Roberta Diaz Savoldelli

Leptina e ghrelina na fase aguda e de recuperação da cetoacidose diabética em crianças e adolescentes

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

Programa de Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Durval Damiani

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Savoldelli, Roberta Diaz
Leptina e ghrelina na fase aguda e de recuperação da cetoacidose diabética em crianças e adolescentes / Roberta Diaz Savoldelli. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.
Orientador: Durval Damiani.

Descritores: 1.Leptina 2.Grelina 3.Cetoacidose diabética 4.Diabetes mellitus tipo 1 5.Criança 6.Adolescente 7.Hiperglicemia

USP/FM/DBD-210/16

DEDICATÓRIA

À minha família, sempre presente,

exemplo de amor e retidão, eu dedico minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho jamais poderia ter sido realizado sem as contribuições diretas ou indiretas de pessoas importantíssimas com as quais tive o prazer de contar nos últimos anos.

Agradeço ao Prof. Dr. Durval Damiani pela orientação e incentivo desde meus primeiros passos na endocrinologia pediátrica e pelo exemplo de amor ao que faz;

À Dra Thais Della Manna, também idealizadora deste estudo, por suas valiosíssimas sugestões ao longo de todo o projeto, pela confiança em mim depositada desde o início, pelo incentivo à minha evolução como médica e jovem pesquisadora e por todo o conhecimento transmitido ao longo desses anos;

Ao Prof Dr Luiz Ernesto de Almeida Troncon, meu primeiro mestre, ainda nos tempos de graduação, que me ensinou “porque trabalho científico se chama trabalho”;

À Dra Sylvia Farhat pelas valiosas sugestões ao longo deste projeto e auxílio para que tudo ocorresse como previsto no SCUT;

Aos médicos assistentes da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança – HCFMUSP: Dra Nuvarte, Dr Hilton, Dr Vaê, Dr Hamilton, Dra Leandra e Dra Louise, que muito contribuíram para minha formação como médica, e pessoa;

À Dra Caroline Passone, cujo entusiasmo contagiante e novas ideias me motivam a querer melhorar sempre;

Aos residentes, complementandos e médicos assistentes do SCUT que auxiliaram no recrutamento dos pacientes e coletas das amostras;

À Regina Miyuki Yamagata e Karina Kawasato, do laboratório do Instituto da Criança, pelo auxílio incansável na viabilização deste projeto, na organização da logística do processamento e armazenamento das amostras;

À Rosa Fukui, do LIM 18 da Faculdade de Medicina da USP pelas orientações quanto aos procedimentos para coleta e armazenamento das amostras para dosagens hormonais e realização das dosagens por RIE;

À Marli Rafael da Silva Cruz do laboratório de catecolaminas do INCOR pela realização das dosagens por HPLC;

Aos funcionários da coleta e da área técnica do Laboratório do ICr – HCFMUSP pela disposição e auxílio nas coletas, processamento e armazenamento das amostras;

Ao Prof Carlos A. Moreira Filho e Thais Scudelletti do LIM 36 do Instituto da Criança – HCFMUSP pela aquisição e empréstimo da centrífuga refrigerada, fundamental para execução deste projeto;

Ao Prof. Claudio Leone pelo auxílio na interpretação e análise estatística do estudo;

Aos Profs Drs Sergio Dib, Arthur Delgado, Claudio Swartsman por suas valiosas contribuições na qualificação desta tese;

À secretária da pós-graduação Mônica, pela sua eficiência e prontidão em ajudar com as árduas vias burocráticas deste processo;

À bibliotecária Mariza e ao Nivaldo, pelo auxílio na finalização desta tese e principalmente pela alegria e palavras de incentivo;

Àqueles que não participaram diretamente deste projeto, mas me acompanharam ao longo desta jornada e certamente vão comemorar comigo este importante marco em minha vida acadêmica:

À minha família, que desde sempre incentivou e enalteceu a busca pelo conhecimento e dedicação aos estudos, pelo amor, carinho e apoio incondicionais, enfim, pela oportunidade de ser o que sou. Agora em especial aos sobrinhos queridos, cheios de energia, que me enchem de orgulho;

À família Zimba, que me trouxe tantas alegrias em meio às angústias dos anos de residência em pediatria;

Às amigas Marcia Regina Bedin, Cristiane Borges Barra, Juliana Godoy e Mariana Xavier, pelos harmoniosos anos de convivência quando nos iniciamos no universo da endocrinologia pediátrica;

Às amigas de longa data Carina, Daniela, Cristiane e Fabíola, que tive a sorte de acumular ao longo da vida, e que tanto me ouviram nos momentos de decepção e de alegria ao longo desses “sete anos no Tibet”;

E enfim, aos pacientes e suas famílias, que mesmo num momento de aflição concordaram em participar deste estudo pensando não em benefício próprio, mas nos avanços da compreensão desta doença que os acomete;

Muito obrigada!

“Um dia é preciso parar de sonhar,

tirar os planos das gavetas

e, de algum modo, começar...”

Amyr Klink

Normalização adotada

Padrão Vancouver

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
LISTA DE TABELA
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE GRÁFICO
RESUMO
ABSTRACT
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Cetoacidose Diabética 2
1.2 Leptina 5
1.2.1 Leptina e metabolismo da glicose 7
1.2.2 Leptina e DM 1 8
1.3 Ghrelina 10
1.3.1 Ghrelina e metabolismo da glicose 11
1.3.2 Ghrelina e DM1 14
2 JUSTIFICATIVA 15
3 OBJETIVOS 17
4 METODOLOGIA 19
4.1 Critérios de inclusão 20
4.2 Critérios de exclusão 20
4.3 Tratamento da cetoacidose 20
4.4 Coletas e processamento de amostras 24
4.5 Análise estatística 26
5 RESULTADOS 27
5.1 Leptina 29
5.2 Ghrelina 30
5.3 Glicemia 31
5.4 Insulina 33
5.5 Glucagon 34
5.6 Hormônio do Crescimento (GH) 36
5.7 Cortisol 37

5.8 Norepinefrina 38
5.9 Correlações 40
6 DISCUSSÃO 42
7 CONCLUSÃO 51
8 ANEXOS 53
9 REFERÊNCIAS 88
APÊNDICES

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	-	acilghrelina
CAD	-	cetoacidose diabética
cAMP	-	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CAPPesq	-	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
dAG	-	des-acil-ghrelina
DM	-	diabetes mellitus
DM1	-	diabetes mellitus tipo 1
FAPESP	-	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GC	-	grupo controle
GH	-	hormônio do crescimento
GHRH	-	hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHS-R	-	receptor do secretagogo do GH
GOAT	-	ghrelina – O – aciltransferase
ICr	-	Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMC	-	índice de massa corporal
LEPR	-	receptor da leptina
PIM	-	Pediatric Index of Mortality
SCUT	-	Serviço de Consultas de Urgência e Triagem
SNC	-	sistema nervoso central
SSt5	-	receptor 5 da somatostatina
T4	-	tiroxina
TE	-	tempo estável
TSH	-	hormônio tirotrófico

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Evolução das dosagens de leptina (pg/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética 29

Tabela 2 – Evolução das dosagens de ghrelina (pg/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética 30

Tabela 3 – Evolução das dosagens de glicemia (mg/dL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética 32

Tabela 4 – Evolução das dosagens de insulina (µU/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética 33

Tabela 5 – Evolução das dosagens de glucagon (pg/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética 35

Tabela 6 – Evolução das dosagens de GH (ng/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética 36

Tabela 7 – Evolução das dosagens de cortisol (µg/dL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética 37

Tabela 8 – Evolução das dosagens de norepinefrina (pg/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética 38

Tabela 9 – Correlações entre leptina, ghrelina e glicemia, insulina, glucagon, GH e cortisol ao diagnóstico de cetoacidose diabética (T0) 40

Tabela 10 – Correlações entre leptina, ghrelina e glicemia, insulina, glucagon, GH e cortisol durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética (T2 – T72) 40

Tabela 11 – Correlações entre leptina, ghrelina e glicemia, insulina, glucagon, GH e cortisol no grupo controle 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da cetoacidose diabética 4

Figura 2. Regulação da função das ilhotas pancreáticas mediadas pelo heterômero GHSR:SST5. 12

Figura 3. Tratamento da cetoacidose diabética. 23

Figura 4. Tempos de coleta das amostras durante as primeiras 72 horas de tratamento dos episódios de cetoacidose diabética 24

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1. Dosagens de leptina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. 30

Gráfico 2. Dosagens de ghrelina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. 31

Gráfico 3. Dosagens de glicemia durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. 33

Gráfico 4. Dosagens de insulina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. 34

Gráfico 5. Dosagens de glucagon durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. 35

Gráfico 6. Dosagens de GH durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética.. 37

Gráfico 7. Dosagens de cortisol durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. 38

Gráfico 8. Dosagens de norepinefrina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética.. 39

RESUMO

Savoldelli RD. *Leptina e ghrelina na fase aguda e de recuperação da cetoacidose diabética em crianças e adolescentes* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: a ação dos hormônios contrarreguladores da insulina na cetoacidose diabética tem sido estudada desde a década 1970-80, e é sabido que seus níveis elevados, aumentando a resistência à insulina, têm papel importante na gênese da CAD. Leptina e ghrelina foram mais recentemente associadas à homeostase da glicose, no entanto, seu papel na CAD ainda é controverso. Os objetivos deste estudo foram: avaliar as alterações nas concentrações séricas de leptina e ghrelina presentes ao diagnóstico da CAD durante os primeiros três dias de seu tratamento e após a estabilização completa do quadro, as correlações com a insulina e outros contrarreguladores, comparando com indivíduos saudáveis. **MÉTODOS**: foram analisados 25 episódios de cetoacidose diabética em 22 pacientes admitidos no setor de emergência pediátrica de um hospital terciário em São Paulo, Brasil, entre março de 2010 e julho de 2013. Os episódios de cetoacidose foram manejados com reposição endovenosa de fluidos e eletrólitos e análogos de ação ultrarrápida de insulina subcutânea intermitente. Amostras para glicose, insulina, leptina, ghrelina, GH, cortisol e catecolaminas foram obtidas no momento da admissão (T0), durante o tratamento da cetoacidose (após 2, 4, 6, 12, 24 e 72 horas) e em um momento estável após a alta (TE). Os dados foram analisados utilizando-se os testes ANOVA ou Kruskal-Wallis para a comparação de variáveis contínuas durante o tratamento, Teste t de Student ou Mann Whitney para a comparação entre pacientes e grupo controle, e testes de Pearson ou Spearman para correlação entre as variáveis; $p < 0.05$ foi considerado significativo. **RESULTADOS**: observamos três fases distintas (a): o diagnóstico de CAD (T0) em que prevalecem hiperglicemia, insulinopenia e elevação de hormônios contrarreguladores; nesse momento, as concentrações de leptina foram menores que no grupo controle, provavelmente relacionadas à insuficiência de energia, estado hipercatabólico e elevação dos hormônios contrarreguladores; as concentrações de ghrelina foram menores que no grupo controle, apesar do hipercatabolismo, da hipoinsulinemia e da hiperglucagonemia, todas situações que fisiologicamente elevariam seus níveis, possivelmente devido à hiperglicemia marcante do momento; (b) durante o tratamento da CAD (T2 a T72): com redução gradual da glicemia até T24, elevação gradual da insulina, redução de glucagon, GH, cortisol e norepinefrina; nesse período, ocorreu elevação gradual da leptina após o início do tratamento com insulina, que atingiu níveis comparáveis ao GC no T72; redução da ghrelina (T4 menor que T72), provavelmente inibida pela hiperglicemia e por doses suprafisiológicas de insulina; e (c) após a resolução da CAD (TE): com hiperinsulinização; GH, cortisol e norepinefrina comparáveis

ao GC, glucagon reduzido em relação ao GC, possivelmente supresso pelos altos níveis de insulina; as concentrações de leptina foram maiores que em T0 e comparáveis ao GC; os níveis de ghrelina, comparáveis ao diagnóstico e durante o tratamento da CAD, ainda significativamente menores que no GC, provavelmente influenciados pela hiperglicemia, hiperinsulinemia e baixos níveis de glucagon. **CONCLUSÕES**: as concentrações de leptina diminuídas ao diagnóstico de CAD tornam-se semelhantes em pacientes com DM1 estáveis em relação a indivíduos saudáveis, podendo ser um marcador de hipercatabolismo. As concentrações de ghrelina permaneceram baixas durante todo o estudo em pacientes diabéticos, independentemente da descompensação.

Descritores: leptina; grelina; cetoacidose diabética; diabetes mellitus tipo 1; criança; adolescente; hiperglicemia.

.

ABSTRACT

Savoldelli RD. *Leptin and ghrelin during acute and recovery phases of diabetic ketoacidosis in children and adolescents* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

INTRODUCTION: The role of glucoregulatory hormones in diabetic ketoacidosis have been investigated since 1970-80s and the elevation of growth hormone, cortisol and norepinephrine reduce the sensitivity to insulin. Leptin and Ghrelin have more recently been shown to regulate glucose and insulin metabolism; however, their functions in DKA are still controversial. The aims of this study were to analyze leptin, ghrelin and their relationships with other glucoregulatory hormones on diagnosis of diabetic ketoacidosis, during the first 72 hours of treatment and after recovery compared with healthy subjects. **METHODS**: We examined 25 DKA episodes in 22 patients who were admitted to the pediatric emergency department of a tertiary hospital in São Paulo, Brazil, from March 2010 to July 2013. These episodes were managed with fluids and electrolytes replacement and intermittent subcutaneous fast-acting insulin analogues. Samples for blood glucose, insulin, leptin, ghrelin, GH, cortisol, and catecholamines were obtained on admission (T0)**,** during treatment (after 2, 4, 6, 12, 24 and 72 hours) and after discharge (TS). The control group (CG) was comprised by 21 healthy subjects, who submitted a single blood sample. Data were analyzed by ANOVA or Kruskal-Wallis to compare continuous variables during treatment, student t-test or Mann Whitney for comparisons between patients and controls, and Pearson or Spearman correlations between variables; $p<0.05$ was considered to be significant. **RESULTS**: we observed three distinct phases: (a) on diagnosis of DKA (T0) where hyperglycemia, insulinopenia, and elevated glucoregulatory hormones prevail; leptin concentrations were lower than CG at this moment, probably related to energy insufficiency, hypercatabolic state, and elevated glucoregulatory hormones; ghrelin concentrations were lower than CG at this moment, despite hypercatabolism, hypoinsulinemia and hyperglucagonemia, situations that physiologically would increase them, possibly related to marked hyperglycemia at T0; (b) during DKA treatment (T2 to T72): with gradual reduction of blood glucose until T24, gradual rise of insulin; reduction of glucagon, GH, cortisol and norepinephrine. Leptin levels rises gradually after the start of insulin treatment and is comparable to control group at T72; reduction of ghrelin (T4 lower than T72), possibly inhibited by hyperglycemia and supraphysiological doses of insulin, all lower than CG; and (c) After DKA (TS), in an outpatient setting: with marked hyperinsulinization, GH, cortisol and norepinephrine were comparable to CG. Glucagon was lower than CG, possibly suppressed by high insulin levels; leptin was higher than T0 and comparable to CG; ghrelin levels were comparable to all samples during DKA treatment, and still significantly lower than CG, probably influenced by hyperglycemia, hyperinsulinemia and low

glucagon levels. **CONCLUSIONS**: Low leptin levels were a marker of hypercatabolic state, with normalization of its concentrations with DKA resolution. Ghrelin was low in diabetic patients independent of metabolic derangements.

Descriptors: leptin; ghrelin; diabetic ketoacidosis; diabetes mellitus, type 1; child; adolescent; hyperglycemia.

.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cetoacidose Diabética

A cetoacidose diabética (CAD) é um distúrbio metabólico agudo e grave, causado por deficiência insulínica extrema que, juntamente com um estado de resistência à ação da insulina nos tecidos alvo, gera um estado de hiperglicemia, graves perdas hidroeletrolíticas, acidose metabólica, hiperosmolaridade e cetose, que podem levar ao óbito. Parte significativa dos casos novos de *diabetes mellitus* (DM) na faixa etária pediátrica ainda são diagnosticados em situação de cetoacidose, na maioria das vezes por oportunidade perdida de diagnóstico de DM. Constitui causa frequente de readmissões nos serviços de emergência pediátricos, sendo a principal causa de mortalidade entre crianças diabéticas. A taxa de mortalidade por CAD é de 0,5 a 1% nos grandes centros, principalmente relacionada ao edema cerebral.

A frequência de CAD ao diagnóstico de DM tem grande variação regional, sendo menor nas regiões de maior prevalência da doença. Na literatura, há relatos que variam de 15 a 70% dos casos na Europa e América do Norte.[1-4] No Brasil, há relatos recentes da presença de CAD ao diagnóstico em cerca de 40% dos casos.[5,6] Outros fatores de risco para maior incidência de CAD ao diagnóstico incluem idade menor que cinco anos, maior dificuldade de acesso a serviços de saúde e menor escolaridade dos pais.[1,2] Alguns fatores que diminuem a chance de CAD ao diagnóstico de DM1 são a presença de outro membro da família com diagnóstico de diabetes insulino dependente e, mais recentemente, a participação em estudos longitudinais envolvendo pacientes de alto risco genético para DM1.[2,7]

Em pacientes com diagnóstico prévio de DM1, a chance de CAD é de 1 a 10 casos para 100 pacientes por ano. O grupo de maior risco são as meninas adolescentes, e, em geral, 20% dos indivíduos são responsáveis por cerca de 80% dos casos, mostrando grande chance de recorrência.[1,2] Outros fatores de risco são problemas psicossociais existentes antes do diagnóstico de DM, controle inadequado do DM, ambiente familiar disfuncional, omissão de

insulina, ajuste inadequado de doses durante doenças intercorrentes e dificuldade de acesso a serviços de saúde.[1,2]

Os mecanismos fisiopatológicos da CAD (Figura 1) decorrem do estado de insulinopenia grave, que promove a lipólise, ácidos graxos livres são então mobilizados do tecido adiposo e desviados preferencialmente para a via da β-oxidação, levando à produção de níveis elevados de corpos cetônicos (ácidos β-hidroxibutírico e acetoacético). Além disso, a deficiência insulínica acarreta um aumento da relação entre glucagon e insulina na circulação do sistema porta do fígado, liberando a produção hepática de glicose e reduzindo a captação periférica da glicose pelos tecidos muscular e adiposo. Essa situação de resistência insulínica é ainda agravada pela presença dos hormônios de estresse (glucagon, catecolaminas, cortisol, GH) secretados em virtude da presença de hipovolemia e/ou choque. A hiperglicemia resulta em diurese osmótica, levando à desidratação grave, perda de eletrólitos (sódio, potássio, fósforo, magnésio) e acidose láctica por hipoperfusão tecidual. O déficit de água pode ainda ser agravado por vômitos, hiperventilação e febre.

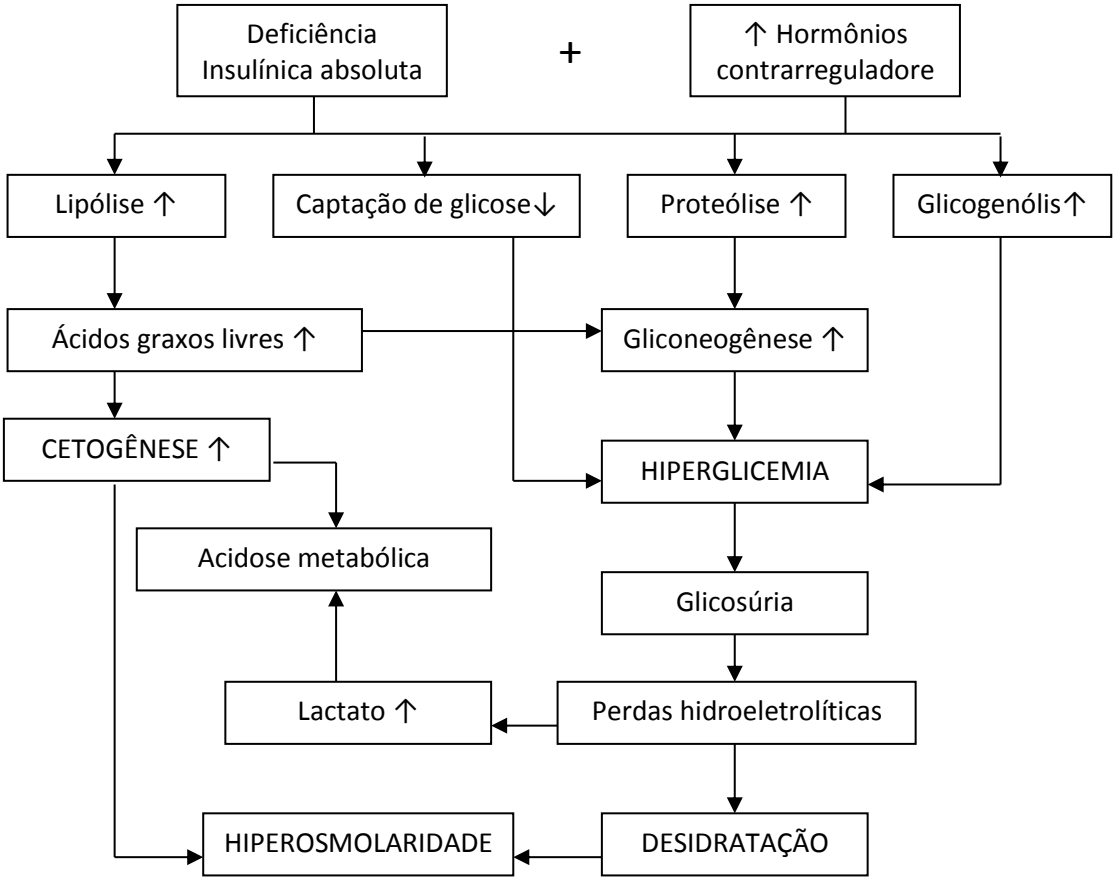


Figura 1. Fisiopatologia da cetoacidose diabética (adaptada de Wolfsdorf J, 2006[8]).

O quadro clínico do paciente em CAD inclui sintomas como poliúria, polidipsia, emagrecimento, dor abdominal, vômitos, fraqueza, dispneia, confusão mental e sinais como letargia, desidratação, respiração de Kussmaul, hálito cetônico, distúrbios de consciência e coma. A desidratação pode ter graus variados, dependendo da duração e gravidade da doença e tipo e quantidade de fluidos ingeridos antes do atendimento. O alto débito urinário se mantém, apesar da desidratação, até depleção volêmica extrema ou choque, com redução da perfusão renal e, consequentemente, do débito urinário. Podem ocorrer alterações inespecíficas em exames laboratoriais, como aumento de amilase e leucocitose no hemograma, com desvio à esquerda, no entanto, a presença de febre é sugestiva de infecção associada.[1,8]

Os critérios bioquímicos para o diagnóstico da CAD são:[1,9]

– glicemia >200 mg/dL;

– acidose metabólica, com pH de sangue venoso < 7,3 e/ou bicarbonato < 15m Eq/L; e

– presença de cetonúria e/ou cetonemia > 3,0 mmol/L

A terapêutica deve ser instituída de imediato e envolve o tratamento do choque, a reposição das perdas hídricas, a correção das perdas eletrolíticas, a correção da hiperglicemia, da acidose metabólica e o tratamento do eventual processo infeccioso desencadeante.

A reposição hidroeletrolítica adequada e bem planejada e a monitorização clínica frequente do paciente são fatores críticos no tratamento da CAD. A insulinoterapia deve ser iniciada após a normalização da perfusão tecidual, geralmente a partir da segunda hora do tratamento. As possíveis complicações da CAD e de seu tratamento (edema cerebral, hipocalemia, hipoglicemia, entre outras) devem ser monitoradas e prontamente tratadas quando presentes.

A última etapa do tratamento compreende a tentativa de identificação do fator precipitante para possível prevenção da recorrência da CAD.

A CAD envolve alterações importantes na secreção e ação da insulina e seus contrarreguladores, assim, dois outros hormônios descritos mais recentemente, que também têm papel no metabolismo da glicose, serão considerados adiante.

1.2 Leptina

Desde os anos 1950 e 1960 são conhecidos e bastante estudados modelos animais de obesidade e diabetes causados por herança autossômica recessiva, dentre eles os camundongos ob/ob e db/db. Os modelos afetados apresentam características fenotípicas muito semelhantes, principalmente hiperfagia, obesidade, hiperglicemia e infertilidade.[10,11] Um dos estudos mais esclarecedores em relação às alterações presentes nos dois modelos foi publicado por Coleman em 1978.[12] Em seus experimentos de parabiose, ao unir a circulação de camundongos ob/ob a camundongos normais, houve hipofagia e perda de peso dos modelos ob/ob; ao uni-los a camundongos db/db, estes evoluíram com perda de peso até a morte por inanição, enquanto

os camundongos db/db e os normais não sofreram alterações em seus fenótipos. Assim, Coleman inferiu que os animais ob/ob não produziam fator de saciedade suficiente para regular sua ingestão alimentar, por sua vez, os modelos db/db produziam o fator, mas não eram capazes de responder a ele. Mais de quinze anos depois, com a clonagem dos genes da leptina e de seu receptor, suas teorias se provaram corretas e foram identificadas mutações do gene da leptina no modelo ob/ob e no gene do receptor da leptina nos modelos db/db.[13,14]

A leptina é um hormônio peptídico secretado, principalmente, pelos adipócitos, com ação inibitória central sobre o apetite, constituindo-se em um importante regulador do peso corporal e do balanço energético. A variável mais importante na determinação da concentração de leptina circulante é a quantidade de gordura corpórea; de forma geral, quanto maior a quantidade de gordura corporal, maiores as concentrações de leptina. O receptor da leptina (LEPR) é expresso, principalmente, no hipotálamo, região de fundamental importância no controle do apetite, homeostase da glicose e funções endócrinas.[15,16]

A ação da leptina inibe o apetite e a produção hepática de glicose, além de sinalizar a suficiência de energia a longo prazo, permitindo a ativação de funções endócrinas de alta demanda energética, como a reprodução. No jejum, há queda dos níveis de leptina devido à redução dos estoques de triglicérides nos adipócitos, o que leva ao aumento do apetite, da produção hepática de glicose e à diminuição de sua ação permissiva sobre as funções endócrinas.[15,16] Estudos mostram que a leptina encontra-se diminuída em situações de jejum prolongado com aumento de β-hidroxibutirato, porém tal elevação não é reproduzida pela infusão de β-hidroxibutirato, sugerindo que ela seja decorrente de outras alterações metabólicas concomitantes, como a elevação dos contrarreguladores da insulina presentes nessa situação.[17]

Também em situações em que há perda de peso, há consequente redução nas concentrações de leptina, levando ao maior estímulo em resposta à visualização de alimentos e à menor saciedade em resposta à alimentação, contribuindo, assim, para a tendência de recuperar o peso perdido. Esse mecanismo funcionaria como uma forma de proteção do organismo à redução

de gordura corporal, que poderia levar ao prejuízo da função reprodutiva, e explica ao menos em parte a grande taxa de insucesso na maioria das terapias contra a obesidade.[15,16,18–20]

Indivíduos com deficiência de leptina ou mutações em seu receptor apresentam características clínicas semelhantes, em geral com peso de nascimento normal, porém evoluindo com hiperfagia, ganho de peso excessivo desde os primeiros meses de vida e obesidade grave, com aumento de tecido adiposo subcutâneo, principalmente em tronco e membros, que é aumentado em relação a obesos por outras causas. Pode haver uma predisposição a infecções devido a células T com número e função comprometidos. O hipogonadismo hipogonadotrófico também é uma característica comum nesses casos, além de um hipotiroidismo com níveis baixos de T4 e concentrações aumentadas de TSH, porém geralmente inativo e com padrão desorganizado de secreção, características condizentes com a falta de ação permissiva da leptina sobre funções endócrinas de alta demanda energética.[21]

1.2.1 Leptina e metabolismo da glicose

Ações diretas da leptina tanto no pâncreas quanto em tecidos alvo da insulina, além de ações no sistema nervoso central (SNC), contribuem para a homeostase da glicose, porém ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos intracelulares pelos quais os receptores da leptina exercem essa regulação.[18]

Na célula β pancreática, a leptina reduz a síntese e a secreção de insulina, criando uma alça de regulação fisiológica entre a célula β e o adipócito; assim, o aumento da insulina promove o acúmulo de tecido adiposo, que eleva as concentrações de leptina, que, por sua vez, atua diminuindo a secreção e produção de insulina.[22] Modelos animais que apresentam defeitos na produção ou na ação da leptina evoluem com hiperinsulinemia inicialmente acompanhada de hipoglicemia e, posteriormente, com resistência à insulina, provavelmente secundária, uma vez que apresentam melhora com administração de diazóxido, porém não de metformina.[23] Na célula α pancreática, a leptina inibe a síntese e a secreção de glucagon.[24,25] As ações

diretas ou via SNC da leptina no tecido muscular, hepático e adiposo branco e marrom são complexas e variam de acordo com o estado metabólico, podendo inibir ou estimular os efeitos da insulina na homeostase da glicose.[22]

Estudos comprovam que as ações da leptina no metabolismo da glicose são independentes do peso ou da ingestão alimentar, uma vez que sua deficiência em modelos animais pode levar à hiperglicemia e à resistência à insulina, mesmo antes do ganho de peso, e mesmo quando comparados a animais que receberam quantidade de alimento equivalente aos animais deficientes. Também humanos com lipodistrofia generalizada e, consequentemente, com concentrações circulantes reduzidas de leptina, apresentam hiperglicemia e resistência à insulina. A infusão de leptina exógena é capaz de reverter esse quadro, diminuindo os níveis de glicemia e insulina, antes que ocorram alterações no peso.[22]

1.2.2 Leptina e DM 1

Modelos animais de DM1, hiperglicêmicos, hipoinsulinêmicos, com níveis altos de glucagon e cortisol, apresentam leptinemia reduzida. Alguns autores avaliaram os efeitos de sua reposição nesses casos.[26-28] A administração de leptina em concentrações suprafisiológicas foi capaz de reverter o quadro de descompensação metabólica desses camundongos criticamente comprometidos, com resolução da poliúria, ganho de peso, reversão da cetose e redução da glicemia devido à melhora da resistência à insulina e redução da secreção de contrarreguladores, principalmente glucagon, além de GH e cortisol.[26] Já a infusão de leptina em doses suficientes somente para torná-la comparável a modelos saudáveis foi capaz de reverter a descompensação, com supressão do aumento de glucagon e corticosteroides e menor expressão de enzimas da gliconeogênese, porém com melhora apenas parcial da hiperglicemia.[27] Um estudo recente mostrou que a reposição de leptina em modelos animais de DM1 levou à normalização da glicemia, principalmente devido à redução da atividade adrenal, e não à normalização dos níveis de glucagon, que ocorreu apenas 18 horas após a redução da glicemia. O estudo demonstrou papel fundamental do aumento da atividade do

eixo hipotálamo-hipófise-adrenal no aumento da lipólise mediada por glicocorticoide, causada pela insuficiência de leptina, levando ao aumento da gliconeogênese, hiperglicemia e cetoacidose nos modelos de DM1.[29] Em outro estudo, o papel da reposição de leptina foi avaliado como tratamento adjuvante à insulinoterapia em baixas doses, em modelos animais de DM1, e demonstrou algumas vantagens em relação à monoterapia com insulina, como a manutenção da estabilidade glicêmica, sem o aumento da gordura corporal e dos fatores de transcrição e enzimas das vias lipogênicas observadas no tratamento exclusivo com insulina.[30]

Em humanos, estudos avaliando pacientes com DM1 já estabelecido e estável, mostraram leptinemia comparável ou até aumentada em relação a indivíduos saudáveis.[31–34]

Quanto ao diagnóstico de DM1, com ou sem CAD, a maioria dos estudos mostra concentrações séricas de leptina diminuídas em relação a indivíduos saudáveis e indivíduos diabéticos compensados, porém ainda com resultados divergentes.

Nakamura *et al*.[35] relataram que pacientes com CAD apresentavam, no momento da admissão, concentrações de leptina aumentadas em relação aos controles saudáveis, sendo que esses valores aumentavam ainda mais nas primeiras 6 a 24 horas após início da insulinoterapia, com queda progressiva, até atingir valores semelhantes aos controles saudáveis no momento da alta.

Já McCormick e cols.[36] não encontraram diferenças significativas nas concentrações de leptina ao diagnóstico de DM e, após dias ou semanas do início da insulinoterapia, no entanto, não avaliaram indivíduos hígidos.

Fluck *et al*.[37] avaliaram a influência da insulinoterapia na leptinemia de pacientes com DM recém-diagnosticados, com ou sem cetoacidose, verificando que havia um aumento significativo após a introdução da insulina, também sem avaliar indivíduos saudáveis.

Hanaki *et al*. avaliaram 19 crianças ao diagnóstico de DM, 15 delas apresentando cetose ou CAD, antes do início, 3 a 5 dias após e 3 meses depois do início da insulinoterapia; todas foram comparadas a 19 indivíduos saudáveis. A leptina foi significativamente menor antes do início do tratamento em relação aos indivíduos saudáveis, e os níveis já eram comparáveis nos dois

grupos após 3 a 5 dias de tratamento. O aumento da leptina apresentou correlação com o aumento de IMC entre as coletas depois de 3 a 5 dias e após 3 meses do diagnóstico.[38]

Hathout *et al*.[39] também verificaram que a leptinemia em pacientes com CAD era significativamente mais baixa que em pacientes com DM1 estável, e também em relação a pacientes saudáveis com IMC correspondente. Após início da insulinoterapia, houve aumento significativo das concentrações de leptina nos pacientes com CAD, tornando-as semelhantes às dos diabéticos estáveis.

Kitabchi e Umpierrez[40] também verificaram que pacientes com CAD magros ou obesos e pacientes obesos com hiperglicemia sem cetoacidose tinham leptina sérica diminuída em relação aos controles com IMC correspondente, havendo um aumento significativo dessas concentrações após o início da insulinoterapia.

1.3 Ghrelina

A ghrelina é um hormônio peptídico de 28 aminoácidos, ligante endógeno do receptor do secretagogo do GH (GHS-R). O GHS-R foi descrito, inicialmente, como um receptor acoplado à proteína G, capaz de regular a secreção de GH de forma independente do GHRH (hormônio liberador do hormônio de crescimento) hipotalâmico. Seu ligante endógeno, a ghrelina, produzida no estômago, foi identificada posteriormente em roedores e humanos.[41] Após a transcrição, a ghrelina sofre uma acilação no terceiro resíduo de aminoácido (serina), catalisada pela enzima ghrelina – O – aciltransferase (GOAT) e somente a forma acilada (acil-ghrelina – AG) age no GHS-R com papel na secreção de GH. A forma não acilada (des-acil-ghrelina – dAG) é predominante na circulação e foi considerada inicialmente a forma inativa da ghrelina, porém, estudos mais recentes envolvem sua participação principalmente em funções metabólicas, agindo como antagonista ou potencializando a ação da ghrelina acilada, provavelmente utilizando um receptor distinto, ainda não identificado.[42]

A ghrelina foi o primeiro hormônio descrito com papel orexígeno de produção periférica e ação central na regulação do apetite.[43] Em geral, é aumentada em períodos de jejum e em situações de restrição calórica, inclusive na anorexia nervosa, e diminuída após a refeição. As concentrações de ghrelina são baixas em obesos, porém aumentam quando há perda de peso, tendendo a levar ao peso anterior.[15]

De forma geral, as principais ações da ghrelina estão relacionadas a mecanismos de proteção contra períodos de jejum prolongado, promovendo um efeito orexígeno, que leva à busca da alimentação, estímulo da produção de GH, para que haja promoção da lipólise e restrição da captação periférica de glicose, além da diminuição da secreção de insulina, efeitos que permitem a prevenção da hipoglicemia.[44]

Nos últimos anos, também foram descritas outras ações periféricas e centrais da ghrelina envolvendo, entre outros, o estímulo da motilidade intestinal e a secreção gástrica, a modulação do sono, o estresse e a ansiedade, a proteção contra atrofia e perda muscular e as ações benéficas no sistema cardiovascular relacionadas à vasodilatação e à contratilidade miocárdica.[45]

1.3.1 Ghrelina e metabolismo da glicose

A expressão tanto da ghrelina quanto de seu receptor em ilhotas pancreáticas sugeriu a hipótese de que ela teria também participação na regulação do metabolismo da glicose, levando à avaliação de possíveis ações parácrinas e endócrinas no pâncreas.[42,44]

A avaliação *in vitro* da ação da AG no metabolismo da glicose tem resultados conflitantes, com estudos mostrando efeito inibitório sobre a liberação de insulina estimulada pela glicose, enquanto outros estudos mostraram efeito estimulatório, provavelmente dependendo de doses utilizadas e outras características específicas de cada estudo.[44,46–48]

Park *et al.* podem ter explicado tais resultados aparentemente discrepantes ao demonstrarem que o efeito estimulatório ou inibitório da AG na secreção de insulina pode ser modulado por condições que alteram os níveis

circulantes de ghrelina e somatostatina. O GHS-R pode atuar acoplado à proteína $G\alpha_q$, que estimula a secreção de insulina; no entanto, em situações de balanço energético baixo, onde a relação ghrelina:somatostatina está alta, como no jejum prolongado, por exemplo, o GHS-R forma um heterômero com o receptor 5 da somatostatina (SST5) e, então, atua por meio da subunidade $G\alpha_i$, o que leva à redução do acúmulo de cAMP e à inibição da secreção de insulina. Em situações de balanço energético alto, como no pós-prandial, com redução de ghrelina e aumento de somatostatina e, portanto, relação ghrelina:somatostatina baixa, diminui a inibição do acúmulo de cAMP, com aumento da secreção de insulina.[49]

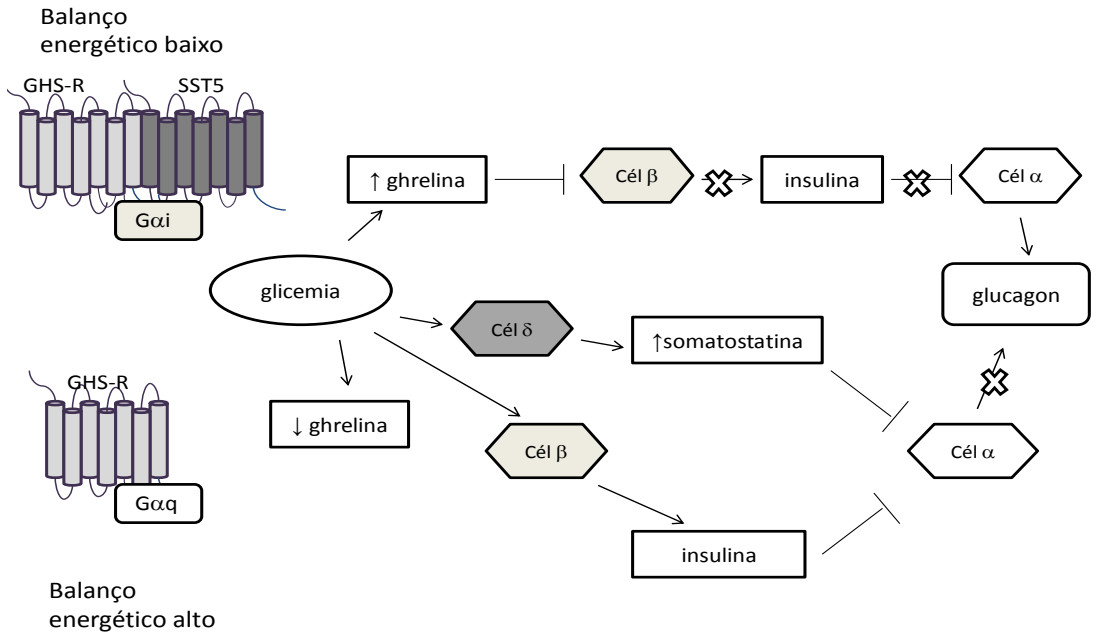


Figura 2. Regulação da função das ilhotas pancreáticas mediadas pelo heterômero GHSR:SST5. Em situações de balanço energético baixo, a formação de heterômero GHSR:SST5 possibilita a atuação do GHSR acoplado à subunidade α inibitória da proteína G, inibindo a liberação de insulina pela célula β e permitindo o aumento da liberação de glucagon. Em situações de balanço energético alto, a atuação do GHSR é via proteína $G\alpha q$, onde deixa de existir a inibição para secreção de insulina. Concentrações elevadas de insulina e somatostatina inibem a secreção de glucagon pelas células α pancreáticas.[49]

Em relação a outros hormônios contrarreguladores da insulina, estudos *in vitro* mostram que a AG tem um papel estimulatório direto na secreção de

glucagon pela célula α pancreática,[50] além disso, a administração de glucagon foi capaz de estimular a secreção de ghrelina, ação potencializada pela coincubação de norepinefrina.[51]

Estudos *in vivo* mostraram modelos animais deficientes em leptina (ob/ob), e, por essa razão, obesos, hiperglicêmicos e hiperinsulinêmicos, que também apresentaram mutações no gene da ghrelina com consequente deficiência, demonstraram melhora do perfil glicêmico e da sensibilidade à insulina, apesar de não apresentarem alteração de peso ou da gordura corporal, mantendo-se obesos; o efeito benéfico no perfil glicêmico era revertido com a infusão de ghrelina.[52] A maioria dos estudos em modelos animais mostra que a administração de AG tem papel inibitório na secreção de insulina, independente da indução de secreção de GH.[44,53] Antagonizar a AG ou sua sinalização por meio de ablação genética ou ação farmacológica tem efeito benéfico no metabolismo da glicose, com aumento da secreção de insulina bem como de sua sensibilidade periférica.[54,55]

Em humanos, o aumento agudo da ghrelina pode levar à redução da secreção de insulina e consequente aumento da glicemia, independente do aumento de GH.[56] Doses suprafisiológicas de AG podem também diminuir a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose.[57]

A insulina também pode influenciar a secreção de ghrelina; estudos demonstraram que a infusão de insulina, principalmente em níveis suprafisiológicos, foi capaz de inibir a secreção de ghrelina, independentemente da glicemia.[58,59]

Quanto à dAG, seu papel *in vitro*, *in vivo* e em humanos também não foi completamente esclarecido; há estudos mostrando efeitos estimulatórios na secreção de insulina, outros sem efeito; alguns autores acreditam que sua ação seja por meio de antagonismo à ação da AG, e os resultados variam de acordo com a população estudada, as doses utilizadas, a duração da infusão e as metodologias utilizadas para estabilização da AG e dAG para realização de suas dosagens,[42,44] e, inclusive, um estudo sugere que toda a ghrelina na circulação seja acilada e a dAG possa ser, na verdade, um artefato devido à manipulação das amostras para dosagens no plasma.[60]

1.3.2 Ghrelina e DM1

Ao estudar modelos animais de DM1, Dong e cols. demonstraram que os camundongos apresentavam concentrações elevadas de ghrelina na descompensação diabética, o que foi corrigido com o início do tratamento com insulina.[61]

Holdstock avaliou 22 crianças ao diagnóstico de DM 1 no momento anterior ao início do tratamento com insulina, após 10 dias do início do tratamento, comparou os dados com os de 10 crianças saudáveis. Além disso, os pacientes diabéticos, após 3 e 9 meses de tratamento foram avaliados em teste de refeição mista. Ao diagnóstico, os pacientes com DM apresentavam ghrelina significativamente menor que após 10 dias de tratamento e significativamente menor que em indivíduos saudáveis. Em indivíduos normais é esperada a redução das concentrações de ghrelina após a refeição; no entanto, não houve resposta no teste de refeição mista nos pacientes diabéticos, apesar do aumento da glicemia e do peptídeo C.[62]

Já Ashraf e cols. avaliaram 19 crianças ao diagnóstico de DM 1, sem CAD, porém com alterações glicêmicas e sintomas de descompensação, observando que as concentrações de ghrelina não apresentavam diferença significativa entre o pré-tratamento com insulina e a coleta na manhã seguinte ao início do tratamento, mas eram ambas significativamente maiores que a dosagem após 3 meses de tratamento.[63]

Soriano-Guillén *et al*.[64] avaliaram 22 pacientes com DM 1, sendo 9 deles em CAD, 37 indivíduos saudáveis e observaram que a ghrelina plasmática era significativamente mais baixa em portadores de DM 1 à época do diagnóstico que em controles normais, e que tais níveis permaneceram baixos após o início da insulinoterapia, tanto 48 a 60 horas após o início, quanto após períodos mais prolongados, de 1 a 4 meses após o início da insulinoterapia. Não houve correlação entre as concentrações de ghrelina e leptina em nenhum momento, sugerindo mecanismos de controle diferentes.

2 JUSTIFICATIVA

O papel dos hormônios contrarreguladores da insulina na CAD vem sendo estudado desde a década de 1970, sendo já estabelecida a importância do aumento de glucagon, GH, cortisol e catecolaminas em sua fisiopatologia. Desde então, outros hormônios que influenciam o metabolismo da glicose e a secreção e sensibilidade à insulina, como a leptina e a ghrelina, foram descritos e pouco estudados na CAD, ainda com resultados conflitantes. A coexistência de situações fisiologicamente antagônicas na CAD, como hiperglicemia e o hipercatabolismo, com aumento da lipólise e cetose, propiciam uma situação ímpar para o estudo do comportamento da leptina e da ghrelina.

Ao realizar este estudo, nossas hipóteses iniciais seriam que o estado de hipercatabolismo e insulinopenia prevaleceriam na determinação das concentrações séricas de leptina (reduzida) e ghrelina (aumentada), o que poderia contribuir para a diminuição da secreção de insulina, aumento da resistência à sua ação e estímulo da hiperfagia, contribuindo para a perpetuação do mecanismo da descompensação diabética.

.

3 OBJETIVOS

1. Avaliar as alterações nas concentrações séricas de leptina e ghrelina presentes ao diagnóstico da CAD, durante os primeiros três dias de seu tratamento, após a estabilização completa do quadro, já em ambiente ambulatorial, e compará-las a indivíduos saudáveis.

2. Estabelecer correlações entre as concentrações de leptina e ghrelina com os níveis de insulina, glucagon, GH, cortisol e catecolaminas apresentados no momento da descompensação, durante seu tratamento, após estabilização completa do quadro e em indivíduos saudáveis.

4 METODOLOGIA

Foram avaliados 25 episódios de CAD em pacientes admitidos no Serviço de Consultas de Urgência e Triagem (SCUT) do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr), entre março de 2010 e junho de 2013. O grupo controle foi composto por 21 indivíduos saudáveis, em seguimento nos ambulatórios de Adolescentes ou Pediatria do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado pela CAPPesq (número 0144/08) e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido com o responsável pelo paciente para participação no estudo.

O projeto recebeu auxílio financeiro da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2008/08300-5.**

4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas crianças e adolescentes admitidos em descompensação ou primodescompensação diabética com cetoacidose por apresentar quadro de desidratação e perfil bioquímico com glicemia $\geq$ 200 mg/dL, pH < 7,30 e/ou bicarbonato sérico < 15 mEq/L, cetonúria $\geq$ ++ ou cetonemia $\geq$ 3,0 mmol/L [1]; e peso maior ou igual a 20 kg, limite estabelecido devido ao volume de sangue necessário para a obtenção das amostras.

4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes em uso de medicamentos hiperglicemiantes.

4.3 Tratamento da cetoacidose

O tratamento da cetoacidose seguiu o protocolo institucional, já publicado anteriormente.[65] (Resumido na Figura 3)

Na admissão, os seguintes exames e procedimentos foram realizados nos pacientes em CAD: aferição do peso em balança digital, glicemia de ponta de dedo; cetonemia de ponta de dedo e/ou cetonúria por fita urinária; coleta de amostras para glicemia, sódio, potássio, cloro, fósforo, cálcio iônico, magnésio, gasometria venosa, ureia e creatinina, sendo possível o cálculo da osmolalidade sérica. A glicemia de ponta de dedo foi repetida a cada hora, até início da fase de manutenção da insulinoterapia, a cetonemia de ponta de dedo, quando disponível, foi realizada até a resolução da cetoacidose. A coleta de amostras para glicemia, sódio, potássio, cloro, fósforo, cálcio iônico, magnésio, gasometria venosa, ureia e creatinina se repetiu após 2, 4, 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 horas de tratamento.

Após a avaliação inicial, os pacientes foram submetidos à fase de reparação de volume, com administração de solução de NaCl 0,9% com volume variável de acordo com a apresentação clínica do paciente, sendo 50 mL/kg (máximo 1.000 mL) na primeira hora em caso de instabilidade hemodinâmica, 20 mL/kg (máximo 1.000 mL) na primeira hora, não havendo instabilidade hemodinâmica, e 10 mL/kg/hora nas horas subsequentes, até a hidratação clínica. Quando a glicemia foi de $\leq$ 200 mg/dL e o paciente ainda necessitava de expansão para reposição de volume, foi utilizada solução ao meio de NaCl 0,9% e soro glicosado 5%. Após a hidratação clínica, caso o paciente apresentasse condições clínicas para aceitação via oral, a dieta e oferta abundante de líquidos foram liberadas, caso contrário, foi iniciado soro de manutenção com oferta 100 mL/100 kcal, 5 mEq/100 Kcal de potássio e soro glicosado 5%, até que o paciente apresentasse condições para aceitação via oral.

A reposição de potássio foi iniciada após a primeira hora de hidratação, desde que o resultado de potássio sérico apresentasse $\leq$ 6,5 mEq/L e o paciente tivesse diurese, com solução de cloreto de potássio ou fosfato monobásico de potássio na concentração 30 mEq/L, com velocidade máxima de infusão de 0,5 mEq/kg/h, mantida enquanto houvesse necessidade de expansão com solução de NaCl 0,9% ou de soro de manutenção; após suspensão dos fluidos endovenosos, se necessário, foi iniciada a reposição de

potássio via oral com 4 a 5 mEq/100 kcal, utilizando-se xarope de KCl ou comprimidos.

A reposição de bicarbonato de sódio foi considerada em pacientes com pH < 7,0 ou pH entre 7,0 e 7,1 e bicarbonato < 5,0 mEq/L, persistente após a primeira hora de expansão. Quando necessária, a dose utilizada foi 1-2 mEq/kg em 1 hora.

A introdução de insulinoterapia ocorreu após a primeira hora de reposição de volume, utilizando-se análogo de ação ultrarrápida de insulina (lispro ou aspart) na dose 0,15 U/kg de uso subcutâneo a cada 2 horas. Em caso de queda de glicemia maior que 100 mg/dL em 1 hora, a dose foi reduzida para 0,1 U/kg a cada 2 horas. Quando a glicemia atingiu níveis < 200 mg/dL, foi iniciada a fase de manutenção da insulinoterapia, com aplicação subcutânea de 0,1 U/kg a cada 3 horas.

Após 12 horas de tratamento, desde que a cetoacidose estivesse resolvida, foi introduzida a insulina de ação intermediária, NPH na dose de 0,3 U/kg a cada 8 horas.

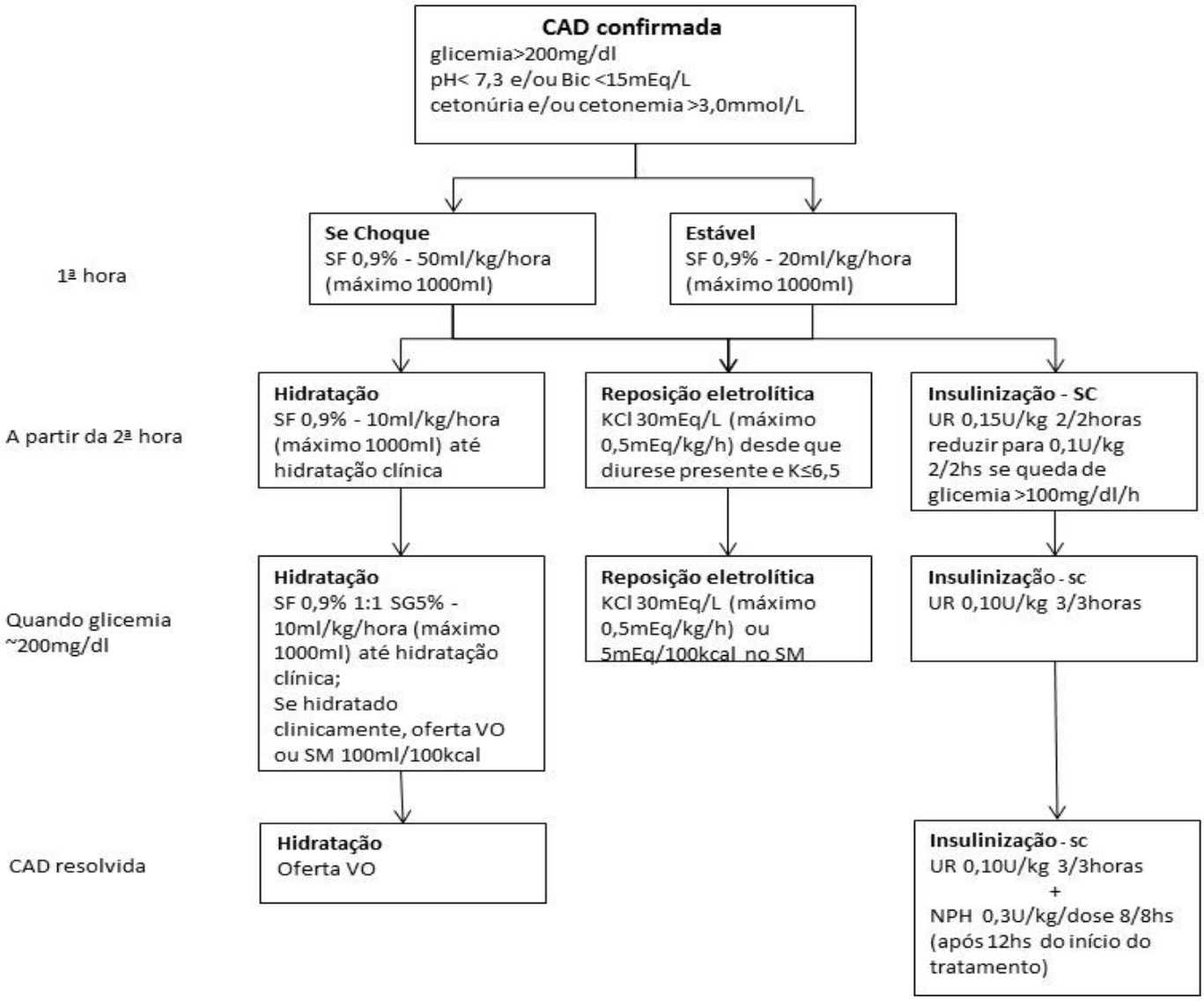


Figura 3. Tratamento da cetoacidose diabética. Principais etapas da reposição hídrica, eletrolítica e insulinoterapia realizadas durante o tratamento. BIC = bicarbonato; KCl = Cloreto de potássio; NPH - Neutral Protamine Hagedorn; SC = via subcutânea; SF = solução fisiológica; SG = soro glicosado; VO = via oral; SM = soro de manutenção; UR = análogo de ação ultrarrápida de insulina.

Os episódios de CAD foram classificados de acordo com sua gravidade, considerando-se o grau de acidose da seguinte forma:[1]

– Leve: pH < 7,3 ou bicarbonato < 15 mEq/L;

– Moderado: pH < 7,2 ou bicarbonato < 10 mEq/L;

– Grave: pH < 7,1 ou bicarbonato < 5 mEq/L.

Para avaliação do risco de morte dos pacientes à admissão, como indicador de gravidade, foi calculado o PIM (Pediatric Index of Mortality),[66] utilizando-se dados clínicos e laboratoriais obtidos à admissão.

A cetoacidose foi considerada resolvida quando pH > 7,3 e bicarbonato > 15 mEq/L, com melhora clínica do paciente.

4.4 Coletas e processamento de amostras

Além das amostras para dosagens de glicemia, eletrólitos e função renal, foram obtidas amostras para dosagens de leptina, ghrelina, glucagon, GH, cortisol, insulina e catecolaminas no momento da admissão (T0) e após 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 12 (T12), 24 (T24) e 72 (T72) horas do início do tratamento. Essas coletas foram realizadas no SCUT, na Unidade de Terapia Intensiva ou na enfermaria do ICr.

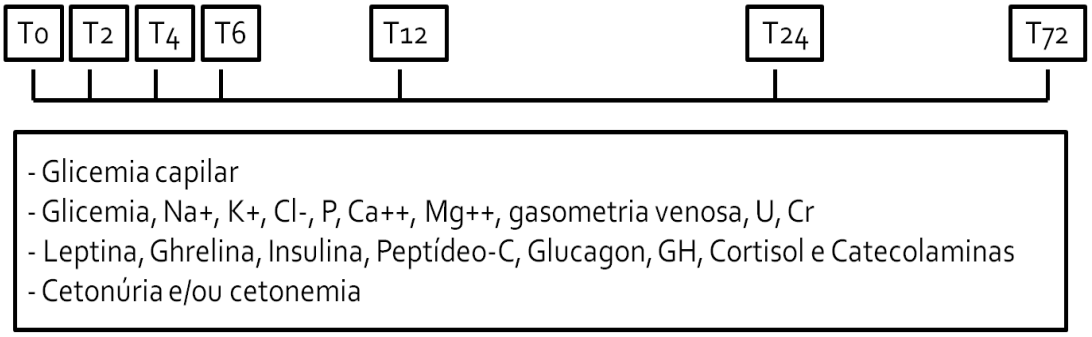


Figura 4. Tempos de coleta das amostras durante as primeiras 72 horas de tratamento dos episódios de cetoacidose diabética**.**

Após a resolução do quadro e a alta do paciente, foi realizada uma coleta concomitante à coleta de exames de seguimento de rotina ambulatorial pelo menos 2 meses depois da resolução do episódio de CAD para: glicemia, glucagon, leptina, ghrelina, insulina, GH, cortisol e catecolaminas (Tempo Estável, TE).

Para o grupo controle, foi realizada uma coleta em jejum de pelo menos 8 horas para glicemia, glucagon, leptina, ghrelina, insulina, GH, cortisol e catecolaminas.

As coletas de amostras para dosagens de glucagon e ghrelina foram realizadas em tubos EDTA previamente preparados com 20 µL de aprotinina bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) por mL de sangue e mantidos refrigerados até o momento da coleta; as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4 ^{o}C e 2.500 rpm durante 5 minutos para obtenção do plasma.

As coletas de amostras para dosagens de catecolaminas foram realizadas em tubos secos previamente preparados e mantidos refrigerados até o momento da coleta; as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4 ^{o}C e 2.500 rpm durante 5 minutos para obtenção do plasma.

As amostras para dosagens de cortisol, GH e insulina foram realizadas em tubos de soro com gel, centrifugadas em temperatura ambiente e 2.500 rpm durante 10 minutos para separar o soro.

As amostras para dosagens de leptina, ghrelina, glucagon, GH, cortisol, insulina e catecolaminas foram centrifugadas e separadas em tubos criogênicos no laboratório do Instituto da Criança e armazenadas até a análise em freezer -20 ºC no Centro de Pesquisa Clínica do Instituto da Criança e, posteriormente, encaminhadas para análises em setores específicos.

As dosagens de cortisol, GH e insulina foram realizadas no Laboratório de Hormônios do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por método imunorradiométrico (Auto-Delfia, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). As amostras para dosagens de ghrelina, leptina e glucagon foram encaminhadas ao Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio, LIM 18, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para realização pelo método ELISA para leptina (Human Leptin ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ou Radioimunoensaio para glucagon (Glucagon RIA kit, GL-32K**,** Millipore, St Charles, MO, USA); e ghrelina (Ghrelin (Total) RIA kit, GHRT-89HK, Millipore, St Charles, MO, USA). As amostras para dosagens de adrenalina foram encaminhadas ao laboratório do Instituto do Coração (INCOR) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram realizadas por HPLC (Waters, Milford, MA, USA).

4.5 Análise estatística

As concentrações dos diferentes hormônios entre os diferentes tempos de coleta foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA com pós-teste de Tuckey-Kramer quando indicado para as variáveis de distribuição normal, e o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para as variáveis de distribuição não Gaussiana. Para comparar as concentrações dos diferentes hormônios entre pacientes e grupo controle, foram utilizados os testes t de Student, para variáveis de distribuição normal, e o teste de Mann Whitney, para variáveis de distribuição não Gaussiana. O teste de D'Agostino & Pearson foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados.

Para avaliar as correlações entre as concentrações dos diferentes hormônios, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis de distribuição normal ou Spearman para aquelas de distribuição não Gaussiana.

Para avaliar variáveis categóricas entre os grupos, foi utilizado o teste do qui-quadrado.

Foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Foram avaliados 25 episódios de CAD em 22 pacientes, sendo 18 do sexo feminino (81,6%) e 4 do sexo masculino (18,4%). Um paciente do sexo masculino apresentou 3 episódios da CAD e uma paciente do sexo feminino apresentou 2.

A idade em média ± DP (mínimo a máximo) foi de 12,27 ± 2,55 (8,2 a 17,9) anos, 6 pacientes eram pré-púberes (um deles apresentou 2 episódios de CAD) e 16 já apresentavam sinais clínicos de puberdade. O z-score de IMC foi -0,43 ± 1,52.

O tempo de diabetes no momento do episódio de CAD foi de 47 ± 38,8 (0 a 101) meses, sendo que em 5 pacientes o diagnóstico de DM foi realizado no momento da admissão por CAD, sendo 1 paciente do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idades entre 8,2 e 13,8 anos (média 10,3 anos). Dentre os casos com DM previamente diagnosticados, a causa mais frequente da CAD foi omissão de insulina e apenas um paciente apresentava infecção associada (pielonefrite).

Quanto à gravidade da CAD, 7 episódios foram graves (28%), 8 episódios foram moderados (32%) e 10 foram leves (40%). Todos os casos de primodescompensação diabética foram leves em sua apresentação.

O risco de morte à admissão calculado pelo PIM foi em média de 3,88% (± 2,0), concordante com a gravidade do episódio de CAD; sendo o PIM dos casos de CAD grave significativamente maior que o score dos casos de CAD leve (6,31 ± 1,7 e 2,48 ± 0,96% respectivamente; p = 0,0004).

O tempo para resolução da CAD foi de 11,2 ± 7,0 (3 a 25) horas, com dose total de insulina utilizada nas primeiras 24 horas de 1,2 ± 0,3 (0,6 a 1,79) U/kg e 3,5 ± 0,7 (2,0 a 5,1) U/kg nas primeiras 72 horas de tratamento.

Quinze pacientes realizaram nova coleta para dosagens hormonais após estabilização do quadro, durante seguimento de rotina ambulatorial, no mínimo 2 meses após o episódio. O z-score de IMC no TE foi de 0,21 ± 1,43 e a dose de insulina basal utilizada de 0,77 ± 0,27 (0,35 a 1,28) U/kg/dia.

O grupo controle foi composto de 21 indivíduos hígidos, comparáveis ao grupo de estudo quanto ao sexo, sendo 17 indivíduos do sexo feminino (81%) e 4 do sexo masculino (19%; p 0,941); idade 12,5 ± 3,29 (7 a 17,5) anos (p 0,792) e z-score de IMC 0,27 ± 0,84 (p 0,062 em relação à admissão por CAD e p 0,867 em relação ao momento estável).

5.1 Leptina

Os dados referentes às dosagens de leptina nos diferentes momentos do tratamento da CAD e no grupo controle são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Evolução das dosagens de leptina (pg/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

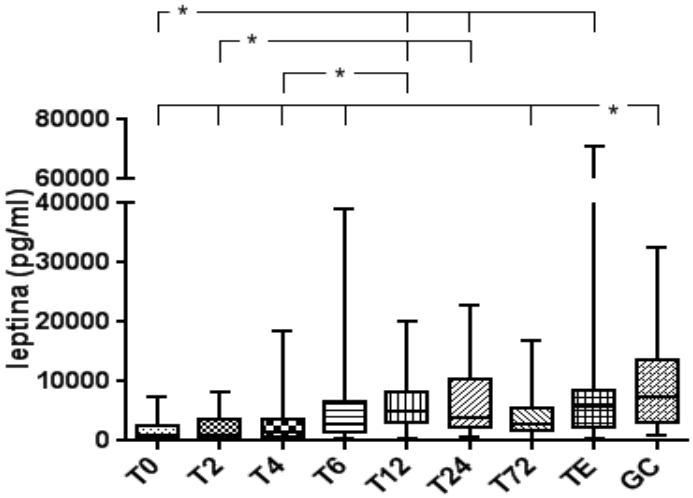
	Média	DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição Normal?
T0	1.883	1.989	1.072	419,5	2.613	Não
T2	2.215	2.388	977	621,5	3.538	Não
T4	3.074	4.350	1.530	680,8	3.696	Não
T6	5.158	7.822	2.709	1.607	6.751	Não
T12	6.749	5.626	5.122	3.015	8.139	Não
T24	6.445	5.766	3.847	2.319	10.465	Não
T72	4.756	4.971	2.947	1.700	5.590	Não
TE	10.574	17.974	5.892	1.839	8.349	Não
Controle	9.736	8.527	7.560	3.108	13.710	Não

DP = Desvio Padrão. TE = Tempo Estável.

As dosagens de leptina foram significativamente menores no T0 em relação ao T12, T24, TE e grupo controle, e mostraram tendência à elevação ao longo do tratamento, com concentrações maiores no T12 e T24 em relação ao T2 e em T12 em relação ao T4, e foram significativamente maiores no grupo controle em relação ao T2, T4, T6 e T72. No momento estável, a leptinemia foi

significativamente maior em relação ao T0 e comparável ao grupo controle (Gráfico 1, Anexos A e B):

Gráfico 1. Dosagens de leptina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. TE = Tempo Estável; GC = Grupo Controle* = p < 0,05.



5.2 Ghrelina

Os dados referentes às dosagens de ghrelina nos diferentes momentos do tratamento da CAD e no grupo controle são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Evolução das dosagens de ghrelina (pg/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Média	DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição Normal?
T0	620	190,3	593	475,9	728,5	Sim
T2	506,2	149,4	482,1	378,8	624,6	Sim
T4	517,1	183,5	473,5	404	595	Sim
T6	521,3	199,3	513	406	621	Sim
T12	590,2	231,1	520,3	453,5	713	Não
T24	643,6	205,4	639,2	483,4	824	Sim

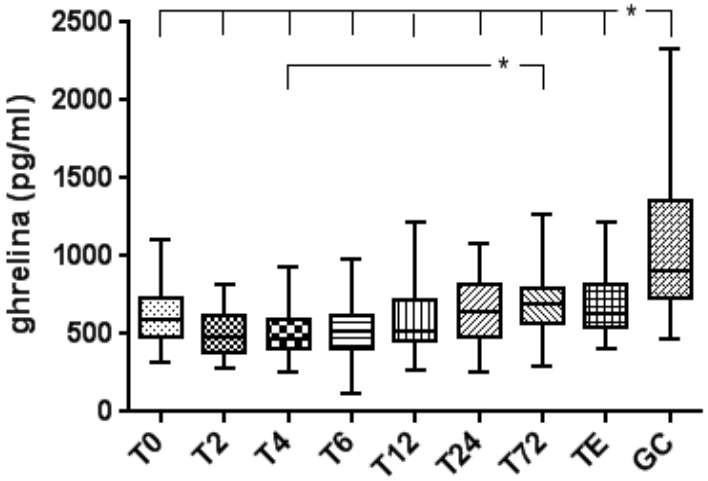
T72	697,9	205	696	563	792,4	Sim
TE	716,1	228,2	633	544	821	Sim
Controle	1.058	440	912	726,5	1.351	Não

DP = Desvio Padrão

A comparação entre os diferentes tempos de coleta nos pacientes diabéticos evidenciou diferença significativa apenas entre T4 e T72, sendo o último mais elevado (diferença de -48,73 e $p < 0,05$).

O grupo controle apresentou valores significativamente mais elevados em comparação a todos os tempos de coleta nos pacientes diabéticos, conforme o Gráfico 2 (Anexo C):

Gráfico 2. Dosagens de ghrelina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. TE = Tempo Estável; GC = Grupo Controle* = $p < 0,05$.



5.3 Glicemia

Os dados referentes às dosagens de glicemia são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Evolução das dosagens de glicemia (mg/dL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

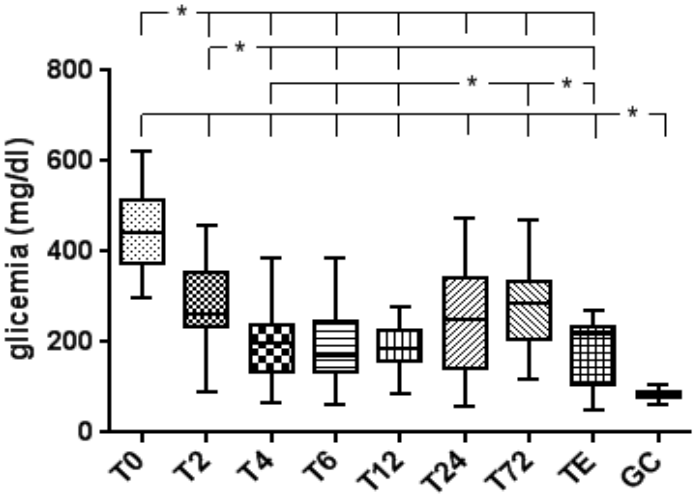
	Média	DP	Distribuição Normal?
T0	447,5	101,9	Sim
T2	276,1	89,1	Sim
T4	191,7	72,2	Sim
T6	184,4	82,5	Sim
T12	187,4	48,9	Sim
T24	238	122,7	Sim
T72	280,6	103,3	Sim
TE	179,9	76	Sim
Controle	84,3	9,0	Sim

DP = Desvio Padrão

No primeiro momento (T0), a glicemia foi significativamente maior que em todos os outros tempos de coleta durante a CAD e em relação ao grupo controle.

Durante o tratamento da CAD, a glicemia apresentou redução gradativa nas primeiras 12 horas, com nova elevação no momento T72 (Gráfico 3; Anexo D):

Gráfico 3. Dosagens de glicemia durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. TE = Tempo Estável; GC = Grupo Controle* = p < 0,05.



O grupo controle apresentou valores de glicemia significativamente menores em todas as avaliações em relação aos pacientes diabéticos, conforme o Gráfico 3 (Anexo E).

5.4 Insulina

Os dados referentes às dosagens de insulina são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Evolução das dosagens de insulina (µU/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

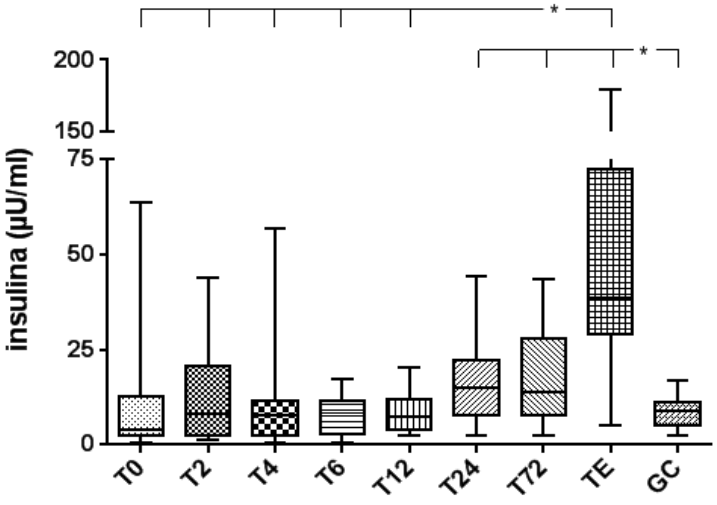
	Média	DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição Normal?
T0	11,4	16,1	4	2,4	12,7	Não
T2	12,8	12,6	8	2,4	20,8	Não
T4	11,5	15,1	7,6	2,4	11,7	Não
T6	7,8	5,2	8,3	2,7	11,4	Sim
T12	8,4	5,2	7,2	4,0	11,8	Sim

T24	16,3	10,8	15	7,5	22,4	Sim
T72	16,9	11,9	13,8	7,7	28	Sim
TE	59	53,4	38,8	28,9	72,5	Não
Controle	8,7	3,8	8,9	5,0	11,1	Sim

DP = Desvio Padrão

As dosagens de insulina no tempo 0 foram significativamente menores que no tempo estável e semelhante às dosagens de insulina nos indivíduos do grupo controle. A insulinemia não apresentou diferenças significativas durante as 72 horas de tratamento, sempre menores que no tempo estável, no entanto, a partir do T24, as concentrações foram mais elevadas em comparação ao grupo controle (Gráfico 4, Anexos F e G):

Gráfico 4. Dosagens de insulina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. TE = Tempo Estável; GC = Grupo Controle* = p < 0,05.



5.5 Glucagon

Os dados referentes às dosagens de glucagon são apresentados na Tabela 5.

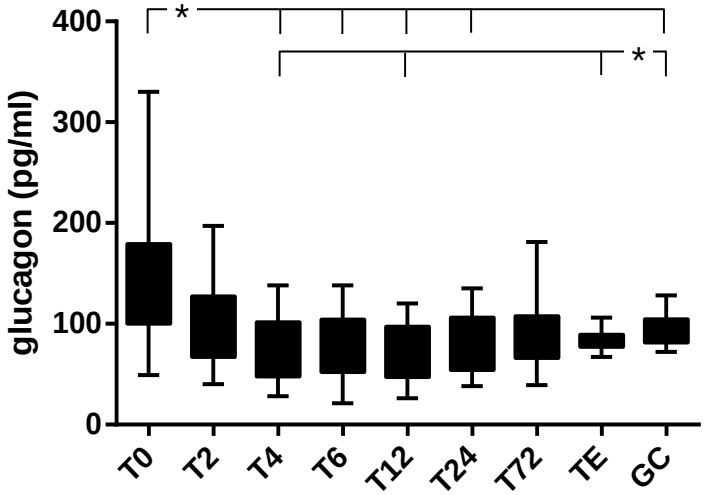
Tabela 5 – Evolução das dosagens de glucagon (pg/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Média	DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição Normal?
T0	145,9	72,4	128	100	179	Não
T2	98,5	41,4	90	67	127	Sim
T4	77,7	30	84	47,7	101,5	Sim
T6	78,5	31,4	80	52	104	Sim
T12	71,8	27,5	74	47	97,2	Sim
T24	81,5	29,3	87	54	106	Sim
T72	88,5	32,9	85	66	107,5	Não
TE	83,5	10,9	84	77	89	Sim
Controle	93,1	14,4	89	81,5	104,5	Sim

DP = Desvio Padrão

As dosagens de glucagon no T0 foram significativamente maiores que nos tempos T4 a T24 (Gráfico 5, Anexo H).

Gráfico 5. Dosagens de glucagon durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. TE = Tempo Estável; GC = Grupo Controle* = p < 0,05.



As concentrações de glucagon no grupo controle foram significativamente menores em relação ao T0 e maiores em relação a T4, T12 e TE (Gráfico 5, Anexo I).

5.6 Hormônio do Crescimento (GH)

Os dados referentes às dosagens de GH são apresentados na Tabela 6.

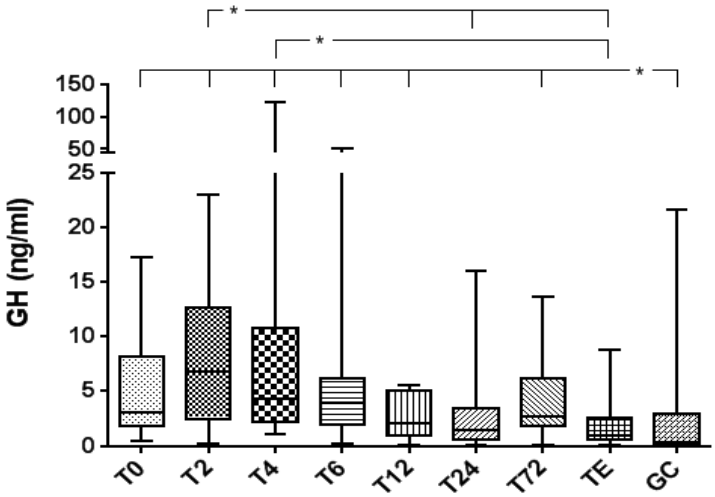
Tabela 6 – Evolução das dosagens de GH (ng/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Média	DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição Normal?
T0	5,1	4,5	3,1	1,8	8,2	Não
T2	8,3	7,1	6,8	2,5	12,6	Sim
T4	11,9	26,3	4,3	2,2	10,8	Não
T6	8	12,5	3,9	2	6,2	Não
T12	2,8	2	2,1	0,9	5	Não
T24	3,5	4,8	1,5	0,6	3,5	Não
T72	4,2	3,7	2,7	1,8	6,1	Não
TE	1,9	2,3	1	0,5	2,5	Não
Controle	2,7	5,1	0,3	0,1	2,9	Não

DP = Desvio Padrão

As concentrações de GH foram mais elevadas no início do tratamento, com níveis no T2 significativamente maiores que no T24, e níveis nos T2 e T4 significativamente maiores que no TE. As concentrações de GH nos tempos T0 a T12 e T72 foram maiores que no grupo controle (Gráfico 6, Anexos J e K).

Gráfico 6. Dosagens de GH durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. TE = Tempo Estável; GC = Grupo Controle* = p < 0,05.



5.7 Cortisol

Os dados referentes às dosagens de cortisol são apresentados na Tabela 7.

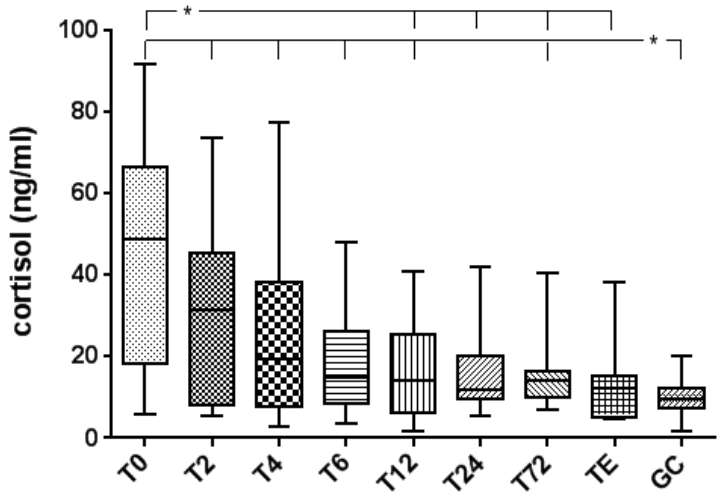
Tabela 7 – Evolução das dosagens de cortisol (µg/dL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Média	DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição Normal?
T0	44	27,4	48,7	18,1	66,3	Sim
T2	29,8	21	31,4	8,2	45,5	Sim
T4	24,8	18,8	19,3	7,8	38,2	Não
T6	18,7	12,2	14,8	8,5	26,3	Sim
T12	16,3	11,5	14,2	6,2	25,3	Sim
T24	15,5	10	11,9	9,5	20,1	Não
T72	15,0	8	14,1	9,9	16,6	Não
TE	12,5	8,7	12,3	5,3	15,1	Não
Controle	10,2	4,3	9,6	7,3	12,1	Sim

DP = Desvio Padrão

O cortisol apresentou concentrações maiores no T0 que nos tempos T12, T24, T72 e TE (Gráfico 7, Anexo L):

Gráfico 7. Dosagens de cortisol durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. TE = Tempo Estável; GC = Grupo Controle* = p < 0,05.



As dosagens de cortisol no grupo controle foram significativamente menores em relação ao T0 a T12 e T72 (Gráfico 7, Anexo M).

5.8 Norepinefrina

Os dados referentes às dosagens de norepinefrina são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Evolução das dosagens de norepinefrina (pg/mL) durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

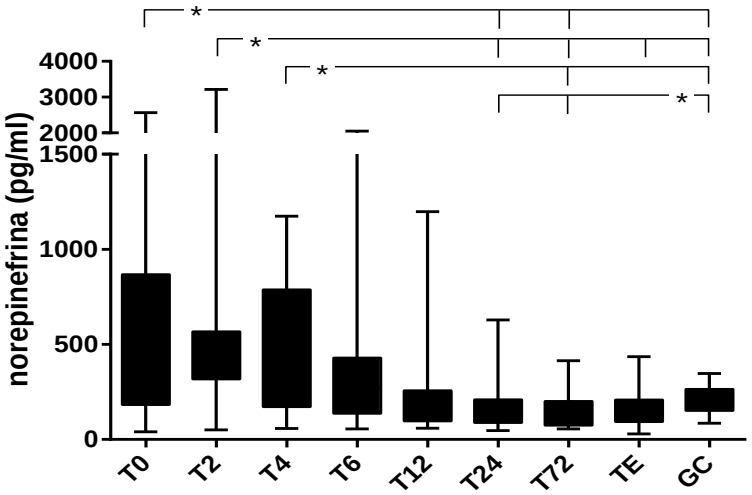
	Média	DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição Normal?
T0	566,3	613	342	184	867	Não
T2	576,8	678,1	430,5	318,8	566,5	Não
T4	432,6	341,2	279	172	786,8	Sim
T6	376,9	427,9	271	138,3	427,5	Não

T12	281,4	298,9	188	98	256	Não
T24	182,8	145,2	142	88,5	208,5	Não
T72	139	90,4	99	75	200	Não
TE	166,4	101,2	154	94,2	207,8	Não
Controle	221,4	81,8	243	152,5	263,8	Sim

DP = Desvio Padrão

As dosagens de norepinefrina foram significativamente maiores ao diagnóstico e nas primeiras horas de tratamento, com dosagens no T0 e T2 maiores em relação ao T24 e T72, T2 também maior em relação ao TE e T4 maior em relação ao T72 (Gráfico 8, Anexo N).

Gráfico 8. Dosagens de norepinefrina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética. TE= Tempo Estável; GC = Grupo Controle* p < 0,05.



As dosagens de norepinefrina foram significativamente menores nos indivíduos do grupo controle em relação a T0 a T4, porém significativamente maiores em relação a T24 e T72 (Gráfico 8, Anexo O).

5.9 Correlações

Foram avaliadas as correlações entre as concentrações dos diferentes hormônios, além da glicemia, ao diagnóstico da CAD (T0), durante seu tratamento (T2 a T72), após estabilização do quadro (TE) e no grupo controle.

As correlações encontradas no T0 estão descritas na tabela 9 (Anexos P a S).

Tabela 9 – Correlações entre leptina, ghrelina e glicemia, insulina, glucagon, GH e cortisol ao diagnóstico de cetoacidose diabética (T0)

	Pearson r	Spearman r	p	Número de pares
Leptina x glucagon		-0,58	0,002	25
Ghrelina x glicemia	0,58		0,049	22
Ghrelina x insulina		-0,46	0,036	21
Ghrelina x glucagon		0,45	0,023	25

As correlações encontradas durante o tratamento da CAD (T2 a T72) estão descritas na tabela 10 (Anexos T a X).

Tabela 10 – Correlações entre leptina, ghrelina e glicemia, insulina, glucagon, GH e cortisol durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética (T2 – T72)

	Spearman r	p	Número de pares
Leptina x glicemia	-0,37	<0,0001	108
Leptina x insulina	0,23	0,019	104
Leptina x glucagon	-0,36	<0,0001	122
Ghrelina x insulina	0,27	0,005	104
Ghrelina x glucagon	0,33	0,0001	129

No tempo estável, houve somente correlação positiva entre ghrelina e glucagon, com coeficiente r de Pearson 0,63, e p 0,012 em 15 pares avaliados (Anexo Y).

As correlações encontradas no grupo controle estão descritas na Tabela 11 (Anexos Z a AC).

Tabela 11 – Correlações entre leptina, ghrelina e glicemia, insulina, glucagon, GH e cortisol no grupo controle

	Pearson r	Spearman r	p	Número de pares
ghrelina x glicemia	-0,44		0,047	21
ghrelina x insulina	-0,63		0,002	21
ghrelina x glucagon	0,54		0,011	21
ghrelina x leptina		-0,49	0,023	21

Houve correlação positiva entre o z-score de IMC e leptina ao diagnóstico da CAD (r 0,74; p < 0,0001) e no TE (r 0,85; p = 0,0001) (Anexos AD e AE); no entanto, não houve correlação entre o ganho de peso avaliado pela diferença entre z-score de IMC (ΔIMC) e o aumento de leptina (Δleptina) entre o momento estável e o tempo 0 (r 0,23; p 0,41).

6 DISCUSSÃO

Avaliando os pacientes diabéticos durante os diferentes tempos de coleta, observamos três momentos distintos: o primeiro, ao diagnóstico de CAD, onde prevaleceram a hiperglicemia, a insulinopenia, o hipercatabolismo e o aumento de hormônios contrarreguladores da insulina; o segundo, durante o tratamento da CAD, onde ocorreram o aumento progressivo da insulinização, a reidratação do paciente e a redução do catabolismo; e o terceiro, após resolução completa do quadro de descompensação, com o paciente já em regime ambulatorial de tratamento, onde o componente marcante foi a hiperinsulinização.

Ao diagnóstico da CAD (T0), observamos concentrações elevadas de glicemia, com insulinemia semelhante à dos indivíduos do grupo controle; no entanto, desproporcionalmente baixas, considerando os níveis de glicemia (relação glicemia/insulina 71,2 (7,6 a 940) no T0 e 10,0 (4,6 a 35,1) no GC, com $p < 0,001$ (Anexos AF, AG e AH). As concentrações de glucagon, GH, cortisol e norepinefrina encontraram-se elevadas, como esperado, considerando a fisiopatologia da CAD e contribuindo ainda mais para a hiperglicemia e a resistência à ação da insulina. A própria norepinefrina atua estimulando a liberação de cortisol e glucagon, estimulando a glicogenólise e a neoglicogênese[67] e perpetuando o ciclo de da descompensação. Nesse momento, as dosagens de leptina e ghrelina encontraram-se diminuídas em relação ao grupo controle.

As concentrações reduzidas de leptina nesse momento são compatíveis em relação aos encontrados por Fluck, Hathout e Kitabchi e concordantes com o fato de a leptinemia ser correspondente ao estado de suficiência de energia e estar diminuída em um momento de hipercatabolismo e hipoinsulinemia.[37,39,40] Os dados, no entanto, são discordantes daqueles encontrados por Nakamura, possivelmente devido aos pacientes avaliados em seu estudo apresentarem sinais de infecção como febre e aumento de proteína C reativa, possivelmente elevando os níveis de citocinas inflamatórias, que poderiam aumentar as concentrações de leptina. Apenas um paciente de nossa casuística apresentou

infecção como desencadeante da CAD, porém apresentou também dosagens de leptina com níveis diminuídos no T0 em relação aos apresentados após o início do tratamento, e, portanto, discordante dos dados de Nakamura.[35]

Assim, contrariando a hipótese inicial, apesar do aumento do catabolismo, hipoinsulinemia, hiperglucagonemia e de catecolaminas, situações que, fisiologicamente, elevariam as concentrações de ghrelina, foram mais baixas que no grupo controle e não apresentaram diferenças significativas em relação aos outros tempos durante o tratamento da CAD. A elevação marcante da glicemia poderia exercer um papel na supressão da ghrelina,[68] que seria mais importante que os possíveis efeitos estimulatórios de outros fatores supracitados, apesar dos resultados conflitantes anteriores em relação ao papel da glicemia na secreção de ghrelina.[58,68] Nesse momento, observamos uma correlação positiva entre ghrelina e glicemia, o que em um primeiro momento aparenta ser contraditório ao possível papel inibitório da hiperglicemia, porém, apesar dessa correlação positiva, os níveis de ghrelina oscilaram em uma faixa de valores bem inferior àquela do GC, e podemos interpretar que hiperglicemias graves não têm um poder maior de inibição na produção e liberação de ghrelina em relação a hiperglicemias moderadas. Além da hiperglicemia, também é interessante notar que o lactato (que não foi avaliado neste estudo, porém supostamente se encontra elevado ao diagnóstico da CAD) pode exercer um papel inibitório na secreção de ghrelina.[69]

Também, neste primeiro momento, foram encontradas correlações negativas entre ghrelina e insulina, que foram descritas anteriormente; no entanto, relacionadas a doses farmacológicas de ghrelina[70] e compatíveis com os achados de Park, considerando essa uma situação de balanço energético baixo, onde a ghrelina levaria à inibição da secreção e liberação de insulina, com seu receptor atuando via proteína Gαi, e aumento da secreção de glucagon, também compatível com a correlação positiva entre esses dois hormônios encontrada nesse momento.[49]

As dosagens baixas no momento da descompensação são compatíveis com os estudos anteriores de Holdstock, Soriano-Guillén e Martos-Moreno, que

avaliaram crianças ao diagnóstico de DM, apesar de nem todas apresentarem-se em CAD.[62,64,71]

Durante o tratamento da CAD, a glicemia apresentou redução gradativa durante as primeiras 24 horas, com nova elevação no momento T72, quando os pacientes já apresentavam melhor aceitação alimentar e as doses de insulina basal ainda necessitavam de ajustes. A insulinemia não apresentou diferenças significativas durante as 72 horas de tratamento; no entanto, a partir do T24, as concentrações foram mais elevadas em comparação ao grupo controle e com queda na relação glicemia/insulina, evidenciando a hiperinsulinização progressiva. Quanto aos contrarreguladores da insulina, houve tendência à redução em suas concentrações ao longo das 72 horas de tratamento, porém no T72 tanto GH quanto cortisol apresentaram-se ainda elevados em relação ao grupo controle, enquanto a norepinefrina apresentou-se diminuída em relação ao grupo controle no T24 e T72. A leptinemia mostrou tendência de elevação ao longo do tratamento, porém com concentrações ainda inferiores às do grupo controle no T72. A ghrelina apresentou valores significativamente menores no T4 em relação ao T72, mantendo-se sempre diminuída em relação ao grupo controle.

Quanto à leptina, os dados são compatíveis com os estudos de Fluck, Hathout e Kitabchi, todos mostrando elevação significativa das concentrações de leptina após o início da insulinoterapia.[37,39,40] Nos estudos de Nakamura e Kitabchi, no momento da alta, a leptinemia dos pacientes era comparável à do grupo controle; já o estudo de Hathout mostrou que 24 horas após o início do tratamento, as dosagens de leptina eram comparáveis às dosagens de diabéticos estáveis, porém ainda diminuídas em relação aos indivíduos saudáveis.[35,39,40] Soriano Guillén e Martos-Moreno não encontraram diferenças significativas nas dosagens de leptina ao longo do tratamento.[64,71] A elevação de leptina nesse momento provavelmente está relacionada à resolução progressiva do hipercatabolismo, diminuição da lipólise e consequente melhora da sinalização de suficiência de energia.

A redução de ghrelina em relação ao grupo controle, a partir do momento em que os pacientes encontraram-se hiperinsulinizados, é condizente com estudos de Flanagan, que mostrou inibição da liberação de ghrelina com

aumento de insulinemia de forma independente da glicemia, em *clamps* hipo, eu e hiperglicêmicos, e de Schaller, que mostrou que o aumento da glicemia acompanhado de doses suprafisiológicas de insulina eram capazes de diminuir as concentrações de ghrelina.[58,59]

Durante o tratamento da CAD, foi observada correlação positiva entre ghrelina e insulina, ao contrário do observado no tempo 0 e no grupo controle, também compatível com os achados de Park, considerando já a transição para um balanço energético alto, onde diminuindo a relação ghrelina:somatostatina, o receptor da ghrelina atuaria via proteína Gαq, deixando de exercer papel inibitório na secreção e ação da insulina; no entanto, a correlação positiva nesse momento entre ghrelina e glucagon seria contraditória em relação a esses achados.[49] A correlação negativa entre leptina e glicemia poderia estar relacionada a níveis menos elevados de glicemia, correspondendo à progressão da resolução do hipercatabolismo. Também houve correlação positiva entre leptina e insulina e negativa entre leptina e glucagon, o que já era esperado.

No terceiro momento (TE), houve redução da glicemia, com elevação da insulinemia. Quanto aos contrarreguladores da insulina, as concentrações de GH, cortisol e noradrenalina foram semelhantes às do grupo controle. As concentrações de glucagon também foram menores no TE em relação ao grupo controle, que possivelmente foi suprimido pelos altos níveis de insulina nesse momento. As concentrações de leptina foram significativamente maiores em relação ao T0 e comparáveis ao grupo controle, apesar da correlação positiva da leptina com IMC nos momentos 0 e TE, o ganho de peso isoladamente não explica a elevação dos níveis de leptina, uma vez que não houve correlação entre ΔIMC e Δleptina entre os dois momentos. As dosagens de ghrelina foram significativamente menores quando comparados ao grupo controle e não apresentaram diferenças significativas em relação aos outros momentos avaliados durante a CAD, também compatíveis com o aumento da insulinização, hiperglicemia e concentrações diminuídas de glucagon. Nesse momento, novamente a ghrelina apresentou correlação positiva com as concentrações de glucagon.

No estudo de Holdstock, as dosagens de ghrelina após dez dias de tratamento com insulina eram maiores que ao diagnóstico.[62] Ashraf não avaliou indivíduos saudáveis, mas encontrou valores de ghrelina significativamente menores após 3 meses de tratamento com insulina em relação às dosagens pré-tratamento e na manhã seguinte, diferente dos achados neste estudo.[63]

Quando comparados T72 e TE, foram encontrados níveis mais elevados de glicemia no T72; no entanto, não há diferença significativa em relação aos hormônios avaliados. Sendo assim, após 72 horas de tratamento, com a CAD resolvida, grande parte do desarranjo metabólico da descompensação foi normalizado.

Apesar de não fazer parte dos objetivos específicos deste estudo, mais uma vez a utilização da insulina ultrarrápida subcutânea intermitente no tratamento da CAD mostrou-se eficaz e segura, com a resolução completa de episódios leves, moderados e graves, sem a ocorrência de qualquer complicação, de forma concordante com dados publicados anteriormente.[65]

Comparando TE ao grupo controle, foram encontrados níveis elevados de glicemia e insulinemia, diminuídos de glucagon e ghrelina e relação glicemia/insulina baixa (apesar da glicemia significativamente maior, as concentrações séricas de insulina são desproporcionalmente elevadas; Anexos AF, AG e AH). No grupo controle, a ghrelina apresentou correlação inversa com níveis de glicose e insulina, e correlação positiva com os níveis de glucagon, compatíveis com a fisiologia desses hormônios com aumento de glucagon e do hormônio orexígeno em um momento de jejum, concomitante à redução de glicemia e insulinemia, a fim de evitar um episódio de hipoglicemia.[56]

No grupo controle, foram encontradas correlações negativas entre ghrelina e glicose e insulina, positiva entre ghrelina e glucagon, novamente compatíveis com os achados de Park, considerando um balanço de energia baixa, e a ghrelina atuando com a função de prevenir episódios hipoglicêmicos; foi o único momento em que ghrelina e leptina se correlacionaram de forma negativa.[49]

A principal limitação deste estudo encontra-se no tamanho da amostra, pequeno devido à dificuldade de recrutamento de pacientes, inclusive

relacionado ao limite de peso utilizado como critério de inclusão, que não permitiu a avaliação de pacientes menores de 5 anos, população em que há um aumento recente na incidência de CAD. Houve uma predominância de pacientes de sexo feminino e de pacientes já com diagnóstico prévio de DM1, o que é compatível com a literatura que indica meninas adolescentes como principal grupo de risco para CAD e a grande possibilidade de recorrência (neste estudo 2 pacientes foram responsáveis por 5 episódios). Contudo, a limitação da amostra não permitiu a avaliação desses e outros fatores, como estadiamento puberal e gravidade da CAD, como possíveis cofatores influenciando as concentrações hormonais encontradas.

Além disso, as dosagens de ghrelina envolveram apenas a ghrelina total, apesar de ainda não estar bem definido o papel (ou até mesmo a real existência na circulação) da des-acil-ghrelina, a dosagem específica de acil ghrelina poderia acrescentar informações em relação ao comportamento da ghrelina durante a CAD e sua resolução.

Por ser um quadro de grande instabilidade, e por envolver hormônios com mecanismos de regulação complexos, a interpretação dos achados durante a resolução da CAD é dificultada. Além disso, as correlações encontradas entre as concentrações hormonais devem ser interpretadas com cautela, uma vez que não são sinônimos de uma relação causa-efeito.

Apesar das limitações, neste estudo, foram encontradas concentrações baixas de leptina no momento da descompensação; seu possível papel benéfico já demonstrado em modelos animais, atuando na redução da produção de hormônios contrarreguladores da insulina (principalmente cortisol e glucagon), poderia auxiliar no tratamento da CAD, reduzindo o tempo necessário para sua estabilização. A leptina recombinante já está disponível para o tratamento de condições como lipodistrofia generalizada,[72] e, no momento, estão em andamento estudos em indivíduos com DM1 para avaliar se a leptina apresenta efeitos semelhantes em humanos aos já demonstrados em animais em relação ao melhor controle glicêmico em modelos DM1, e poderia ter papel como tratamento adjuvante da insulina nesses pacientes (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01268644). Futuramente, a avaliação do uso da leptina em condições de descompensação aguda, como a CAD, pode

avaliar se a sua reposição tem realmente papel terapêutico benéfico nessa condição.

Quanto à ghrelina, seus níveis baixos em relação aos indivíduos saudáveis no momento da descompensação, apesar de contrária à nossa hipótese inicial, seria uma adaptação benéfica neste momento, uma vez que, considerando o balanço energético baixo (apesar de níveis de glicemia aumentados, há insulinopenia e aumento de glucagon), o aumento da ghrelina poderia prejudicar ainda mais a ação da insulina, que já é baixa, e estimular ainda mais a liberação de glucagon, que já está aumentado. Por outro lado, após a estabilização, com balanço energético alto, onde há hiperglicemia e hiperinsulinemia, o aumento da ghrelina, ao menos a níveis comparáveis a indivíduos normais, poderia auxiliar na inibição da ação do glucagon e não supressão da liberação de insulina endógena e sua reposição poderia ser benéfica.

Além disso, estudos recentes mostram que a ghrelina poderia atuar como um “primer” para a liberação de GLP-1 em modelos animais,[73] e, por sua vez, o GLP-1 pode atuar tanto na inibição da liberação de glucagon quanto diretamente no hepatócito, inibindo a produção endógena de glicose.[74,75] Já é sabido que o GLP-1 está diminuído em pacientes diabéticos tipo 1,[76] assim, tanto a ação direta da ghrelina na liberação de insulina e glucagon quanto seu estímulo para liberação de GLP-1 poderiam ter efeitos benéficos no controle glicêmico de pacientes com DM1 estável.

No entanto, considerando os estudos de metodologias em populações diversas mostrando que administração farmacológica de ghrelina pode levar ao aumento do apetite, da ingestão alimentar, à diminuição da secreção de insulina estimulada pela glicose e à resistência à insulina, que poderiam também ser prejudiciais aos pacientes com diagnóstico de DM1 estabelecido, somente a efetiva realização de estudos avaliando os reais efeitos da reposição de ghrelina até níveis comparáveis a indivíduos saudáveis poderiam esclarecer as dúvidas relacionadas a um possível papel terapêutico nessa população.

Assim, este estudo identifica alterações nas concentrações de leptina e ghrelina ao diagnóstico e ao longo do tratamento e resolução da CAD, que

merecem investigações mais específicas quanto a possíveis benefícios de tratamentos adjuvantes utilizando-se análogos de leptina e ghrelina em relação aos atuais.

7 CONCLUSÃO

As inúmeras alterações metabólicas presentes no momento da CAD e durante seu tratamento interferem nas concentrações de leptina e ghrelina desse período.

Ao diagnóstico de CAD, as concentrações de leptina encontram-se diminuídas em relação a diabéticos estáveis e indivíduos saudáveis. Após a resolução do quadro, as concentrações de leptina tornam-se semelhantes em pacientes com DM1 em relação a indivíduos saudáveis, podendo ser um marcador de catabolismo.

As concentrações de ghrelina permaneceram baixas durante todo o estudo em pacientes diabéticos em relação a indivíduos saudáveis, independentemente da descompensação.

As correlações entre ghrelina e glicemia e insulina ocorrem de maneira distinta durante a CAD, provavelmente sob influência de outros fatores reguladores.

8 ANEXOS

ANEXO A - Comparação de dosagens de leptina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
T0 x T12	-61,1	<0,001
T0 x T24	-55,9	<0,01
T0 x TE	-57,3	<0,01
T2 x T12	-56,0	<0,01
T2 x T24	-50,8	<0,05
T4 x T12	-47,9	<0,05

TE = Tempo estável;

ANEXO B - Comparação das dosagens de leptina entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T0	6488 (2540 a 10114)	<0,0001
Controle x T2	6583 (2321 a 10160)	<0,0001
Controle x T4	6030 (1737 a 9798)	<0,001
Controle x T6	4851 (747 a 8291)	<0,01
Controle x T72	4613 (368 a 8198)	<0,05

ANEXO C - Comparação das dosagens de ghrelina entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T0	319 (189 a 610)	< 0,0001
Controle x T2	429 (286 a 731)	< 0,0001
Controle x T4	438,5 (287 a 720)	<0,0001
Controle x T6	399 (288 a 701)	< 0,0001
Controle x T12	391,7 (228 a 650)	<0,0001
Controle x T24	272,8 (166 a 575)	0,0003
Controle x T72	216 (95,9 a 548,2)	0,002
Controle x TE	279 (73 a 544)	0,0053

TE = Tempo estável;

ANEXO D - Comparação de dosagens de glicemia durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

		Intervalo de confiança 95%		
	diferença	mínimo	máximo	p
T0 x T2	171,4	86,7	256,2	<0,0001
T0 x T4	255,9	174,1	337,7	<0,0001
T0 x T6	263,1	181,3	344,9	<0,0001
T0 x T12	260,2	176,5	343,8	<0,0001
T0 x T24	209,6	124,9	294,3	<0,0001
T0 x T72	166,9	78,3	255,5	<0,0001
T0 x TE	267,6	175,8	359,5	<0,0001
T2 x T4	84,4	0,6	168,3	<0,05
T2 x T6	91,7	7,8	175,5	<0,05
T2 x T12	88,7	3	174,4	<0,05
T2 x TE	96,2	2,5	189,9	<0,05
T4 x T72	-89	-176,7	-1,3	<0,05
T6 x T72	-96,2	-183,9	-8,5	<0,05
T12 x T72	-93,3	-182,8	-3,8	<0,05
T72 x TE	100,7	3,5	197,9	<0,05

TE = Tempo estável;

ANEXO E - Comparação das dosagens de glicemia entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T0	-363,3 ± 22,3	<0,0001
Controle x T2	-191,8 ± 19,5	<0,0001
Controle x T4	-107,4 ± 15,9	<0,0001
Controle x T6	-100,2 ± 18,1	<0,0001
Controle x T12	-103,1 ± 10,8	<0,0001
Controle x T24	-153,7 ± 26,8	<0,0001
Controle x T72	-196,4 ± 22,6	<0,0001
Controle x TE	-95,7 ± 16,7	<0,0001

TE = Tempo estável

ANEXO F - Comparação de dosagens de insulina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
T0 x TE	-68,1	<0,0001
T2 x TE	-55,2	<0,01
T4 x TE	-64,2	<0,001
T6 x TE	-65,9	<0,001
T12 x TE	-62,3	<0,01

TE = Tempo estável

ANEXO G - Comparação das dosagens de insulina entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T24	-7,6 ± 2,5	<0,01
Controle x T72	-8,2 ± 2,7	<0,01
Controle x TE	-29,9 (-44,3 a -22,3)	<0,0001

TE = Tempo estável

ANEXO H - Comparação de dosagens de glucagon durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
T0 x T4	57,0	<0,01
T0 x T6	56,3	<0,01
T0 x T12	66,4	<0,0001
T0 x T24	51,9	<0,01

ANEXO I - Comparação das dosagens de glucagon entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T0	-39 (-72 a -17)	0,001
Controle x T4	15,4 ± 7,3	0,041
Controle x T12	21,3 ± 6,7	0,003
Controle x TE	9,6 ± 4,4	0,036

TE = Tempo estável

ANEXO J - Comparação de dosagens de GH durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
T2 x T24	45,4	<0,05
T2 x TE	57,8	<0,01
T4 x TE	51,2	<0,05

TE = Tempo estável

ANEXO K – Comparação das dosagens de GH entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T0	-2,8 (-4,2 a -1,1)	0,0012
Controle x T2	-6,5 (-7,7 a -2,0)	0,0004
Controle x T4	-4 (-6,2 a -1,4)	0,0002
Controle x T6	-3,6 (-4,0 a -0,9)	0,0016
Controle x T12	-1,8 (-3,1 a -0,1)	0,0348
Controle x T72	-2,4 (-2,8 a -0,7)	0,0046

ANEXO L - Comparação de dosagens de cortisol durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
T0 x T12	46,4	p<0,05
T0 x T24	46,9	p<0,05
T0 x T72	45,2	p<0,05
T0 x TE	59,5	p<0,01

TE = Tempo estável

ANEXO M – Comparação das dosagens de cortisol entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T0	-33,8 ± 6,0	<0,0001
Controle x T2	-19,6 ± 4,7	0,0002
Controle x T4	-10,2 (-23,3 a -3,3)	0,007
Controle x T6	-8,5 ± 2,9	0,005
Controle x T12	-6,1 ± 2,7	0,028
Controle x T72	-4,5 (-6,9 a -0,3)	0,029

ANEXO N – Comparação de dosagens de norepinefrina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

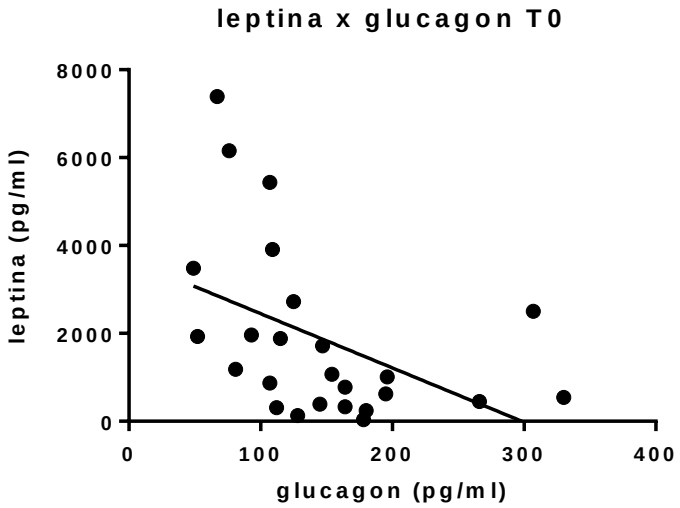
	Diferença	p
T0 x T24	45,7	p<0,05
T0 x T72	56,9	p<0,01
T2 x T24	60,7	p<0,01
T2 x T72	71,9	p<0,001
T2 x TE	60,6	p<0,05
T4 x T72	53,4	p<0,05

TE= Tempo estável

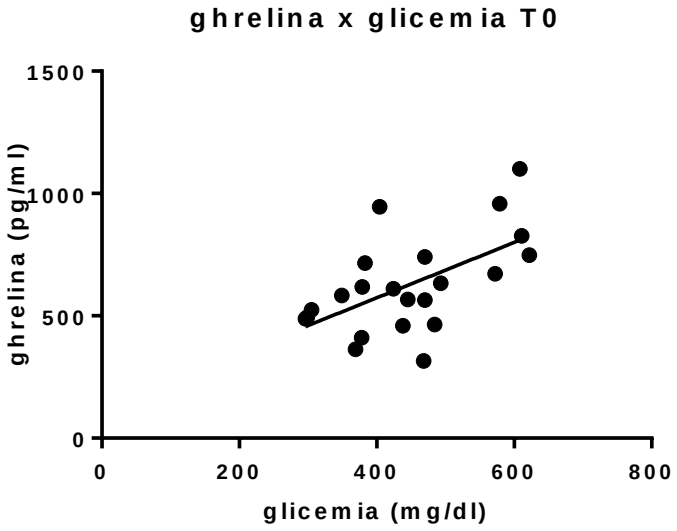
ANEXO O – Comparação das dosagens de norepinefrina entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T0	-99 (-325 a -2)	0,040
Controle x T2	-187,5 (-307 a -119)	<0,0001
Controle x T4	-211,3 ± 78,5	0,010
Controle x T24	101 (2 a 122)	0,039
Controle x T72	92 (33 a 156)	0,0015

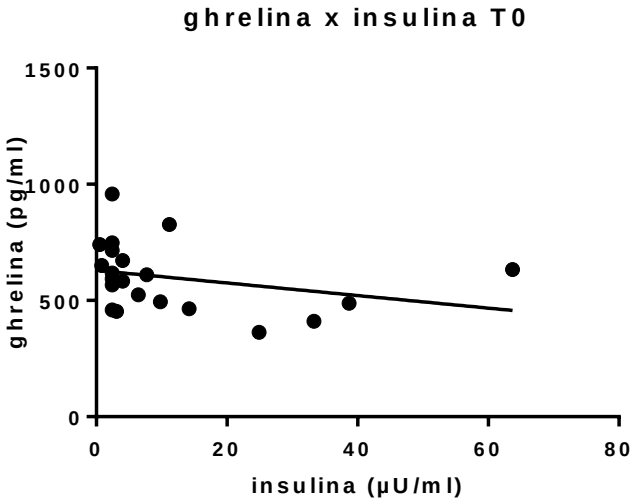
ANEXO P – Correlação entre dosagens de leptina e glucagon ao diagnóstico (T0) da CAD.



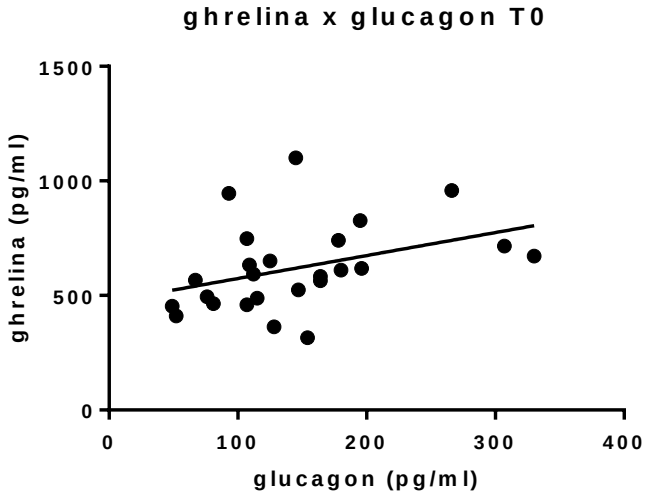
ANEXO Q – Correlação entre dosagens de ghrelina e glicemia ao diagnóstico (T0) da CAD.



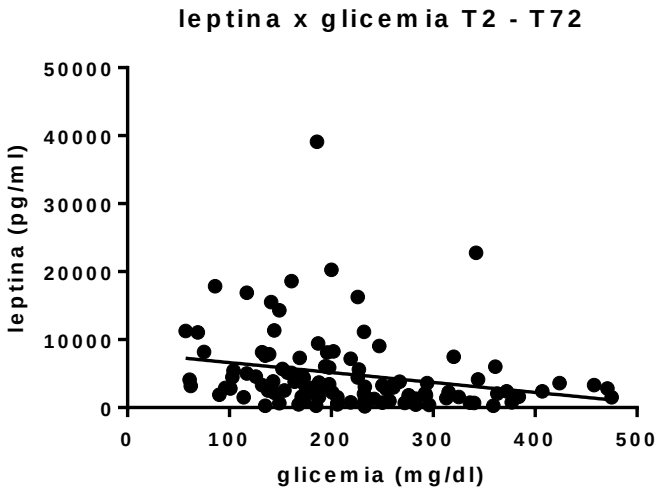
ANEXO R – Correlação entre dosagens de ghrelina e insulina ao diagnóstico (T0) da CAD.



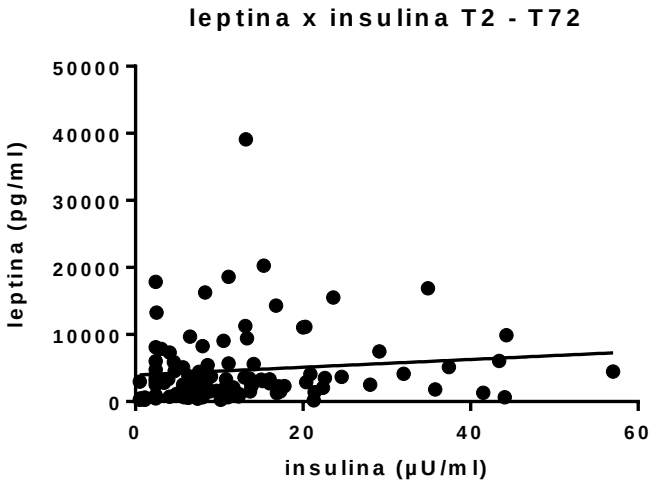
ANEXO S – Correlação entre dosagens de ghrelina e glucagon ao diagnóstico (T0) da CAD.



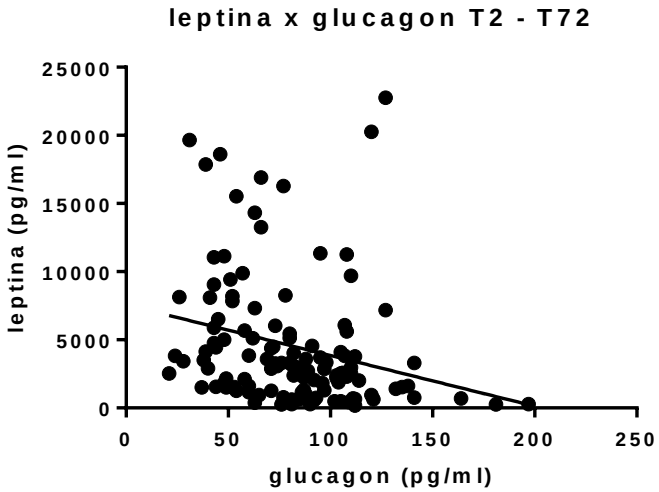
ANEXO T – Correlação entre dosagens de leptina e glicemia durante o tratamento (T2 a T72) da CAD.



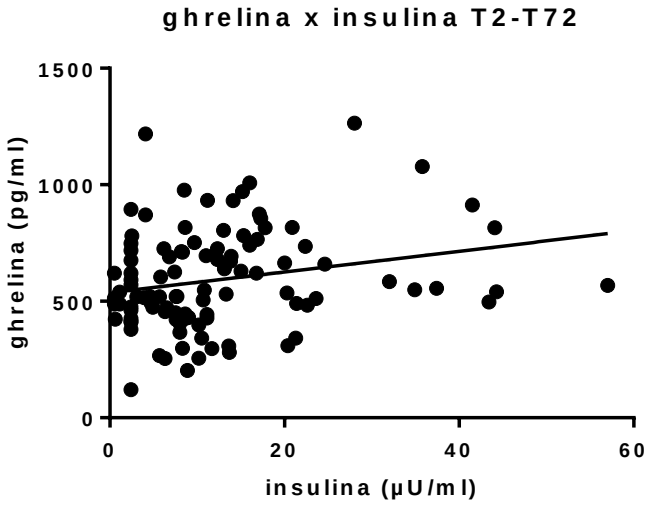
ANEXO U – Correlação entre dosagens de leptina e insulina durante o tratamento (T2 a T72) da CAD.



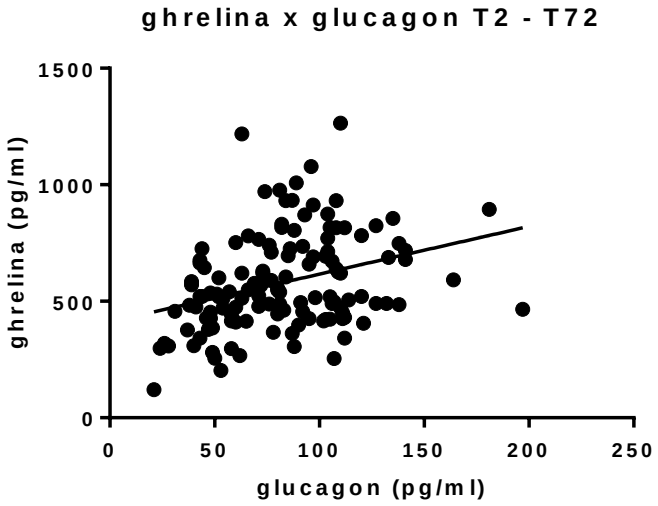
ANEXO V – Correlação entre dosagens de leptina e glucagon durante o tratamento (T2 a T72) da CAD.



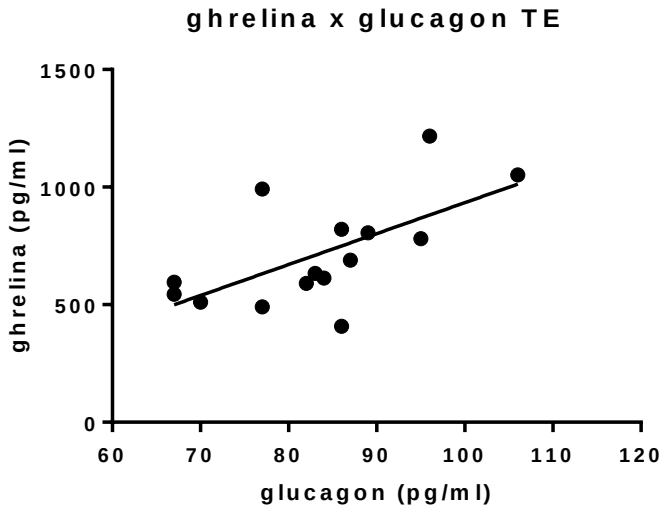
ANEXO W – Correlação entre dosagens de ghrelina e insulina durante o tratamento (T2 a T72) da CAD.



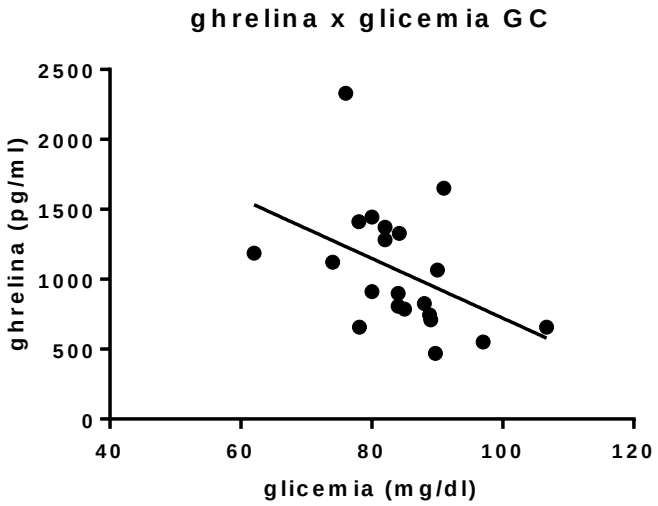
ANEXO X – Correlação entre dosagens de ghrelina e glucagon durante o tratamento (T2 a T72) da CAD.



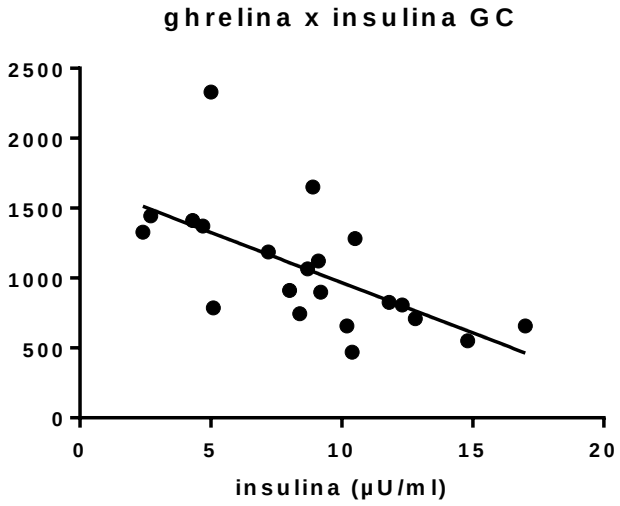
ANEXO Y – Correlação entre dosagens de ghrelina e glucagon após resolução da CAD (TE).



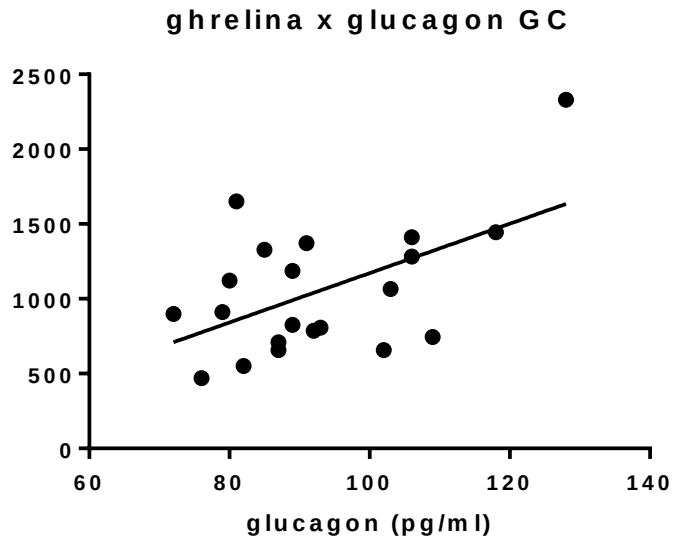
ANEXO Z – Correlação entre dosagens de ghrelina e glicemia em indivíduos saudáveis (grupo controle)



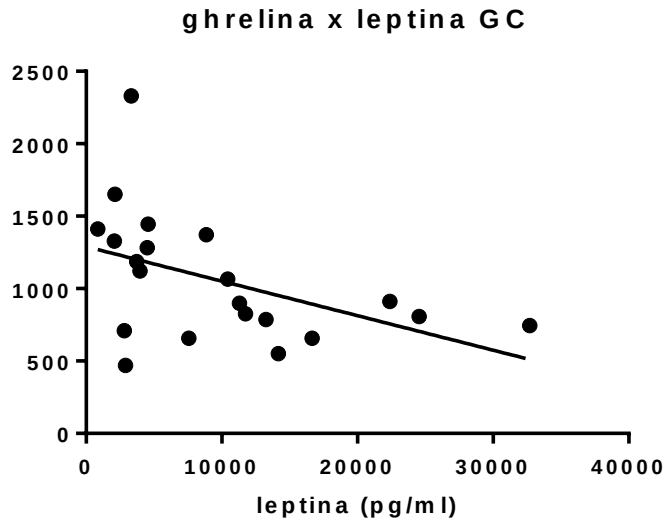
ANEXO AA – Correlação entre dosagens de ghrelina e insulina em indivíduos saudáveis (grupo controle)



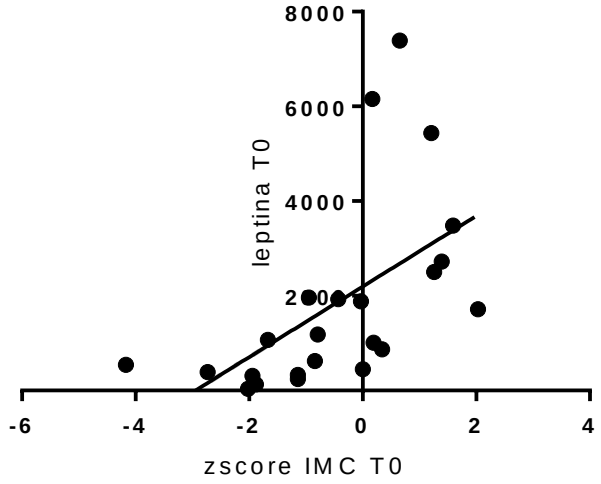
ANEXO AB – Correlação entre dosagens de ghrelina e glucagon em indivíduos saudáveis (grupo controle)



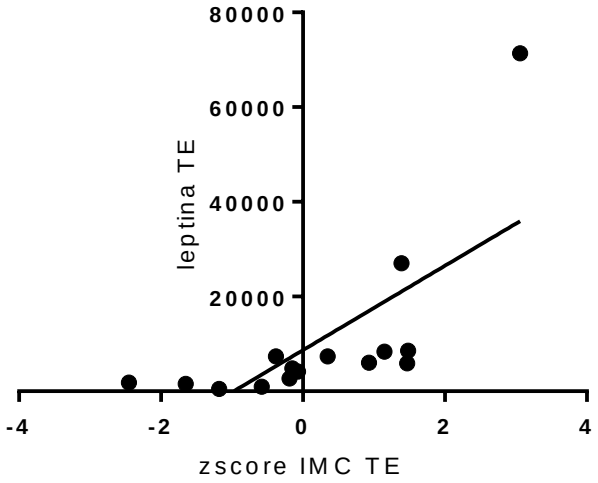
ANEXO AC – Correlação entre dosagens de ghrelina e leptina em indivíduos saudáveis (grupo controle)



ANEXO AD – Correlação entre dosagens de leptina e z score de IMC ao diagnóstico da CAD (T0).



ANEXO AE – Correlação entre dosagens de leptina e z score de IMC após resolução da CAD (TE).



ANEXO AF – Evolução das dosagens de Glicemia/insulina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Média	DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição Normal?
T0	145,5	214,9	71,2	26,6	183,2	Não
T2	56,9	59,9	33,7	14,1	89,5	Sim
T4	84,6	116,1	24,2	14,5	113,7	Não
T6	92,5	189,6	18,4	12,1	44,8	Não
T12	33,6	21,2	28,9	15,9	42,5	Sim
T24	26,9	24,4	17,9	7,1	41	Sim
T72	25,9	36,3	14,3	6,2	26,1	Não
TE	7,3	10,8	3,8	1,4	7,1	Não
Controle	12,3	7,7	10	7,6	15,9	Não

DP = desvio padrão; TE = Tempo estável

ANEXO AG – Comparação da relação glicemia/insulina durante tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
T0 x T72	40,5	p<0,05
T0 x TE	68,7	p<0,0001
T2 x TE	53,6	p<0,01
T4 x TE	52,4	p<0,01
T6 x TE	42,3	p<0,05
T12 x TE	50,2	p<0,01

TE= Tempo estável

ANEXO AH – Comparação da relação glicemia/insulina entre grupo controle e pacientes durante o tratamento de episódios de cetoacidose diabética

	Diferença	p
Controle x T0	-61,2 (-150,3 a -24,1)	<0,0001
Controle x T2	-23,7 (-40,1 a -6,3)	0,0003
Controle x T4	-14,2 (-78,7 a -5,9)	0,0014
Controle x T6	-8,4 (-13,8 a -2,4)	0,0026
Controle x T12	-18,5 (-27,1 a – 6,8)	<0,0001
Controle x TE	6,1 (2,7 a 8,8)	0,0007

TE = Tempo estável

9 REFERÊNCIAS

1. Wolfsdorf J, Craig ME, Daneman D, et al. Diabetic ketoacidosis in children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2009;10 Suppl 1:118-133. doi:10.1111/j.1399-5448.2009.00569.x.

2. Bismuth E, Laffel L. Can we prevent diabetic ketoacidosis in children? *Pediatr Diabetes*. 2007;8(Suppl. 6):24-33.

3. Rewers A, Klingensmith G, Davis C, et al. Presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes mellitus in youth: the Search for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*. 2008;121(5):e1258-e1266. doi:10.1542/peds.2007-1105.

4. Klingensmith GJ, Tamborlane W V, Wood J, et al. Diabetic ketoacidosis at diabetes onset: still an all too common threat in youth. *J Pediatr*. 2013;162(2):330-334.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2012.06.058.

5. Castro L, Morcillo AM, Guerra-Junior G. Cetoacidose diabética em crianças: perfil de tratamento em hospital universitário. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(6):548-553.

6. Negrato C a, Cobas R a, Gomes MB. Temporal changes in the diagnosis of type 1 diabetes by diabetic ketoacidosis in Brazil: a nationwide survey. *Diabet Med*. 2012;29(9):1142-1147. doi:10.1111/j.1464-5491.2012.03590.x.

7. Elding Larsson H, Vehik K, Bell R, et al. Reduced prevalence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes in young children participating in longitudinal follow-up. *Diabetes Care*. 2011;34(11):2347-2352. doi:10.2337/dc11-1026.

8. Wolfsdorf J. Diabetic Ketoacidosis in Infants, Children, and Adolescents: A consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2006;29(5):1150-1159. doi:10.2337/dc06-9909.

9. Dunger DB. ESPE/LWPES consensus statement on diabetic ketoacidosis

in children and adolescents. *Arch Dis Child*. 2004;89(2):188-194. doi:10.1136/adc.2003.044875.

10. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a New Mutation in the House Mouse. *J Hered*. 1950;41(12):317-318. doi:10.1002/j.1550-8528.1996.tb00519.x.

11. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes , a New Mutafton in the Mouse. *Science (80-)*. 1966;153(3740):1127-1128.

12. Coleman DL. Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 1978;14(3):141-148. doi:10.1007/BF00429772.

13. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-432. doi:10.1038/372425a0.

14. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and Expression of a Leptin Receptor , OB-R. *Cell*. 1995;83:1263-1271.

15. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004;50(9):1511-1525. doi:10.1373/clinchem.2004.032482.

16. Rosenbaum M, Leibel RL. 20 Years of Leptin: Role of Leptin in Energy Homeostasis in Humans. *J Endocrinol*. 2014;223(1):T83-T96. doi:10.1530/JOE-14-0358.

17. Kolaczynski JW, Considine R V, Ohannesian J, et al. Responses of Leptin to Short-Term Fasting and Refeeding in Humans: A Link With Ketogenesis but Not Ketones Themselves. *Diabetes*. 1996;45(11):1511-1515. doi:10.2337/diab.45.11.1511.

18. Myers MG. Outstanding Scientific Achievement Award Lecture 2010: deconstructing leptin: from signals to circuits. *Diabetes*. 2010;59(11):2708-2714. doi:10.2337/db10-1118.

19. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Murphy E, Chu F, Leibel RL. Effects of weight change on plasma leptin concentrations and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3647-3654. doi:10.1210/jcem.82.11.4390.

20. Rosenbaum M, Sy M, Pavlovich K, Leibel RL, Hirsch J. Leptin reverses weight loss-induced changes in regional neural activity responses to visual food stimuli. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2583-2591. doi:10.1172/JC135055.

21. Farooqi IS, O'Rahilly S. 20 Years of Leptin: Human Disorders of Leptin Action. *J Endocrinol*. 2014;223(1):T63-T70. doi:10.1530/JOE-14-0480.

22. Denroche HC, Huynh FK, Kieffer TJ. The role of leptin in glucose homeostasis. *J Diabetes Investig*. 2012;3(2):115-129. doi:10.1111/j.2040-1124.2012.00203.x.

23. Gray SL, Donald C, Jetha A, Covey SD, Kieffer TJ. Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic beta-cell leptin signaling. *Endocrinology*. 2010;151(9):4178-4186. doi:10.1210/en.2010-0102.

24. Marroquí L, Vieira E, Gonzalez a., Nadal a., Quesada I. Leptin downregulates expression of the gene encoding glucagon in alphaTC1-9 cells and mouse islets. *Diabetologia*. 2011;54(4):843-851. doi:10.1007/s00125-010-2024-1.

25. Tudurí E, Marroquí L, Soriano S, et al. Inhibitory effects of leptin on pancreatic alpha-cell function. *Diabetes*. 2009;58(7):1616-1624. doi:10.2337/db08-1787.

26. Yu X, Park B-H, Wang M-Y, Wang Z V, Unger RH. Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):14070-14075. doi:10.1073/pnas.0806993105.

27. German JP, Wisse BE, Thaler JP, et al. Leptin deficiency causes insulin resistance induced by uncontrolled diabetes. *Diabetes*. 2010;59(7):1626-1634. doi:10.2337/db09-1918.

28. Denroche HC, Levi J, Wideman RD, et al. Leptin therapy reverses

hyperglycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes, independent of hepatic leptin signaling. *Diabetes*. 2011;60(5):1414-1423. doi:10.2337/db10-0958.

29. Perry RJ, Zhang X-M, Zhang D, et al. Leptin reverses diabetes by suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Nat Med*. 2014;(June):1-7. doi:10.1038/nm.3579.

30. Wang M, Chen L, Clark GO, et al. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):4813-4819. doi:10.1073/pnas.0909422107.

31. Morales A, Wasserfall C, Brusko T, et al. Adiponectin and leptin concentrations may aid in discriminating disease forms in children and adolescents with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(8):2010-2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15277432.

32. Verrotti a, Basciani F, Morgese G, Chiarelli F. Leptin levels in non-obese and obese children and young adults with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 1998;139(1):49-53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9703378.

33. Huml M, Kobr J, Siala K, et al. Gut peptide hormones and pediatric type 1 diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2011;60(4):647-658. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21574763.

34. Soliman AT, Omar M, Assem HM, et al. Serum leptin concentrations in children with type 1 diabetes mellitus: Relationship to body mass index, insulin dose, and glycemic control. *Metabolism*. 2002;51(3):292-296. doi:10.1053/meta.2002.30502.

35. Nakamura T, Nagasaka S, Ishikawa S, et al. Serum levels of leptin and changes during the course of recovery from diabetic ketoacidosis. *Diabetes Res Clin Pract*. 1999;46(1):57-63. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580617.

36. McCormick KL, Mick GJ, Butterfield L, Ross H, Parton E, Totka J. Leptin in children with newly diagnosed type 1 diabetes: effect of insulin therapy. *Int*

J Exp Diabetes Res. 2001;2(2):121-127. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2478536&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

37. Flück CE, Kuhlmann B V, Mullis PE. Insulin increases serum leptin concentrations in children and adolescents with newly diagnosed Type I diabetes mellitus with and without ketoacidosis. *Diabetologia*. 1999;42:1067-1070.

38. Hanaki K, Becker DJ, Arslanian SA. Leptin before and after insulin therapy in children with new-onset type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(5):1524-1526. doi:10.1210/jcem.84.5.5653.

39. Hathout EH, Sharkey J, Racine M, Ahn D, Mace JW, Saad MF. Changes in plasma leptin during the treatment of diabetic ketoacidosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(12):4545-4548. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599716.

40. Kitabchi a. E. Changes in Serum Leptin in Lean and Obese Subjects with Acute Hyperglycemic Crises. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(>6):2593-2596. doi:10.1210/jc.2002-021975.

41. 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. doi:10.1038/45230.

42. Delhanty PJD, van der Lely a J. Ghrelin and glucose homeostasis. *Peptides*. 2011;32(11):2309-2318. doi:10.1016/j.peptides.2011.03.001.

43. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin Enhances Appetite and Increases Food Intake in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5992-5995.

44. Heppner KM, Tong J. Mechanisms in endocrinology: regulation of glucose metabolism by the ghrelin system: multiple players and multiple actions. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(1):21-32. doi:10.1530/EJE-14-0183.

45. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, et al. Ghrelin. *Mol Metab*. 2015;4(March):437-460. doi:10.1016/j.molmet.2015.03.005.

46. Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, et al. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca2+ signaling in b-cells: Implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes*. 2004;53(12):3142-3151. doi:10.2337/diabetes.53.12.3142.

47. Wierup N, Yang S, McEvilly RJ, Mulder H, Sundler F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(3):301-310. doi:10.1177/002215540405200301.

48. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, et al. Ghrelin is present in pancreatic α-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51(1):124-129. doi:10.2337/diabetes.51.1.124.

49. Park S, Jiang H, Zhang H, Smith RG. Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(46):19003-19008. doi:10.1073/pnas.1209590109.

50. Chuang J-C, Sakata I, Kohno D, et al. Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol Endocrinol*. 2011;25(9):1600-1611. doi:10.1210/me.2011-1001.

51. Gagnon J, Anini Y. Glucagon stimulates ghrelin secretion through the activation of MAPK and EPAC and potentiates the effect of norepinephrine. *Endocrinology*. 2013;154(2):666-674. doi:10.1210/en.2012-1994.

52. Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab*. 2006;3(5):379-386. doi:10.1016/j.cmet.2006.04.004.

53. Reimer MK, Pacini G, Ahrén B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2003;144(3):916-921. doi:10.1210/en.2002-220819.

54. Esler WP, Rudolph J, Claus TH, et al. Small-molecule Ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology*. 2007;148(11):5175-5185.

doi:10.1210/en.2007-0239.

55. Barnett BP, Hwang Y, Taylor MS, et al. Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science*. 2010;330(6011):1689-1692. doi:10.1126/science.1196154.

56. Broglio F, Arvat E, Benso A, et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):5083-5086.

57. Tong J, Prigeon RL, Davis HW, et al. Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes*. 2010;59(9):2145-2151. doi:10.2337/db10-0504.

58. 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. doi:10.2337/diabetes.52.1.16.

59. Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, et al. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(2):E313-E316. doi:10.1152/ajpendo.00569.2001.

60. Blatnik M, Soderstrom CI, Dysinger M, Fraser SA. Prandial ghrelin attenuation provides evidence that des-acyl ghrelin may be an artifact of sample handling in human plasma. *Bioanalysis*. 2012;4(20):2447-2455. doi:10.4155/bio.12.248.

61. Dong J, Peeters TL, De Smet B, et al. Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology*. 2006;147(6):2634-2642. doi:10.1210/en.2005-1335.

62. Holdstock C, Ludvigsson J, Karlsson F a. Abnormal ghrelin secretion in new onset childhood Type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2004;47(1):150-151. doi:10.1007/s00125-003-1258-6.

63. Ashraf A, Mick G, Meleth S, Wang X, McCormick K. Insulin Treatment reduces pre-prandial plasma ghrelin concentrations in children with type 1 diabetes. *Med Sci Monit*. 2007;13(12):533-538.

64. Soriano-Guillén L, Barrios V, Lechuga-Sancho A, Chowen J a, Argente J. Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Res*. 2004;55(5):830-835. doi:10.1203/01.PDR.0000120679.92416.70.

65. Della Manna T, Steinmetz L, Campos PR, et al. Subcutaneous Use of a Fast-Acting Insulin Analog: An alternative treatment for pediatric patients with diabetic ketoacidosis. *Diabetes Care*. 2005;28(8):1856-1861. doi:10.2337/diacare.28.8.1856.

66. Shann F, Pearson G, Slater a., Wilkinson K. Paediatric index of mortality (PIM): A mortality prediction model for children in intensive care. *Intensive Care Med*. 1997;23(2):201-207. doi:10.1007/s001340050317.

67. Barth E, Albuszies G, Baumgart K, et al. Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med*. 2007;35(9 Suppl):S508-S518. doi:10.1097/01.CCM.0000278047.06965.20.

68. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta 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. doi:10.1210/jcem.87.1.8129.

69. Engelstoft MS, Park W-M, Sakata I, et al. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Mol Metab*. 2013;2(4):376-392. doi:10.1016/j.molmet.2013.08.006.

70. Broglio F, Gottero C, Benso a, et al. Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9):4268-4272. doi:10.1210/jc.2002-021940.

71. Martos-Moreno G a, Barrios V, Soriano-Guillén L, Argente J. Relationship between adiponectin levels, acylated ghrelin levels, and short-term body mass index changes in children with diabetes mellitus type 1 at diagnosis and after insulin therapy. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(5):757-761. doi:10.1530/eje.1.02273.

72. Chou K, Perry CM. Metreleptin: first global approval. *Drugs*.

2013;73(9):989-997. doi:10.1007/s40265-013-0074-7.

73. Gagnon J, Baggio LL, Drucker DJ, Brubaker PL. Ghrelin is a Novel Regulator of Glucagon-like Peptide-1 Secretion. *Diabetes*. November 2014. doi:10.2337/db14-1176.

74. Ahrén B. Hepato-Incretin Function of GLP-1: Novel Concept and Target in Type 1 Diabetes: Figure 1. *Diabetes*. 2015;64(3):715-717. doi:10.2337/db14-1671.

75. Jun LS, Millican RL, Hawkins ED, et al. Absence of Glucagon and Insulin Action Reveals a Role for the GLP-1 Receptor in Endogenous Glucose Production. *Diabetes*. 2015;64(3):819-827. doi:10.2337/db14-1052.

76. Zibar K, Cuca JK, Blaslov K, Bulum T, Smircic-Duvnjak L. Difference in glucagon-like peptide-1 concentrations between C-peptide negative type 1 diabetes mellitus patients and healthy controls. *Ann Clin Biochem*. 2015;52(Pt 2):220-225. doi:10.1177/0004563214544709.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de consentimento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : **M( ) F( )**

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO .....Nº..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc. .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: **M( ) F( )**

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO:.....CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE **PESQUISA:**

CETOACIDOSE DIABÉTICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES:

PAPEL DO GLUCAGON, GHRELINA E LEPTINA NA FISIOPATOLOGIA DA CAD

PESQUISADOR Responsável: Prof. Dr. Durval Damiani

CARGO/FUNÇÃO: Chefe da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança do HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto da Criança.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ~

RISCO BAIXO ~ RISCO MAIOR ~

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA prospectiva – duração - 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa : Esse estudo como objetivo verificar a participação de hormônios existentes no organismo, que atuam na regulação da glicemia e do gasto energético (glucagon, leptina e ghrelina), no desenvolvimento da cetoacidose diabética. O tratamento com soro endovenoso será realizado como já é feito no Pronto Socorro há muitos anos e o tratamento com insulina será feito com a LISPRO subcutânea (também já utilizada no serviço para o tratamento da CAD). Durante o tratamento, serão coletadas amostras de sangue para avaliar a melhora do quadro e para a dosagem dos hormônios (nos momentos em que já ocorreriam as coletas normalmente)

2. Os procedimentos que serão utilizados serão: exames de sangue (glicemia e cetonemia de ponta de dedo, glicemia, Na^+, K^+, Cl^-, P, Ca^{++} iônico, Mg^{++}, gasometria, U, Cr, e dosagens hormonais: ghrelina, leptina, glucagon, insulina, peptídeo C, hGH, cortisol, adrenalina); e de urina: cetonúria por fita urinária.

3. desconfortos e riscos esperados

4. benefícios que poderão ser obtidos: A maior compreensão do papel de alguns hormônios durante a descompensação diabética, possibilitando no futuro o estudo de novas intervenções terapêuticas.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

_____

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

_____

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, ... de ..... de 2.....

_____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome Legível)

Apêndice B – Aprovação do Projeto na CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/08/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0144/08**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO GLUCAGON, LEPTINA E GHRELINA NA FISIOPATOLOGIA DA CETOACIDOSE DIABÉTICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES.**" apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Durval Damiani**
Pesquisador (a) Executante: **Roberta Diaz Savoldelli**

CAPPesq, 07 de Agosto de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br