,5 ng/ml. Mesmo tendo em mente a complexidade do ensaio de IGF-I, que envolve extração para separar a IGF-I da fração ácido lábil e a pouca reprodutibilidade das dosagens, é provável que o tempo de estocagem do soro antes da realização das dosagens tenha interferido nos resultados. Não há estudos publicados na literatura analisando o valor de IGF-I em pacientes com obesidade extrema. Por esse motivo, estudamos seis pacientes controles do sexo feminino na menacme, com IMC semelhante ($55,7 \pm 9,3 \text{ kg/m}^2$) às pacientes no pré-operatório ($p = 0,95$), cujos resultados de IGF-I variaram de 85 a 180 ng/ml (Anexo K). Sendo assim, em

relação à quantificação de IGF-I, acreditamos que as amostras não se encontravam em condições adequadas de dosagem, provavelmente por terem sofrido ação de enzimas proteolíticas do soro ao longo do tempo. Como anticoagulante quelador de cálcio, o ácido diamonitetracético (EDTA) é um potente inibidor de proteases dependentes deste cátion. O material coletado em tubo com EDTA para as dosagens de IGF-I ou IGFBPs tem “vida útil” mais longa por permanecer protegido de qualquer atividade proteolítica inerente do plasma sobre proteínas sensíveis. A extração prévia com solução álcool-ácida de material provavelmente degradado pela ação proteolítica do plasma não deve ter revelado IGF-I imunorreativo por não ter permitido que fragmentos antigênicos, mesmo que pequenos, tenham sido reconhecidos pelo anticorpo presente no sistema.

O nível de IGFBP-3 do pré-operatório quando comparado com o pós-operatório não foi diferente. O ensaio de IGFBP-3 é mais estável e reprodutível que o de IGF-I. Entretanto, como as dosagens foram realizadas também no soro armazenado por quatro anos, comparamos os resultados obtidos com o das pacientes controles. O valor médio de IGFBP-3 das pacientes no pré-operatório foi 1815 ± 531 ng/ml e o do grupo de seis pacientes controles de peso semelhante foi 3048 ± 756 ng/ml. Acreditamos que possa ter havido alguma ação proteolítica das enzimas do soro sobre a IGFBP-3 das pacientes ao longo de quatro anos, já que o valor de IGFBP-3 dos controles foi estatisticamente superior ao das pacientes ($p = 0,002$). Desse modo, os valores de IGFBP-3 das pacientes não podem ser valorizados, já que descongelamentos sucessivos interferiram nos resultados.

O estudo retrospectivo clássico de Cummings et al⁽¹³⁹⁾ mostrou que enquanto a perda de peso induzida por dieta causou uma elevação no perfil circadiano da ghrelina,

pacientes tratados com BPG apresentaram uma profunda supressão dos níveis de ghrelina. Isso pode dever-se à exclusão das células do fundo gástrico e à permanente ausência de alimento no estômago e duodeno, que causaria um sinal estimulatório contínuo, que provavelmente suprime a produção de ghrelina (chamada de inibição por hiperestímulo ou “override inhibition”), sugerindo que a ghrelina pode ter uma participação na perda de peso das pacientes. Essa observação é consistente com a hipótese de que uma redução de sinais orexigênicos facilitasse a perda de peso alcançada pelos pacientes submetidos a essa cirurgia. Não observamos diferenças significantes dos níveis basal e médio de ghrelina antes e após a cirurgia; deve-se ressaltar que nossos pacientes apresentaram valores de ghrelina superiores aos observados por Cummings. Mais ainda, não observamos oscilações relacionadas a momentos pré ou pós prandiais (ritmo), quando comparados os valores do pré com os do pós-operatório, diferentemente do que ocorre em pacientes submetidos a restrição calórica, que têm elevação da ghrelina. Após a cirurgia, não houve redução nem aumento dos níveis de ghrelina, nem tampouco apareceram as oscilações circadianas habituais. Apesar de Cummings et al⁽¹³⁹⁾ ter demonstrado uma profunda redução da ghrelina, sem oscilação relacionada aos horários das refeições em pacientes submetidos a BPG, estudos posteriores provaram que a supressão pós-prandial de ghrelina não requer exposição luminal do estômago ou do duodeno aos nutrientes^(206;207). Nossos dados propõem que a ghrelina não é um fator determinante nem da perda de peso das pacientes, tampouco da elevação dos níveis de GH observados no pós-operatório.

Embora não possamos descartar algum efeito proteolítico sobre os resultados obtidos no ensaio da ghrelina, algumas observações sugerem que nossos dados não

sofreram modificações significantes pelo tempo ou pelos descongelamentos prévios para várias análises. Exemplificando, nossos valores são superiores aos demonstrados por Cummings⁽¹³⁹⁾. Dois trabalhos publicados documentaram que o nível de ghrelina obtido em dosagens séricas é superior ao nível obtido em plasma com heparina e em plasma com EDTA^(208;209). Embora a maior parte dos trabalhos publicados tenha avaliado os níveis de ghrelina no plasma^(125;126;130;134;136;138;139;145-147;149;151;210-214), a dosagem em soro não tratado já foi documentada^(115;152;215). Sucessivos congelamentos e descongelamentos a 5 °C (até onze ciclos) não acarretaram reduções significantes no nível de ghrelina imunorreativa⁽²⁰⁹⁾.

Além disso, outros estudos^(146;147) corroboraram nossos achados de níveis inalterados de ghrelina após BPG e dois trabalhos prospectivos^(140;142) relataram até mesmo elevação dos seus níveis, não havendo, portanto, consenso na literatura quanto a este assunto (Tabela 7).

Um estudo examinou as mudanças dos níveis de ghrelina durante o curso intraoperatório da BPG e relatou uma queda de ghrelina plasmática após a divisão do fundo gástrico e formação do “novo estômago”⁽²¹⁶⁾.

Tabela 7 – Efeito da gastroplastia vertical com derivação gastrojejunal sobre o nível de ghrelina

EFEITO	REFERÊNCIAS
REDUÇÃO	(139;143-145;153;211;216)
SEM ALTERAÇÃO	(146;147)
ELEVAÇÃO	(140-142)

As flutuações dos níveis de ghrelina relacionadas às refeições foram relatadas de forma inconsistente⁽¹²⁷⁾, tendo sido documentado que a supressão pós-prandial da ghrelina é proporcional à carga calórica ingerida⁽¹²⁶⁾. Foi documentado que mulheres afro-americanas apresentam supressão pós-prandial de ghrelina subnormal⁽²¹⁷⁾. Além dessa, outras possíveis explicações para esses achados discrepantes entre os estudos são: inclusão de pacientes ainda em balanço energético negativo ou estudados já em peso estável (uma vez que os estudos prospectivos foram realizados de seis semanas a 24 meses após a cirurgia, com reduções de IMC de 5 a 21 kg/m²), posicionamento mais proximal ou mais distal da linha de grampeamento que delimita o “novo estômago” na pequena curvatura gástrica (já que posicionamento mais proximal exclui totalmente o fundo gástrico e as células produtoras de ghrelina, enquanto que posicionamento mais distal permite que células produtoras de ghrelina permaneçam em contato com o trânsito alimentar) e ainda, comprimento da alça biliopancreática e preservação ou desconexão vagal (já que o seccionamento de fibras nervosas autonômicas vagais pode ocorrer em graus variáveis)⁽²¹⁸⁾.

A profundidade e duração da supressão pós-prandial da ghrelina é relacionada de forma dependente da dose ao conteúdo calórico da refeição⁽¹²⁶⁾ em indivíduos de peso normal, mas não em obesos⁽²¹⁹⁾. Nós não observamos supressão pós-prandial (08:00 h *versus* 10:00 h) da ghrelina nas nossas pacientes. Isso poderia ser devido ao jejum no Brasil ter uma carga calórica inferior ao jejum norte-americano. Além disso, no pós-operatório, diferenças na duração da refeição poderiam ter influenciado os resultados. Um estudo europeu também não demonstrou supressão após o jejum⁽²¹¹⁾.

É muito difícil harmonizar os dados existentes e formular uma conclusão em relação ao efeito da cirurgia bariátrica sobre a liberação de ghrelina. As mudanças de ghrelina após cirurgia bariátrica não se correlacionam com o grau de perda de peso obtido. O grau de hiperinsulinemia é o principal determinante da supressão de ghrelina em indivíduos obesos⁽¹³⁰⁻¹³²⁾. Mudanças do nível de ghrelina após a cirurgia podem depender do grau de resistência à insulina prévio e do grau de sensibilidade à insulina restaurado após perda de peso. Apesar disso, e não obstante a melhora da sensibilidade à insulina das nossas pacientes documentada por uma redução significativa dos níveis de insulina ($p = 0,005$) e do HOMA-IR ($p = 0,004$) após a cirurgia, não houve alterações na ghrelina sérica pré e pós-cirurgia, nem houve correlação entre o nível médio de ghrelina e a insulinemia ($p = 0,22$) ou o HOMA-IR ($p = 0,23$).

Além disso, uma vez que dosamos a ghrelina nas amostras pré-prandiais (08:00 h, 12:00 h, 19:00 h), no nadir pós-prandial matinal (10:00 h) e às 02:00 h, não obtivemos dados sobre a frequência de pulsos ou oscilações e, por conseguinte, não provemos informação sobre a pulsatilidade e o padrão ultradiano descrito por Cummings⁽¹²⁵⁾.

A ghrelina dosada no nosso estudo foi a ghrelina total, que dosa a ghrelina desacilada e acilada (menos de 10% da ghrelina total). A ghrelina pode sofrer uma modificação pós-translacional, na qual o resíduo serina-3 liga-se covalentemente a um ácido graxo de cadeia média (em geral a um ácido de oito carbonos, ácido octanóico e menos freqüentemente a um de 10 carbonos, ácido decanóico) e essa acilação é necessária para que o peptídeo ligue-se ao seu receptor^(220;221). Recentemente foi disponibilizado o primeiro ensaio capaz de medir a ghrelina acilada⁽²²⁰⁾, que pode ser mais útil na determinação do seu papel fisiológico do que os ensaios que dosam ambas as formas de ghrelina⁽²²²⁾.

Além disso, foi demonstrado que variações no nível de ghrelina total detectado pelo ensaio da Phoenix Pharmaceuticals em relação ao ensaio usado neste estudo (Linco Research) podiam alcançar diferenças de até 10 vezes nos resultados, devido a modificações na concentração dos padrões fornecidos, tornando muito difícil a comparação de estudos usando ensaios desiguais⁽²²³⁾.

Até a ocasião da redação deste manuscrito, um único estudo⁽²²⁴⁾ avaliou o nível de ghrelina bioativa (acilada) e encontrou diferenças mais acentuadas no nível de ghrelina bioativa de jejum quando comparados grupos de mulheres magras e obesas (com níveis mais elevados nas magras), porém sem diferença entre obesas submetidos a BPG e obesas controle com peso semelhante e estável; além disso, a supressão da ghrelina octanoilada bioativa foi 60-160% maior que a observada com a ghrelina total, mas semelhante entre os três grupos (magras, obesas controle e obesas pós-cirurgia bariátrica).

Em suma, nossas pacientes obesas apresentaram uma redução da secreção de GH, com recuperação parcial após perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica. Essa recuperação apresentou correlações com variações antropométricas e também com variações de parâmetros relacionados à sensibilidade à insulina, embora não esteja estabelecida uma relação causa-efeito, podendo corresponder apenas a um epifenômeno. Não houve diferença nos níveis de ghrelina basal, pós-prandial e médio, o que sugere fortemente que a recuperação parcial do ritmo de GH não foi devida a modificações da curva da ghrelina. Finalmente, nosso estudo sugere que essa inibição da secreção de GH é secundária à obesidade (ou a algum fator a ela relacionado) e não sua desencadeadora, visto que ocorre recuperação parcial após a perda de peso.

6 CONCLUSÕES

Mulheres na pré-menopausa com obesidade mórbida apresentam redução de todos os parâmetros de secreção de GH de 24 h.

Há uma recuperação parcial da secreção após perda de peso induzida seis meses após a cirurgia, indicando que a secreção reduzida não é um fator primário ou causal da obesidade, mas sim uma consequência da obesidade.

Essa recuperação é independente do perfil de secreção de ghrelina.

Anexo A – Identificação, idade, altura, peso e índice de massa corpórea no período pré-operatório de cada paciente

PACIENTES	IDADE (anos)	ALTURA (m)	PESO (kg)	IMC (kg/m ²)
1	41	1,51	136,0	58,9
2	30	1,77	169,0	53,9
3	30	1,70	145,8	61,3
4	42	1,62	150,0	57,2
5	30	1,72	155,0	52,4
6	44	1,64	122,0	45,4
7	28	1,63	152,0	57,2
8	45	1,60	162,2	63,3
9	30	1,53	150,0	62,8
10	24	1,52	109,0	47,2
MÉDIA	34,4 ± 7,7	1,62 ± 0,09	145,1 ± 18,2	55,9 ± 6,2

Os valores estão expressos em média ± desvios-padrão
 IMC: índice de massa corpórea

Anexo B – Peso, índice de massa corpórea, perda de peso absoluta e percentual seis meses após a cirurgia de cada paciente

PACIENTES	PESO (kg)	PERDA DE PESO		IMC (kg/m ²)
		(kg)	(%)	
1	102,0	34,0	25,0	44,7
2	115,3	53,7	31,7	36,8
3	114,0	31,8	21,8	39,5
4	121,7	28,3	18,7	46,4
5	120,9	34,1	22,0	40,9
6	85,0	37,0	30,3	31,6
7	112,0	40,0	26,3	42,2
8	125,0	37,5	23,0	48,8
9	103,9	45,5	30,5	44,3
10	74,0	35,0	32,10	32,0
MÉDIA	107,3 ± 16,6	37,7 ± 7,4	26,2 ± 4,8	40,7 ± 5,8

Os valores estão expressos em média ± desvios-padrão
IMC: índice de massa corpórea

Anexo C – Nível basal; nível médio; número, amplitude média e área média de picos, e área sob a curva acima do valor basal do perfil de secreção de GH de 24 h no período pré-operatório de cada paciente

PACIENTE	NÍVEL DE GH (ng/ml)		PICOS SECRETÓRIOS DE GH			AUCb (ng/ml.min ⁻¹)
	BASAL	MÉDIO	NÚMERO (Nº/24 h)	AMPLITUDE (ng/ml)	ÁREA (ng/ml.min ⁻¹)	
1	0,020	0,055	4	0,342	0,192	0,985
2	0,065	0,214	7	0,741	0,423	3,433
3	0,059	0,386	9	1,221	0,831	7,949
4	0,040	0,198	0	0	0	3,740
5	0,070	0,431	6	2,034	1,340	8,578
6	0,023	0,204	6	1,193	0,695	4,401
7	0,040	0,198	0	0	0	3,740
8	0,025	0,062	4	0,386	0,200	1,004
9	0,037	0,057	2	0,483	0,173	0,484
10	0,052	0,175	6	0,746	0,466	3,048
MÉDIA	0,04 ± 0,02	0,20 ± 0,13	5,5 ± 2,2	0,89 ± 0,57	0,54 ± 0,40	3,74 ± 3,11

Os valores estão expressos em média ± desvios-padrão
AUCb: área sob a curva acima do valor basal; Nº: número

Anexo D – Nível basal; nível médio; número, amplitude média e área média de picos e área sob a curva do perfil de secreção de GH de 24 h no período pós-operatório de cada paciente

PACIENTE	NÍVEL DE GH (ng/ml)		PICOS SECRETÓRIOS DE GH			AUCb (ng/ml.min ⁻¹)
	BASAL	MÉDIO	NÚMERO (Nº/24 h)	AMPLITUDE (ng/ml)	ÁREA (ng/ml.min ⁻¹)	
1	0,033	0,625	10	2,137	1,403	14,485
2	0,079	0,683	13	1,815	0,958	14,262
3	0,104	1,646	11	4,951	3,269	36,762
4	0,043	0,268	6	1,366	0,885	5,432
5	0,077	0,826	10	2,732	1,691	17,731
6	0,088	1,160	11	3,575	2,276	26,065
7	0,022	0,111	4	0,965	0,344	2,163
8	0,117	0,779	12	1,835	1,218	16,039
9	0,035	0,416	7	1,787	1,223	9,271
10	0,127	1,435	12	3,267	2,404	31,791
MÉDIA	0,08 ± 0,03	0,79 ± 0,49	10,8 ± 1,8	2,76 ± 1,12	1,81 ± 0,78	20,8 ± 9,64

AUCb: área sob a curva acima do valor basal; N°: número

Anexo E – Glicemia e insulina de jejum, e cálculo do modelo de homeostase antes da cirurgia de cada paciente

PACIENTES	Glicemia (mg/dl)	Insulina (μ UI/ml)	HOMA-IR
1	80	49	9,6
2	89	92	20,0
3	88	128	27,8
4	96	27	6,3
5	83	41	8,3
6	82	132	26,9
7	91	27	6,2
8	92	53	12,0
9	75	57	10,7
10	99	16	3,9
MÉDIA	88 ± 8	62 ± 41	$13,2 \pm 8,6$

Os valores estão expressos em média $\pm$ desvios-padrão
HOMA-IR: cálculo do modelo de homeostase

Anexo F – Glicemia e insulina de jejum, e cálculo do modelo de homeostase seis meses depois da cirurgia de cada paciente

PACIENTES	Glicemia (mg/dl)	Insulina (μ UI/ml)	HOMA-IR
1	93	21	4,9
2	60	5	0,8
3	73	35	6,2
4	100	6	1,6
5	75	18	3,4
6	85	11	2,3
7	72	29	5,2
8	67	17	2,8
9	61	14	2,1
10	76	3	0,5
MÉDIA	76 ± 13	16 ± 10	$3,0 \pm 1,9$

Os valores estão expressos em média $\pm$ desvios-padrão
HOMA-IR: cálculo do modelo de homeostase

Anexo G – Ghrelina total (pg/ml) antes da cirurgia de cada paciente

PACIENTES	8:00 h	10:00 h	12:00 h	19:00 h	2:00 h
1	1033	492	607	761	594
2	698	641	816	1164	1191
3	756	957	696	535	665
4	572	571	642	624	488
5	973	355	786	700	...
6	810	749	803	644	1005
7	586	1201	887	589	1024
8	850	414	505	530	393
9	521	594	586	782	506
10	622	498	577	477	523
MÉDIA	742 ± 174	647 ± 260	691 ± 126	681 ± 197	710 ± 287

Os valores estão expressos em média ± desvios-padrão

Anexo H – Ghrelina total (pg/ml) seis meses após a cirurgia de cada paciente

PACIENTES	8:00 h	10:00 h	12:00 h	19:00 h	2:00 h
1	1001	...	623	741	593
2	1147	1265	448	258	338
3	991	661	568	598	791
4	769	572	586	626	487
5	...	1127	844	1067	512
6	916	629	728	1073	578
7	590	700	562	707	607
8	497	485	554	698	537
9	506	637	898	628	1212
10	469	1216	450	465	425
MÉDIA	765 ± 258	810 ± 302	627 ± 152	686 ± 246	608 ± 244

Os valores estão expressos em média ± desvios-padrão

Anexo I – Fator de crescimento símile à insulina-I e proteína ligadora do fator de crescimento símile à insulina-3 antes da cirurgia de cada paciente

PACIENTES	IGF-I (ng/ml)	IGFBP-3 (ng/ml)
1	<8	2250
2	<8	1750
3	<8	1990
4	19	2410
5	<8	1350
6	<8	1010
7	<8	1520
8	<8	1320
9	<8	1860
10	13	2690
MÉDIA OU MEDIANA	8 (8-10,5)	1815 (±531)

Os desvios-padrão ou o intervalo interquartil estão apresentados entre parênteses.
 IGF-I: fator de crescimento símile à insulina-I; IGFBP-3: proteína ligadora do fator de crescimento símile à insulina-3

Anexo J – Fator de crescimento símile à insulina-I e proteína ligadora do fator de crescimento símile à insulina-3 seis meses após a cirurgia de cada paciente

PACIENTES	IGF-I (ng/ml)	IGFBP-3 (ng/ml)
1	<8	1130
2	33	2320
3	<8	2010
4	15	1810
5	<8	1140
6	<8	2370
7	<8	586
8	23	1670
9	21	1690
10	110	1930
MÉDIA OU MEDIANA	11,5 (8-28)	1665 ($\pm$ 564)

Os desvios-padrão ou o intervalo interquartil estão apresentados entre parênteses
 IGF-I: fator de crescimento símile à insulina-I; IGFBP-3: proteína ligadora do fator de crescimento símile à insulina-3

Anexo K – Dosagens de fator de crescimento símile à insulina-I e proteína ligadora do fator de crescimento símile à insulina-3 em pacientes femininas com idade e índice de massa corporal semelhantes

PACIENTES	IDADE	IMC (kg/m ²)	IGF-I (ng/ml)	IGFBP-3 (ng/ml)
1	46	70,8	110	3550
2	32	59,7	170	3440
3	43	51,7	100	3070
4	49	55,9	200	3680
5	25	53,6	85	1620
6	24	42,6	180	2930

Anexo L – Correlação entre ghrelina média e variáveis antropométricas e metabólicas em todas as pacientes (n = 20).

VARIÁVEL	GHRELINA MÉDIA (pg/ml)
PESO (kg)	0,80 (-0,062)
IMC (kg/m ²)	0,49 (-0,165)
MA (kg)	0,80 (0,062)
MA (%)	0,62 (0,12)
MM (kg)	0,82 (0,055)
MM (%)	0,61 (-0,12)
CA (cm)	0,61 (0,12)
TMR (kcal/24h)	0,51 (0,16)
GLICEMIA (mg/dl)	0,68 (-0,10)
INSULINA (μUI/ml)	0,22 (0,29)
HOMA-IR	0,23 (0,28)
GH (ng/ml)	0,62 (0,118)

AUCb: área sob a curva acima do valor basal; IMC: índice de massa corpórea; MA: massa adiposa; MM: massa magra; CA: circunferência abdominal; TMR: taxa metabólica de repouso; HOMA-IR: cálculo do modelo de homeostase; GH: hormônio de crescimento

São apresentados o valor de p e do coeficiente de correlação (r, entre parênteses)

Anexo M – Figuras com 73 dosagens do perfil de secreção de GH antes (linha azul) e após a cirurgia (linha vermelha) de cada paciente

8 REFERÊNCIAS

- (1) Closset J, Smal J, Gomez F, Hennen G. Purification of the 22000- and 20000-mol.wt. forms of human somatotropin and characterization of their binding to liver and mammary binding sites. *Biochem J* 1983; 214(3):885-892.
- (2) DeNoto FM, Moore DD, Goodman HM. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 1981; 9(15):3719-3730.
- (3) Berneis K, Keller U. Metabolic actions of growth hormone: direct and indirect. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; 10(3):337-352.
- (4) Pombo M, Pombo CM, Garcia A, Caminos E, Gualillo O, Alvarez CV et al. Hormonal control of growth hormone secretion. *Horm Res* 2001; 55 Suppl 1:11-16.
- (5) Iranmanesh A, Veldhuis JD. Clinical pathophysiology of the somatotrophic (GH) axis in adults. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992; 21(4):783-816.
- (6) Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 1998; 19(6):717-797.
- (7) Hartman ML, Clayton PE, Johnson ML, Celniker A, Perlman AJ, Alberti KG et al. A low dose euglycemic infusion of recombinant human insulin-like growth factor I rapidly suppresses fasting-enhanced pulsatile growth hormone secretion in humans. *J Clin Invest* 1993; 91(6):2453-2462.
- (8) Muller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* 1999; 79(2):511-607.
- (9) Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1997; 336(9):633-640.
- (10) Massara F, Ghigo E, Molinatti P, Mazza E, Locatelli V, Muller EE et al. Potentiation of cholinergic tone by pyridostigmine bromide re-instates and potentiates the growth hormone responsiveness to intermittent administration of growth hormone-releasing factor in man. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986; 113(1):12-16.

-
- (11) Massara F, Ghigo E, Demisli K, Tangolo D, Mazza E, Locatelli V et al. Cholinergic involvement in the growth hormone releasing hormone-induced growth hormone release: studies in normal and acromegalic subjects. *Neuroendocrinology* 1986; 43(6):670-675.
 - (12) Page MD, Dieguez C, Valcavi R, Edwards C, Hall R, Scanlon MF. Growth hormone (GH) responses to arginine and L-dopa alone and after GHRH pretreatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988; 28(5):551-558.
 - (13) Valcavi R, Dieguez C, Page MD, Zini M, Casoli P, Portioli I et al. Alpha-2-adrenergic pathways release growth hormone via a non-GRF-dependent mechanism in normal human subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988; 29(3):309-316.
 - (14) Cella SG, Locatelli V, De G, V, Pellini C, Pintor C, Muller EE. In vivo studies with growth hormone (GH)-releasing factor and clonidine in rat pups: ontogenetic development of their effect on GH release and synthesis. *Endocrinology* 1986; 119(3):1164-1170.
 - (15) Cozzi MG, Zanini A, Locatelli V, Cella SG, Muller EE. Growth hormone-releasing hormone and clonidine stimulate biosynthesis of growth hormone in neonatal pituitaries. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 138(3):1223-1230.
 - (16) Pijl H, Koppeschaar HP, Willekens FL, Frolich M, Meinders AE. The influence of serotonergic neurotransmission on pituitary hormone release in obese and non-obese females. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993; 128(4):319-324.
 - (17) Grilli R, Sibilis V, Torsello A, Pagani F, Guidi M, Luoni M et al. Role of the neuronal histaminergic system in the regulation of somatotrophic function: comparison between the neonatal and the adult rat. *J Endocrinol* 1996; 151(2):195-201.
 - (18) Netti C, Sibilis V, Guidobono F, Pecile A. Influence of brain histamine on growth hormone secretion induced by alpha-2-receptor activation. *Neuroendocrinology* 1993; 57(6):1066-1070.
 - (19) Netti C, Guidobono F, Sibilis V, Pagani F, Villa I, Pecile A. Effects of selective histamine H3-receptor ligands on prolactin and growth hormone secretion in the rat. *Agents Actions* 1991; 33(1-2):147-149.
 - (20) Netti C, Guidobono F, Olgiati VR, Sibilis V, Pagani F, Pecile A. Influence of brain histaminergic system on episodic growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 1982; 35(1):43-47.
 - (21) Netti C, Guidobono F, Sibilis V, Olgiati VR, Pagani F, Pecile A. Failure of somatostatin antiserum to reverse histamine-induced inhibition of pulsatile growth hormone secretion. *Horm Res* 1984; 19(1):12-17.

-
- (22) Netti C, Guidobono F, Olgiati VR, Sibilia V, Pecile A. Histamine agonist and antagonist drugs: interference with CNS control of GH release in rats. *Horm Res* 1981; 14(3):180-191.
 - (23) Abe H, Kato Y, Chihara K, Ohgo S, Iwasaki Y. Growth hormone release by gamma-aminobutyric acid (GABA) and gamma-amino-beta-hydroxybutyric acid (GABOB) in the rat. *Endocrinol Jpn* 1977; 24(2):229-231.
 - (24) Cocchi D, Casanueva F, Locatelli V, Apud J, Martinez-Campos A, Civati C et al. GABAergic mechanisms in the control of PRL and GH release. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1981; 26:247-259.
 - (25) Racagni G, Apud JA, Masotto C, Rovescalli AC, Cocchi D, Locatelli V et al. The hypothalamo-pituitary GABAergic regulation of prolactin release in the rat. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1986; 42:103-117.
 - (26) Spencer GS, Berry CJ, Bass JJ. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in sheep. VII. Effects of GABA. *Regul Pept* 1994; 52(3):181-186.
 - (27) Steardo L, Iovino M, Monteleone P, Agrusta M, Orio F. Pharmacological evidence for a dual GABAergic regulation of growth hormone release in humans. *Life Sci* 1986; 39(11):979-985.
 - (28) Chan YY, Clifton DK, Steiner RA. Role of NPY neurones in GH-dependent feedback signalling to the brain. *Horm Res* 1996; 45 Suppl 1:12-14.
 - (29) Chan YY, Grafstein-Dunn E, Delemarre-van de Waal HA, Burton KA, Clifton DK, Steiner RA. The role of galanin and its receptor in the feedback regulation of growth hormone secretion. *Endocrinology* 1996; 137(12):5303-5310.
 - (30) Kamegai J, Minami S, Sugihara H, Hasegawa O, Higuchi H, Wakabayashi I. Growth hormone receptor gene is expressed in neuropeptide Y neurons in hypothalamic arcuate nucleus of rats. *Endocrinology* 1996; 137(5):2109-2112.
 - (31) Niimi M, Takahara J, Sato M, Kawanishi K. Immunohistochemical identification of galanin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Neuroendocrinology* 1990; 51(5):572-575.
 - (32) Saito H, Saito S, Yamazaki R, Hosoi E. Clinical value of radioimmunoassay of plasma growth-hormone-releasing factor. *Lancet* 1984; 2(8399):401-402.
 - (33) Brodows RG, Pi-Sunyer FX, Campbell RG. Neural control of counter-regulatory events during glucopenia in man. *J Clin Invest* 1973; 52(8):1841-1844.

-
- (34) Muller EE, Rolla M, Ghigo E, Belliti D, Arvat E, Andreoni A et al. Involvement of brain catecholamines and acetylcholine in growth hormone hypersecretory states. Pathophysiological, diagnostic and therapeutic implications. *Drugs* 1995; 50(5):805-837.
 - (35) Besset A, Bonardet A, Rondouin G, Descomps B, Passouant P. Increase in sleep related GH and Prl secretion after chronic arginine aspartate administration in man. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1982; 99(1):18-23.
 - (36) Blackard WG, Heidingsfelder SA. Effect of adrenergic receptor blockade on nicotinic acid-induced plasma FFA rebound. *Metabolism* 1969; 18(3):226-233.
 - (37) Blackard WG, Boylen CT, Hinson TC, Nelson NC. Effect of lipid and ketone infusions on insulin-induced growth hormone elevations in rhesus monkeys. *Endocrinology* 1969; 85(6):1180-1185.
 - (38) Casanueva F, Villanueva L, Penalva A, Vila T, Cabezas-Cerrato J. Free fatty acid inhibition of exercise-induced growth hormone secretion. *Horm Metab Res* 1981; 13(6):348-350.
 - (39) Casanueva FF, Villanueva L, Dieguez C, Diaz Y, Cabranes JA, Szoke B et al. Free fatty acids block growth hormone (GH) releasing hormone-stimulated GH secretion in man directly at the pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65(4):634-642.
 - (40) Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1980; 106(3):663-667.
 - (41) Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 1984; 114(5):1537-1545.
 - (42) Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Hong A, Newlander K. Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology* 1984; 114(5):1531-1536.
 - (43) Cheng K, Chan WW, Butler B, Wei L, Schoen WR, Wyvratt MJ, Jr. et al. Stimulation of growth hormone release from rat primary pituitary cells by L-692,429, a novel non-peptidyl GH secretagogue. *Endocrinology* 1993; 132(6):2729-2731.
 - (44) Patchett AA, Nargund RP, Tata JR, Chen MH, Barakat KJ, Johnston DB et al. Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(15):7001-7005.

-
- (45) Schoen WR, Pisano JM, Prendergast K, Wyvratt MJ, Jr., Fisher MH, Cheng K et al. A novel 3-substituted benzazepinone growth hormone secretagogue (L-692,429). *J Med Chem* 1994; 37(7):897-906.
- (46) Smith RG, Cheng K, Schoen WR, Pong SS, Hickey G, Jacks T et al. A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science* 1993; 260(5114):1640-1643.
- (47) Camanni F, Ghigo E, Arvat E. Growth hormone-releasing peptides and their analogues. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19(1):47-72.
- (48) Chapman IM, Bach MA, Van Cauter E, Farmer M, Krupa D, Taylor AM et al. Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(12):4249-4257.
- (49) Ghigo E, Arvat E, Gianotti L, Grottoli S, Rizzi G, Ceda GP et al. Short-term administration of intranasal or oral Hexarelin, a synthetic hexapeptide, does not desensitize the growth hormone responsiveness in human aging. *Eur J Endocrinol* 1996; 135(4):407-412.
- (50) Ghigo E, Arvat E, Muccioli G, Camanni F. Growth hormone-releasing peptides. *Eur J Endocrinol* 1997; 136(5):445-460.
- (51) Hickey GJ, Jacks TM, Schleim KD, Frazier E, Chen HY, Krupa D et al. Repeat administration of the GH secretagogue MK-0677 increases and maintains elevated IGF-I levels in beagles. *J Endocrinol* 1997; 152(2):183-192.
- (52) Svensson J, Lonn L, Jansson JO, Murphy G, Wyss D, Krupa D et al. Two-month treatment of obese subjects with the oral growth hormone (GH) secretagogue MK-677 increases GH secretion, fat-free mass, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(2):362-369.
- (53) Murphy MG, Plunkett LM, Gertz BJ, He W, Wittreich J, Polvino WM et al. MK-677, an orally active growth hormone secretagogue, reverses diet-induced catabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(2):320-325.
- (54) Bowers CY, Reynolds GA, Durham D, Barrera CM, Pezzoli SS, Thorner MO. Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(4):975-982.
- (55) Tiulpakov AN, Brook CG, Pringle PJ, Peterkova VA, Volevodz NN, Bowers CY. GH responses to intravenous bolus infusions of GH releasing hormone and GH releasing peptide 2 separately and in combination in adult volunteers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43(3):347-350.
- (56) Massoud AF, Hindmarsh PC, Brook CG. Hexarelin-induced growth hormone, cortisol, and prolactin release: a dose-response study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(12):4338-4341.

-
- (57) Micic D, Popovic V, Kendereski A, Macut D, Casanueva FF, Dieguez C. Growth hormone secretion after the administration of GHRP-6 or GHRH combined with GHRP-6 does not decline in late adulthood. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 42(2):191-194.
- (58) Cordido F, Penalva A, Dieguez C, Casanueva FF. Massive growth hormone (GH) discharge in obese subjects after the combined administration of GH-releasing hormone and GHRP-6: evidence for a marked somatotroph secretory capability in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76(4):819-823.
- (59) Locke W, Kirgis HD, Bowers CY, Abdoh AA. Intracerebroventricular growth-hormone-releasing peptide-6 stimulates eating without affecting plasma growth hormone responses in rats. *Life Sci* 1995; 56(16):1347-1352.
- (60) Dickson SL, Doutrelant-Viltart O, Dyball RE, Leng G. Retrogradely labelled neurosecretory neurones of the rat hypothalamic arcuate nucleus express Fos protein following systemic injection of GH-releasing peptide-6. *J Endocrinol* 1996; 151(2):323-331.
- (61) Dickson SL, Luckman SM. Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 1997; 138(2):771-777.
- (62) Codd EE, Shu AY, Walker RF. Binding of a growth hormone releasing hexapeptide to specific hypothalamic and pituitary binding sites. *Neuropharmacology* 1989; 28(10):1139-1144.
- (63) Sethumadhavan K, Veeraragavan K, Bowers CY. Demonstration and characterization of the specific binding of growth hormone-releasing peptide to rat anterior pituitary and hypothalamic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178(1):31-37.
- (64) Adams EF, Huang B, Buchfelder M, Howard A, Smith RG, Feighner SD et al. Presence of growth hormone secretagogue receptor messenger ribonucleic acid in human pituitary tumors and rat GH3 cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(2):638-642.
- (65) Pong SS, Chaung LY, Dean DC, Nargund RP, Patchett AA, Smith RG. Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol Endocrinol* 1996; 10(1):57-61.
- (66) Smith RG, Pong SS, Hickey G, Jacks T, Cheng K, Leonard R et al. Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51:261-285.
- (67) 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(5277):974-977.

-
- (68) Yokote R, Sato M, Matsubara S, Ohye H, Niimi M, Murao K et al. Molecular cloning and gene expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues. *Peptides* 1998; 19(1):15-20.
- (69) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402(6762):656-660.
- (70) Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T et al. Ghrelin, a 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(11):4255-4261.
- (71) Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(8):1013-1021.
- (72) Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G et al. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol* 2003; 162(2):645-654.
- (73) Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R et al. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3):1300-1308.
- (74) 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(1):9-14.
- (75) 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(6):2988.
- (76) Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(10):3803-3807.
- (77) Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M et al. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(9):4552.
- (78) Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(12):4908-4911.
- (79) 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(3):1169-1174.
- (80) Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijjima A, Matsuo H et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123(4):1120-1128.
- (81) Alvarez-Castro P, Isidro ML, Garcia-Buela J, Leal-Cerro A, Broglio F, Tassone F et al. Marked GH secretion after ghrelin alone or combined with GH-releasing hormone (GHRH) in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61(2):250-255.
- (82) Poykko SM, Ukkola O, Kauma H, Kellokoski E, Horkko S, Kesaniemi YA. The negative association between plasma ghrelin and IGF-I is modified by obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005; 48(2):309-316.
- (83) Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 2002; 440(2-3):235-254.
- (84) Wren AM, Small CJ, Fribbens CV, Neary NM, Ward HL, Seal LJ et al. The hypothalamic mechanisms of the hypophysiologic action of ghrelin. *Neuroendocrinology* 2002; 76(5):316-324.
- (85) Rasmussen MH, Hvidberg A, Juul A, Main KM, Gotfredsen A, Skakkebaek NE et al. Massive weight loss restores 24-hour growth hormone release profiles and serum insulin-like growth factor-I levels in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(4):1407-1415.
- (86) Jaffe CA, Ocampo-Lim B, Guo W, Krueger K, Sugahara I, DeMott-Friberg R et al. Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *J Clin Invest* 1998; 102(1):153-164.
- (87) Ho KY, Evans WS, Blizzard RM, Veldhuis JD, Merriam GR, Samojlik E et al. Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(1):51-58.
- (88) Copinschi G, Wegienka LC, Hane S, Forsham PH. Effect of arginine on serum levels of insulin and growth hormone in obese subjects. *Metabolism* 1967; 16(6):485-491.
- (89) Crockford PM, Salmon PA. Hormones and obesity: changes in insulin and growth hormone secretion following surgically induced weight loss. *Can Med Assoc J* 1970; 103(2):147-150.
- (90) Ball MF, el Khodary AZ, Canary JJ. Growth hormone response in the thinned obese. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34(3):498-511.

-
- (91) Laurian L, Oberman Z, Ayalon D, Cordova T, Herzberg M, Horer E et al. Under-responsiveness of growth hormone secretion after L-dopa and deep sleep stimulation in obese subjects. *Isr J Med Sci* 1975; 11(5):482-487.
- (92) Williams T, Berelowitz M, Joffe SN, Thorner MO, Rivier J, Vale W et al. Impaired growth hormone responses to growth hormone-releasing factor in obesity. A pituitary defect reversed with weight reduction. *N Engl J Med* 1984; 311(22):1403-1407.
- (93) Tanaka K, Inoue S, Numata K, Okazaki H, Nakamura S, Takamura Y. Very-low-calorie diet-induced weight reduction reverses impaired growth hormone secretion response to growth hormone-releasing hormone, arginine, and L-dopa in obesity. *Metabolism* 1990; 39(9):892-896.
- (94) Veldhuis JD, Iranmanesh A, Ho KK, Waters MJ, Johnson ML, Lizarralde G. Dual defects in pulsatile growth hormone secretion and clearance subserve the hyposomatotropism of obesity in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(1):51-59.
- (95) Iranmanesh A, Lizarralde G, Veldhuis JD. Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73(5):1081-1088.
- (96) Hochberg Z, Hertz P, Colin V, Ish-Shalom S, Yeshurun D, Youdim MB et al. The distal axis of growth hormone (GH) in nutritional disorders: GH-binding protein, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptors in obesity and anorexia nervosa. *Metabolism* 1992; 41(1):106-112.
- (97) Minuto F, Barreca A, Del Monte P, Fortini P, Resentini M, Morabito F et al. Spontaneous growth hormone and somatomedin-C/insulin-like growth factor-I secretion in obese subjects during puberty. *J Endocrinol Invest* 1988; 11(7):489-495.
- (98) Frystyk J, Vestbo E, Skjaerbaek C, Mogensen CE, Orskov H. Free insulin-like growth factors in human obesity. *Metabolism* 1995; 44(10 Suppl 4):37-44.
- (99) Nam SY, Lee EJ, Kim KR, Cha BS, Song YD, Lim SK et al. Effect of obesity on total and free insulin-like growth factor (IGF)-1, and their relationship to IGF-binding protein (BP)-1, IGFBP-2, IGFBP-3, insulin, and growth hormone. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21(5):355-359.
- (100) Argente J, Caballo N, Barrios V, Pozo J, Munoz MT, Chowen JA et al. Multiple endocrine abnormalities of the growth hormone and insulin-like growth factor axis in prepubertal children with exogenous obesity: effect of short- and long-term weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(7):2076-2083.

-
- (101) Le Roith D, Blakesley VA. The yin and the yang of the IGF system: immunological manifestations of GH resistance. *Eur J Endocrinol* 1997; 136(1):33-34.
- (102) Rasmussen MH, Frystyk J, Andersen T, Breum L, Christiansen JS, Hilsted J. The impact of obesity, fat distribution, and energy restriction on insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-binding protein-3, insulin, and growth hormone. *Metabolism* 1994; 43(3):315-319.
- (103) Ho KY, Veldhuis JD, Johnson ML, Furlanetto R, Evans WS, Alberti KG et al. Fasting enhances growth hormone secretion and amplifies the complex rhythms of growth hormone secretion in man. *J Clin Invest* 1988; 81(4):968-975.
- (104) Riedel M, Hoeft B, Blum WF, von zur MA, Brabant G. Pulsatile growth hormone secretion in normal-weight and obese men: differential metabolic regulation during energy restriction. *Metabolism* 1995; 44(5):605-610.
- (105) Maccario M, Tassone F, Gauna C, Oleandri SE, Aimaretti G, Procopio M et al. Effects of short-term administration of low-dose rhGH on IGF-I levels in obesity and Cushing's syndrome: indirect evaluation of sensitivity to GH. *Eur J Endocrinol* 2001; 144(3):251-256.
- (106) Gianotti L, Pivetti S, Lanfranco F, Tassone F, Navone F, Vittori E et al. Concomitant impairment of growth hormone secretion and peripheral sensitivity in obese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(11):5052-5057.
- (107) Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 1987; 330(6148):537-543.
- (108) Vahl N, Moller N, Lauritzen T, Christiansen JS, Jorgensen JO. Metabolic effects and pharmacokinetics of a growth hormone pulse in healthy adults: relation to age, sex, and body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(11):3612-3618.
- (109) Franco C, Bengtsson BA, Johannsson G. Visceral obesity and the role of the somatotrophic axis in the development of metabolic complications. *Growth Horm IGF Res* 2001; 11 Suppl A:S97-102.
- (110) Johannsson G, Bengtsson BA. Growth hormone and the metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest* 1999; 22(5 Suppl):41-46.
- (111) Johannsson G, Bjarnason R, Bramnert M, Carlsson LM, Degerblad M, Manhem P et al. The individual responsiveness to growth hormone (GH) treatment in GH-deficient adults is dependent on the level of GH-binding protein, body mass index, age, and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(4):1575-1581.

-
- (112) Williams T, Berelowitz M, Joffe SN, Thorner MO, Rivier J, Vale W et al. Impaired growth hormone responses to growth hormone-releasing factor in obesity. A pituitary defect reversed with weight reduction. *N Engl J Med* 1984; 311(22):1403-1407.
- (113) Kelijman M, Frohman LA. Enhanced growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone after dietary manipulation in obese and nonobese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66(3):489-494.
- (114) Pijl H, Langendonk JG, Burggraaf J, Frolich M, Cohen AF, Veldhuis JD et al. Altered neuroregulation of GH secretion in visceraally obese premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(11):5509-5515.
- (115) De Marinis L, Bianchi A, Mancini A, Gentilella R, Perrelli M, Giampietro A et al. Growth hormone secretion and leptin in morbid obesity before and after biliopancreatic diversion: relationships with insulin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(1):174-180.
- (116) Carlini VP, Monzon ME, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(5):739-743.
- (117) Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Fujimiya M et al. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* 2001; 74(3):143-147.
- (118) Carlini VP, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(3):635-641.
- (119) 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(6817):194-198.
- (120) Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141(11):4325-4328.
- (121) Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillon WS, Seal LJ, Cohen MA et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 2001; 50(11):2540-2547.
- (122) Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407(6806):908-913.
- (123) Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(12):5992.

-
- (124) 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(8):493-495.
- (125) Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50(8):1714-1719.
- (126) 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(3):1319-1324.
- (127) English PJ, Ghattei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(6):2984.
- (128) Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrere B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(4):1902.
- (129) Spranger J, Ristow M, Otto B, Heldwein W, Tschop M, Pfeiffer AF et al. Post-prandial decrease of human plasma ghrelin in the absence of insulin. *J Endocrinol Invest* 2003; 26(8):RC19-RC22.
- (130) Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E et al. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8):3997-4000.
- (131) McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(4):1630-1635.
- (132) Mohlig M, Spranger J, Otto B, Ristow M, Tschop M, Pfeiffer AF. Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol Invest* 2002; 25(11):RC36-RC38.
- (133) Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50(4):707-709.
- (134) Shiiya 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(1):240-244.
- (135) 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(1):17-22.

-
- (136) Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M et al. Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2002; 146(6):R1-R3.
- (137) Cuntz U, Fruhauf E, Wawarta R, Tschop M, Folwaczny C, Riepl R et al. A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa. *Am Clin Lab* 2002; 21(4):22-23.
- (138) Otto B, Cuntz U, Fruhauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL et al. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(5):669-673.
- (139) Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 346(21):1623-1630.
- (140) Holdstock C, Engstrom BE, Ohrvall M, Lind L, Sundbom M, Karlsson FA. Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: effect of gastric bypass surgery in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7):3177-3183.
- (141) Holdstock C, Engstrom BE, Ohrvall M, Lind L, Sundbom M, Karlsson FA. Effect of bariatric surgery on adipose tissue regulatory peptides and growth hormone secretion. *Asia Pac J Clin Nutr* 2004; 13(Suppl):S41.
- (142) Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 2004; 12(6):962-971.
- (143) Morinigo R, Casamitjana R, Moize V, Lacy AM, Delgado S, Gomis R et al. Short-term effects of gastric bypass surgery on circulating ghrelin levels. *Obes Res* 2004; 12(7):1108-1116.
- (144) Geloneze B, Tambascia MA, Pilla VF, Geloneze SR, Repetto EM, Pareja JC. Ghrelin: a gut-brain hormone: effect of gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2003; 13(1):17-22.
- (145) Fruhbeck G, Diez-Caballero A, Gil MJ, Montero I, Gomez-Ambrosi J, Salvador J et al. The decrease in plasma ghrelin concentrations following bariatric surgery depends on the functional integrity of the fundus. *Obes Surg* 2004; 14(5):606-612.
- (146) Stoeckli R, Chanda R, Langer I, Keller U. Changes of body weight and plasma ghrelin levels after gastric banding and gastric bypass. *Obes Res* 2004; 12(2):346-350.
- (147) Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(4):1594-1602.

-
- (148) Nijhuis J, Van Dielen FM, Buurman WA, Greve JW. Ghrelin, leptin and insulin levels after restrictive surgery: a 2-year follow-up study. *Obes Surg* 2004; 14(6):783-787.
- (149) Hanusch-Enserer U, Cauza E, Brabant G, Dunky A, Rosen H, Pacini G et al. Plasma ghrelin in obesity before and after weight loss after laparoscopic adjustable gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(7):3352-3358.
- (150) Hanusch-Enserer U, Brabant G, Roden M. Ghrelin concentrations in morbidly obese patients after adjustable gastric banding. *N Engl J Med* 2003; 348(21):2159-2160.
- (151) Adami GF, Cordera R, Marinari G, Lamerini G, Andraghetti G, Scopinaro N. Plasma ghrelin concentration in the short-term following biliopancreatic diversion. *Obes Surg* 2003; 13(6):889-892.
- (152) Adami GF, Cordera R, Andraghetti G, Camerini GB, Marinari GM, Scopinaro N. Changes in serum ghrelin concentration following biliopancreatic diversion for obesity. *Obes Res* 2004; 12(4):684-687.
- (153) Fruhbeck G, Diez CA, Gil MJ. Fundus functionality and ghrelin concentrations after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004; 350(3):308-309.
- (154) Costa A.P.A.C. Estudo da variação do ritmo de secreção de 24 horas de leptina em pacientes obesas mórbidas antes e após cirurgia bariátrica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2002.
- (155) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7):412-419.
- (156) Merriam GR, Waechter KW. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am J Physiol* 1982; 243:E310-E318.
- (157) Must A, Dallal GE, Dietz WH. Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht²) and triceps skinfold thickness. *Am J Clin Nutr* 1991; 53(4):839-846.
- (158) Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GA, Bain RP. Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *J Clin Invest* 1981; 67(5):1361-1369.
- (159) Roth J, Glick SM, Yalow RS, Berson SA. Secretion of human growth hormone: physiologic and experimental modification. *Metabolism* 1963; 12:577-579.

-
- (160) Van Cauter E, Kerkhofs M, Caufriez A, Van Onderbergen A, Thorner MO, Copinschi G. A quantitative estimation of growth hormone secretion in normal man: reproducibility and relation to sleep and time of day. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74(6):1441-1450.
- (161) Weltman A, Weltman JY, Hartman ML, Abbott RD, Rogol AD, Evans WS et al. Relationship between age, percentage body fat, fitness, and 24-hour growth hormone release in healthy young adults: effects of gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(3):543-548.
- (162) Van Dam PS, Smid HE, de Vries WR, Niesink M, Bolscher E, Waasdorp EJ et al. Reduction of free fatty acids by acipimox enhances the growth hormone (GH) responses to GH-releasing peptide 2 in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(12):4706-4711.
- (163) Bonert VS, Elashoff JD, Barnett P, Melmed S. Body mass index determines evoked growth hormone (GH) responsiveness in normal healthy male subjects: diagnostic caveat for adult GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(7):3397-3401.
- (164) Qu XD, Gaw G, I, Al Sayed MY, Cohan P, Christenson PD, Swerdloff RS et al. Influence of body mass index and gender on growth hormone (GH) responses to GH-releasing hormone plus arginine and insulin tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(3):1563-1569.
- (165) Kanaley JA, Weatherup-Dentes MM, Jaynes EB, Hartman ML. Obesity attenuates the growth hormone response to exercise. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(9):3156-3161.
- (166) Weltman A, Despres JP, Clasey JL, Weltman JY, Wideman L, Kanaley J et al. Impact of abdominal visceral fat, growth hormone, fitness, and insulin on lipids and lipoproteins in older adults. *Metabolism* 2003; 52(1):73-80.
- (167) Buijs MM, Burggraaf J, Wijbrandts C, de Kam ML, Frolich M, Cohen AF et al. Blunted lipolytic response to fasting in abdominally obese women: evidence for involvement of hyposomatotropism. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(3):544-550.
- (168) Vahl N, Jorgensen JO, Jurik AG, Christiansen JS. Abdominal adiposity and physical fitness are major determinants of the age associated decline in stimulated GH secretion in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(6):2209-2215.
- (169) Vahl N, Jorgensen JO, Skjaerbaek C, Veldhuis JD, Orskov H, Christiansen JS. Abdominal adiposity rather than age and sex predicts mass and regularity of GH secretion in healthy adults. *Am J Physiol* 1997; 272(6 Pt 1):E1108-E1116.

-
- (170) Clasey JL, Weltman A, Patrie J, Weltman JY, Pezzoli S, Bouchard C et al. Abdominal visceral fat and fasting insulin are important predictors of 24-hour GH release independent of age, gender, and other physiological factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(8):3845-3852.
- (171) Veldhuis JD, Iranmanesh A. Physiological regulation of the human growth hormone (GH)-insulin-like growth factor type I (IGF-I) axis: predominant impact of age, obesity, gonadal function, and sleep. *Sleep* 1996; 19(10 Suppl):S221-S224.
- (172) Fors H, Matsuoka H, Bosaeus I, Rosberg S, Wikland KA, Bjarnason R. Serum leptin levels correlate with growth hormone secretion and body fat in children. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(10):3586-3590.
- (173) Miller KK, Biller BM, Lipman JG, Bradwin G, Rifai N, Klibanski A. Truncal adiposity, relative growth hormone deficiency, and cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):768-774.
- (174) Cordido F, Casanueva FF, Dieguez C. Cholinergic receptor activation by pyridostigmine restores growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone administration in obese subjects: evidence for hypothalamic somatostatinergic participation in the blunted GH release of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68(2):290-293.
- (175) Heptulla R, Smitten A, Teague B, Tamborlane WV, Ma YZ, Caprio S. Temporal patterns of circulating leptin levels in lean and obese adolescents: relationships to insulin, growth hormone, and free fatty acids rhythmicity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(1):90-96.
- (176) Ozata M, Dieguez C, Casanueva FF. The inhibition of growth hormone secretion presented in obesity is not mediated by the high leptin levels: a study in human leptin deficiency patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(1):312-316.
- (177) Melmed S. Insulin suppresses growth hormone secretion by rat pituitary cells. *J Clin Invest* 1984; 73(5):1425-1433.
- (178) Heald AH, Cruickshank JK, Riste LK, Cade JE, Anderson S, Greenhalgh A et al. Close relation of fasting insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) with glucose tolerance and cardiovascular risk in two populations. *Diabetologia* 2001; 44(3):333-339.
- (179) Janssen JA, Stolk RP, Pols HA, Grobbee DE, Lamberts SW. Serum total IGF-I, free IGF-I, and IGFB-1 levels in an elderly population: relation to cardiovascular risk factors and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(2):277-282.

-
- (180) Gibson JM, Westwood M, Young RJ, White A. Reduced insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) levels correlate with increased cardiovascular risk in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(2):860-863.
- (181) Lemne C, Brismar K. Insulin-like growth factor binding protein-1 as a marker of the metabolic syndrome--a study in borderline hypertension. *Blood Press* 1998; 7(2):89-95.
- (182) Hong Y, Pedersen NL, Brismar K, Hall K, de Faire U. Quantitative genetic analyses of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-1, and insulin levels in middle-aged and elderly twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(5):1791-1797.
- (183) Wolk K, Larsson SC, Vessby B, Wolk A, Brismar K. Metabolic, anthropometric, and nutritional factors as predictors of circulating insulin-like growth factor binding protein-1 levels in middle-aged and elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(4):1879-1884.
- (184) Holly JM. The physiological role of IGFBP-1. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991; 124 Suppl 2:55-62.
- (185) Underwood LE, Thissen JP, Lemozy S, Ketelslegers JM, Clemmons DR. Hormonal and nutritional regulation of IGF-I and its binding proteins. *Horm Res* 1994; 42(4-5):145-151.
- (186) Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997; 18(6):801-831.
- (187) Lemozy S, Pucilowska JB, Underwood LE. Reduction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in protein-restricted rats is associated with differential regulation of IGF-binding protein messenger ribonucleic acids in liver and kidney, and peptides in liver and serum. *Endocrinology* 1994; 135(2):617-623.
- (188) Liew CF, Wise SD, Yeo KP, Lee KO. Insulin-like growth factor binding protein-1 is independently affected by ethnicity, insulin sensitivity, and leptin in healthy, glucose-tolerant young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(3):1483-1488.
- (189) Giustina A, Bresciani E, Tassi C, Girelli A, Valentini U. Effect of pyridostigmine on the growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in lean and obese type II Diabetic patients. *Metabolism* 1994; 43(7):893-898.
- (190) Franek E, Schaefer F, Bergis K, Feneberg R, Ritz E. Abnormal pulsatile secretion of growth hormone in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 47(4):471-478.

-
- (191) Laron Z, Avitzur Y, Klinger B. Carbohydrate metabolism in primary growth hormone resistance (Laron syndrome) before and during insulin-like growth factor-I treatment. *Metabolism* 1995; 44(10 Suppl 4):113-118.
- (192) Johannsson G, Albertsson-Wikland K, Bengtsson BA. Discontinuation of growth hormone (GH) treatment: metabolic effects in GH-deficient and GH-sufficient adolescent patients compared with control subjects. Swedish Study Group for Growth Hormone Treatment in Children. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(12):4516-4524.
- (193) Langendonk JG, Meinders AE, Burggraaf J, Frolich M, Roelen CA, Schoemaker RC et al. Influence of obesity and body fat distribution on growth hormone kinetics in humans. *Am J Physiol* 1999; 277(5 Pt 1):E824-E829.
- (194) Buijs MM, de Leeuw PW, Houben AJ, Kroon AA, Frolich M, Pijl H et al. Renal contribution to increased clearance of exogenous growth hormone in obese hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):795-799.
- (195) Vance ML. Metabolic status and growth hormone secretion in man. *J Pediatr Endocrinol* 1993; 6(3-4):267-272.
- (196) Imaki T, Shibasaki T, Shizume K, Masuda A, Hotta M, Kiyosawa Y et al. The effect of free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing hormone-mediated GH secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60(2):290-293.
- (197) Maccario M, Procopio M, Loche S, Cappa M, Martina V, Camanni F et al. Interaction of free fatty acids and arginine on growth hormone secretion in man. *Metabolism* 1994; 43(2):223-226.
- (198) Pontiroli AE, Lanzi R, Monti LD, Sandoli E, Pozza G. Growth hormone (GH) autofeedback on GH response to GH-releasing hormone. Role of free fatty acids and somatostatin. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(2):492-495.
- (199) Cordido F, Peino R, Penalva A, Alvarez CV, Casanueva FF, Dieguez C. Impaired growth hormone secretion in obese subjects is partially reversed by acipimox-mediated plasma free fatty acid depression. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(3):914-918.
- (200) Cordido F, Fernandez T, Martinez T, Penalva A, Peino R, Casanueva FF et al. Effect of acute pharmacological reduction of plasma free fatty acids on growth hormone (GH) releasing hormone-induced GH secretion in obese adults with and without hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(12):4350-4354.
- (201) Gleeson HK, Lissett CA, Shalet SM. Insulin-like growth factor-I response to a single bolus of growth hormone is increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):1061-1067.

-
- (202) Llopis MA, Granada ML, Cuatrecasas G, Formiguera X, Sanchez-Planell L, Sanmarti A et al. Growth hormone-binding protein directly depends on serum leptin levels in adults with different nutritional status. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(6):2006-2011.
- (203) Fernandez-Real JM, Granada ML, Ruzafa A, Casamitjana R, Ricart W. Insulin sensitivity and secretion influence the relationship between growth hormone-binding-protein and leptin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 52(2):159-164.
- (204) Gomez JM, Maravall FJ, Gomez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J. The IGF-I system component concentrations that decrease with ageing are lower in obesity in relationship to body mass index and body fat. *Growth Horm IGF Res* 2004; 14(2):91-96.
- (205) Attanasio AF, Howell S, Bates PC, Frewer P, Chipman J, Blum WF et al. Body composition, IGF-I and IGFBP-3 concentrations as outcome measures in severely GH-deficient (GHD) patients after childhood GH treatment: a comparison with adult onset GHD patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(7):3368-3372.
- (206) Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology* 2005; 146(2):845-850.
- (207) Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology* 2003; 144(7):2765-2767.
- (208) Groschl M, Wagner R, Dotsch J, Rascher W, Rauh M. Preanalytical influences on the measurement of ghrelin. *Clin Chem* 2002; 48(7):1114-1116.
- (209) Espelund U, Hansen TK, Orskov H, Frystyk J. Assessment of ghrelin. *APMIS Suppl* 2003;(109):140-145.
- (210) 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(2):E297-E304.
- (211) Leonetti F, Silecchia G, Iacobellis G, Ribaudo MC, Zappaterreno A, Tiberti C et al. Different plasma ghrelin levels after laparoscopic gastric bypass and adjustable gastric banding in morbid obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9):4227-4231.
- (212) Ravussin E, Tschop M, Morales S, Bouchard C, Heiman ML. Plasma ghrelin concentration and energy balance: overfeeding and negative energy balance studies in twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(9):4547-4551.

-
- (213) Schaller G, Schmidt A, Pleiner J, Woloszczuk W, Wolzt M, Luger A. Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes* 2003; 52(1):16-20.
- (214) Schindler K, Prager G, Ballaban T, Kretschmer S, Riener R, Buranyi B et al. Impact of laparoscopic adjustable gastric banding on plasma ghrelin, eating behaviour and body weight. *Eur J Clin Invest* 2004; 34(8):549-554.
- (215) Tritos NA, Mun E, Bertkau A, Grayson R, Maratos-Flier E, Goldfine A. Serum ghrelin levels in response to glucose load in obese subjects post-gastric bypass surgery. *Obes Res* 2003; 11(8):919-924.
- (216) Lin E, Gletsu N, Fugate K, McClusky D, Gu LH, Zhu JL et al. The effects of gastric surgery on systemic ghrelin levels in the morbidly obese. *Arch Surg* 2004; 139(7):780-784.
- (217) Brownley KA, Light KC, Grewen KM, Bragdon EE, Hinderliter AL, West SG. Postprandial ghrelin is elevated in black compared with white women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(9):4457-4463.
- (218) Cummings DE, Shannon MH. Ghrelin and gastric bypass: is there a hormonal contribution to surgical weight loss? *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7):2999-3002.
- (219) le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):1068-1071.
- (220) Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y et al. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1):6-9.
- (221) Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets* 2005; 6(2):153-169.
- (222) Patterson M, Murphy KG, le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR. Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(4):2205-2211.
- (223) Groschl M, Uhr M, Kraus T. Evaluation of the comparability of commercial ghrelin assays. *Clin Chem* 2004; 50(2):457-458.
- (224) Korner J, Bessler M, Cirilo LJ, Conwell IM, Daud A, Restuccia NL et al. Effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on fasting and postprandial concentrations of plasma ghrelin, peptide YY, and insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1):359-365.