

Maria Luiza dos Santos

**Variação Circadiana da Glicose,
Insulina Específica e Pró-Insulina
Intacta Plasmáticas em Indivíduos
com Tolerância à Glicose Diminuída**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP para Defesa de Doutorado.
Área de concentração: Metabolismo e Nutrição.

Botucatu – SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Maria Luiza dos Santos

**Variação Circadiana da Glicose,
Insulina Específica e Pró-Insulina
Intacta Plasmáticas em Indivíduos
com Tolerância à Glicose Diminuída**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP para Defesa de Doutorado. Área de concentração: Metabolismo e Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Walkyria de Paula Pimenta

Botucatu – SP

2005

ORIENTADOR

Profa. Dra. Walkyria de Paula Pimenta

Dedicatória

A minha mãe e minha filha

Alzira e Camilla

“Ninguém tem amor maior do que aquele que dá a vida
por seus amigos”

João 15:13

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Walkyria de Paula Pimenta, o reconhecimento e gratidão pela orientação decisiva, segura e constante, em todas as etapas deste trabalho.

À bióloga Maria Salete Sartori, pelo apoio nas horas que mais precisei...

Agradecimentos

Aos voluntários que se dispuseram prontamente em participar deste estudo.

Aos Profs. Dr. Roberto Carlos Padovani, e Prof. Dr. Flávio Ferrari Aragon, pela orientação e realização das análises estatísticas do estudo.

A todos os Funcionários da Seção de Laboratório Clínico, pelo auxílio durante o estudo.

A Enfermeira Flávia A. de Toledo Silva da Clínica Médica II, pelo auxílio durante o estudo.

A todos os Funcionários da Enfermaria de Clínica Médica II, pelo auxílio durante o estudo.

A todos os Residentes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, pelo auxílio durante o estudo.

A Profa. Dra. Lucy Marie Ribeiro Muniz da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, pelo auxílio

Ao Serviço de Nutrição e Dietética - UNESP, nas pessoas de Ângela Valéria Pelison Barbin, Célia Regina Moraes Lopes e Soraya Pereira Zanatta Nicolosi, pelo auxílio na composição das dietas dos pacientes.

Às bibliotecárias Rosemary Cristina da Silva e Luciana Pizzani e Selma Maria de Jesus, as quais me orientaram na organização das referências bibliográficas.

À nutricionista Mônica Morelli, pelo apoio e auxílio do levantamento nutricional dos participantes deste estudo.

A todos os Funcionários do Departamento de Clínica Médica, pelo auxílio prestado.

Sumário

Introdução	1
Objetivo	18
Indivíduos e Métodos	20
Resultados	26
Discussão	45
Conclusões	55
Resumo	57
Abstract	61
Referências Bibliográficas	65
Anexos	80

Legenda das Tabelas

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos participantes dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e com tolerância à glicose diminuída (TGD)

31

Tabela 2. Razões entre a área sob a curva (ASC) da insulina específica (pmol/L) e da glicose (mmol/L) plasmáticas e da pró-insulina intacta e da glicose (mmol/L) plasmáticas e da pró-insulina intacta (pmol/L) e da insulina específica (pmol/L) plasmáticas dos três períodos pós-prandiais: café, almoço e jantar, segundo os grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)

32

Legenda das Figuras

Figura 1. Glicose plasmática (mg/dL) durante 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	33
Figura 2. Área incremental sob a curva da glicose ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}\cdot\text{h}$), insulina específica ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$) e pró-insulina intacta ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$) plasmáticas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	34
Figura 3. Insulina específica plasmática (pmol/L) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	35
Figura 4. Pró-insulina intacta plasmática (pmol/L) durante as 24-h dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	36
Figura 5. Razões entre as áreas incrementais sob a curva da glicose, insulina específica e pró-insulina intacta plasmáticas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	37
Figura 6. Área sob a curva horária da glicose* ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}\cdot\text{h}$), insulina específica* ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$) e pró-insulina intacta** ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$) plasmáticas de cada período pós-prandial: café, almoço e jantar segundo os grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	38
Figura 7. Valores dos ácidos graxos livres (AGLs) séricos durante as 24 horas dos indivíduos dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	39
Figura 8. Área total sob a curva de ácidos graxos livres (AGLs) séricos ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$), cortisol ($\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}\cdot\text{h}$) e hormônio de crescimento (GH) ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$) plasmáticos durante o período de 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	40
Figura 9. Cortisol plasmático ($\mu\text{g/dL}$) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	41
Figura 10. Cortisol plasmático ($\mu\text{g/dL}$) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	42
Figura 11. Hormônio do crescimento (GH) plasmático (ng/mL) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	43
Figura 12. GH (ng/mL) plasmático durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD)	44

Lista de Abreviaturas

ADA – Associação Americana de Diabetes

AGLs – Ácidos Graxos Livres

ASC – Área Total sob a Curva

ASC_h – Área Horária sob a Curva

ΔASC – Área Incremental sob a Curva

DMT2 – Diabetes Mellitus Tipo 2

GH – Hormônio do Crescimento

HC-FMB – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

IMC – Índice de Massa Corporal

PA – Pressão Arterial

TGD – Tolerância à Glicose Diminuída

TGN – Tolerância à Glicose Normal

TOTG – Teste Oral de Tolerância à Glicose

VCT – Valor Calórico Total

Introdução

1. Homeostase da Glicose Plasmática

A manutenção da homeostase glicêmica é um processo biológico fundamental, uma vez que, tanto a hipoglicemia é danosa para o sistema nervoso central, como a hiperglicemia o é para os vasos, como bem expresso pelas complicações crônicas do diabetes mellitus. As concentrações plasmáticas da glicose em indivíduos saudáveis flutuam diariamente entre limites estreitos (1). De acordo com o consenso recente da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2001) (2), são considerados normais os valores glicêmicos de 70 a 100 mg/dL para os períodos de jejum (6-12 horas sem ingestão alimentar) e de 120 a 160 mg/dL para os períodos pós-prandiais (1-4 horas após uma refeição).

No indivíduo saudável, a homeostase da glicose plasmática resulta de um balanço controlado com precisão entre sua entrada na e saída da circulação. Nos períodos de jejum, os níveis circulantes de insulina diminuem e os de glucagon elevam-se permitindo a produção endógena (hepática) de glicose, via glicogenólise principalmente, que é utilizada predominantemente pelo sistema nervoso central. Também nestes períodos há ativação da lipólise sendo os ácidos graxos livres (AGLs) liberados utilizados pela maioria dos outros tecidos, principalmente pelos músculos (1). Pelo contrário, após uma refeição, a glicose é absorvida do tubo digestório para a circulação, há estimulação da secreção de insulina, que promove a captação e/ou utilização da glicose pelos tecidos periféricos e hepático, além da síntese de triglicérides e de proteínas a partir dos AGLs e dos amino-ácidos absorvidos, respectivamente (1). Assim, a insulina exerce um papel primordial neste processo por meio da relação balanceada entre sua secreção pelas células β -pancreáticas e sua ação nos tecidos: hepático, muscular e adiposo. Matematicamente, esta inter-relação aproxima-se de uma função hiperbólica, com o produto entre a função β -celular pela sensibilidade à insulina sendo uma constante, denominada índice de disposição. Este índice pode ser interpretado como uma medida da habilidade das células β em compensar a resistência à insulina (3).

Como todo hormônio, a secreção insulínica pelas células β pancreáticas é um processo oscilatório complexo, que envolve pulsos rápidos que ocorrem a cada 10 a 15 minutos e se sobrepõem a oscilações mais lentas observadas a cada 90 a 100 minutos (4-7). Este processo determina maior eficácia das ações insulínicas (8,9) e as oscilações glicêmicas diárias (9-11). A pulsatibilidade secretória da insulina seria determinada por marca-passo intrínseco às células β e controlado pelo sistema nervoso central, nervo vago e possíveis mediadores e por mecanismo de retro-alimentação entre o fígado ou os tecidos periféricos e as células β via as concentrações glicêmicas, como sugerido por estudos em cães (11) e no homem (12,13).

2. Ritmo Circadiano da Glicose Plasmática

Muitos processos biológicos, incluindo os ciclos diários do sono/vigília, temperatura corporal, pressão arterial e liberação de hormônios seguem ritmos circadianos (7). Vários trabalhos demonstraram uma forte relação entre o ciclo luz/escuro e vários dos ritmos circadianos biológicos. Nervos especiais que monossinápticamente

conectam a retina com os núcleos supraquiasmáticos no hipotálamo foram identificados, havendo fortes evidências de que estes núcleos são os principais marca-passos da ritmicidade circadiana e que sua ligação com a retina medeia a sincronização com o ciclo luz/escuro (7).

Os efeitos do sono (por exemplo, na secreção do hormônio do crescimento - GH) e do ritmo circadiano (por exemplo, na secreção do cortisol) na modulação da função endócrina têm sido mais investigados para as secreções hormonais que são diretamente dependentes do eixo hipotálamo-hipófise. Por outro lado, está bem estabelecido que as características da regulação fisiológica da glicemia e há evidências de que a secreção insulina variam durante o ciclo de 24 horas (14).

Inicialmente os resultados eram controversos quanto à secreção de a insulina apresentar um ritmo circadiano, alguns evidenciando-o (15,16) e outros, não (5,17,18), sendo elemento complicador o fato de a secreção de insulina ter como principal estimulante a concentração sanguínea de glicose, a qual obedece um ritmo de 24 horas. Posteriormente, em estudo mais completo e preciso, Boden et al. (7) observaram que a taxa de secreção de insulina (determinada por parâmetros de cinética do peptídeo C) obedecia a um ritmo circadiano. Em 21 indivíduos jovens e saudáveis mantidos durante três dias em condições estáveis de euglicemia e hiperglicemia, a taxa de secreção de insulina começava a se elevar nas primeiras horas da manhã, atingindo pico à tarde, para diminuir à noite. Assim, ao mesmo estímulo glicêmico havia maior secreção de insulina durante o dia que à noite. Por meio da dosagem da melatonina circulante foi sugestiva a relação entre a taxa de secreção de insulina e o ciclo luz/escuro.

A variação circadiana da glicose plasmática envolve durante o dia, a variação da tolerância à glicose e durante a noite, o fenômeno do alvorecer. La Fleur et al. (19) observaram que em ratos o núcleo supraquiasmático do hipotálamo, ou o relógio biológico, era responsável pelo ritmo circadiano da glicemia e sugeriram que o mesmo ocorresse no homem.

2a) Indivíduos Jovens e Saudáveis

Vários estudos bem controlados em indivíduos normais submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG) (20-25), a refeições iguais (26-29), à nutrição enteral contínua (30,31) e à infusão contínua de glicose (15,18,32) demonstraram diminuição da tolerância à glicose no final da tarde e na primeira metade da noite em relação ao período da manhã e do início da tarde.

Um grande número de estudos mediram a glicose plasmática em coletas seriadas de amostras de sangue de indivíduos durante o sono e observaram que apesar da condição de jejum prolongado, os níveis glicêmicos permaneciam estáveis ou com queda mínima (33-38). Por outro lado, estes mesmos estudos observaram que durante o período diurno, os indivíduos em jejum e em repouso mostravam queda dos níveis glicêmicos de 10 a 20 mg/dL durante as 12 horas. Indivíduos normais, após habituarem-se aos procedimentos laboratoriais, foram estudados durante o sono, que mostrou padrão normal ao registro poligráfico (18,30,31). Receberam infusão constante de glicose ou nutrição enteral contínua, que proporcionaram níveis estáveis e fisiológicos de glicose e insulina. Nestas

condições, apresentaram tolerância à glicose marcadamente diminuída durante o sono, com aumento dos valores glicêmicos de 20 a 30%, apesar de ter sido rigorosamente mantida a quantidade calórica administrada. Observou-se ainda que os níveis glicêmicos máximos ocorriam no meio do período do sono, bem antes da madrugada. E, durante a última parte da noite, e, portanto, no período do chamado fenômeno do alvorecer, a tolerância à glicose começava a melhorar com diminuição progressiva dos valores glicêmicos em direção aos de jejum.

Durante o dia, seja por estímulo oral com glicose (20-22,24) ou refeições mistas iguais (26), ou por nutrição enteral contínua (30,31), ou ainda por estímulo endovenoso contínuo com solução glicosada (18,32), os estudos observaram resposta insulínica diminuída e atrasada à tarde em relação à manhã, independente da ação β -estimulante dos hormônios entéricos.

No período noturno compreendido entre as 24h e 8h, alguns estudos observaram níveis estáveis ou pouco diminuídos de insulina plasmática acompanhando os da glicemia, não sendo verificado o fenômeno do alvorecer (18,34,36,37). Por outro lado, outros estudos encontraram pequena elevação da concentração plasmática de insulina e/ou de sua secreção no final da noite, acompanhada de igual alteração glicêmica, refletindo aumento da necessidade de insulina neste período (fenômeno do alvorecer), cujos mecanismos determinantes não estão esclarecidos (33,38).

Van Cauter *et al.* (39) determinaram o perfil glicêmico e da taxa de secreção de insulina em oito voluntários jovens e saudáveis, que receberam solução glicosada em infusão contínua por 57 horas e foram submetidos à mudança de 12 horas no ciclo sono/vigília. O período de sono era registrado poligraficamente. Os achados foram consistentes com o conceito de que ambos: a ritmicidade circadiana e o sono modulam a resposta glicêmica. Resultados semelhantes foram observados por Simon *et al.* (31) utilizando nutrição enteral contínua. Ao final da tarde e início da noite, houve diminuição da tolerância à glicose com diminuição da secreção de insulina e da sensibilidade à insulina, em relação ao período da manhã. Este ritmo circadiano da glicemia seria determinado por um marca-passo no sistema nervoso central, que por meio de hormônios como o cortisol, agiria nos órgãos periféricos. O sono determinou elevação da glicemia, da insulinemia e da taxa de secreção de insulina, sem alteração do clearance de insulina. Tais alterações foram acompanhadas de elevação dos níveis do GH nas primeiras horas do sono, que poderia determinar elevação da produção hepática de glicose.

A diminuição da tolerância à glicose no final do período diurno observada em indivíduos saudáveis poderia resultar da diminuição da utilização periférica da glicose e/ou do aumento da produção endógena de glicose. Estas alterações do metabolismo da glicose seriam determinadas, por sua vez, pela diminuição da secreção de insulina e/ou diminuição da sensibilidade à insulina e/ou aumento do clearance da insulina (14).

Verrillo *et al.* (40) estudaram 11 jovens hígidos às 8h e às 18h após igual período de jejum, iniciado a partir de uma última refeição também igual. Cada estudo envolvia infusão de glicose triciada, cateterização da veia hepática e artéria femoral e determinação dos fluxos sanguíneos hepático e do membro inferior. Em ambos os estudos a produção hepática de glicose estava suprimida. No final da tarde a captação esplâncica de glicose era pouco maior mas a do território periférico era mais de duas vezes menor. Empregando o teste endovenoso

de tolerância à glicose associado à análise pelo modelo mínimo, Lee *et al.* (41) também observaram em indivíduos saudáveis menor taxa de utilização de glicose à tarde que pela manhã.

Dos estudos que avaliaram a sensibilidade à insulina, predominam aqueles que a encontraram diminuída, o que foi considerado como causa da menor tolerância à glicose no período vespertino em comparação com o matutino (41-43). O grau de diminuição da sensibilidade à insulina foi de 15% ao teste de tolerância à insulina (42) e de 30% ao teste endovenoso de tolerância à glicose associado ao modelo matemático mínimo (41).

Também entre os estudos que avaliaram a secreção de insulina, a maioria observou-a diminuída acompanhando a menor tolerância à glicose no final do dia. Utilizaram-se diferentes estimulantes da função β -celular, tais como: a glicose (14,41), a tolbutamida (22,44), o glucagon (45) e uma refeição mista (29). Ao teste endovenoso de tolerância à glicose houve diminuição de 25% na 1ª fase de secreção de insulina e diminuição de 50% da potencialização pela glicose do estímulo agudo da secreção insulínica pela arginina, à tarde em relação ao período da manhã (41). Com infusão de solução glicosada de concentração crescente verificou-se menor taxa de secreção de insulina e diminuição de 40% da inclinação da reta de regressão relacionando glicemia e taxa de secreção de insulina ao final da tarde comparativamente ao período da manhã (14).

Há evidências de que o clearance de insulina não apresenta variações significativas durante o período diurno do ciclo de 24 horas (22).

A demonstração, sob uma variedade de condições experimentais, da existência de uma consistente variação da tolerância à glicose da manhã para o final da tarde ao mesmo estímulo, que foi independente de mudanças de atividade física ou de outros parâmetros ambientais, sugere que esta variação deve ser, pelo menos parcialmente, controlada por sinais originados de um marca-passo potente gerador de um sinal circadiano (14). Em mamíferos, o mecanismo responsável pela ritmicidade circadiana está localizado num único marca-passo no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (14,19). Até o momento, a sinalização hormonal parece ser a via primária para a transmissão das oscilações circadianas, geradas centralmente, aos órgãos periféricos. Os hormônios contra-reguladores, incluindo catecolaminas, glucagon, GH e cortisol, poderiam ser os mediadores (14). Com exceção dos níveis plasmáticos de cortisol, que são muito dependentes do horário do dia, os demais hormônios contra-reguladores não apresentam variações consistentes durante o período diurno em indivíduos normais (14,46). Embora em indivíduos recebendo infusão constante de glicose tenha-se observado uma relação temporal inversa entre os padrões de glicose e insulina durante 24 horas, de um lado, e aquele do cortisol, do outro lado, e com correlação significativa entre as amplitudes de ambos ritmos (39), a possibilidade de que o ritmo circadiano do cortisol pudesse ter papel determinante na variação diurna da tolerância à glicose foi repetidamente descartada (41,47). De fato, a coincidência da sensibilidade à insulina aumentada com níveis elevados de cortisol pela manhã e de resistência à insulina com baixos níveis de cortisol no final da tarde é uma aparente contradição aos bem conhecidos efeitos adversos dos glicocorticóides na sensibilidade à insulina. Esta contradição é, no entanto, apenas aparente, uma vez que estudos mostraram que além do efeito imediato dos glicocorticóides inibindo a secreção de insulina, o de redução da sensibilidade à insulina só se manifesta 4 a 6 horas depois da elevação da concentração plasmática de cortisol e

pode persistir por mais de 16 horas (47-50). Assim, sob condições fisiológicas, a variação circadiana das concentrações de cortisol pode ser um mecanismo causal para uma tolerância à glicose ótima, com influência mínima na resposta secretória da insulina de manhã e diminuição da sensibilidade à insulina, sem aumento apropriado da secreção de insulina 6-15 horas mais tarde, isto é, no final da tarde/início da noite (14).

Os estudos da variação da tolerância à glicose durante o período noturno em indivíduos saudáveis, em jejum e sem registro poligráfico do sono observaram estabilidade glicêmica associada ou não à presença do fenômeno do alvorecer (33,37). Os níveis glicêmicos estáveis resultavam da concomitante diminuição da utilização da glicose e da produção hepática de glicose, cujos sinalizadores seriam os níveis circulantes aumentados de glicerol e AGLs (14). A infusão contínua de solução glicosada durante a noite e o registro poligráfico do sono em indivíduos jovens e saudáveis permitiram demonstrar que inicialmente havia elevação glicêmica e da taxa de secreção de insulina e depois retorno às condições prévias (14,51). A elevação glicêmica se devia à diminuição de 30-40% do metabolismo da glicose pelo cérebro, coincidindo com os estágios de não-movimentação rápida dos olhos (fases III e IV do sono) e da menor captação de glicose pelos músculos em repouso (52,53). A menor utilização periférica de glicose sofreria também importante influência da elevação da secreção do GH, juntamente com maior clearance da insulina (39), naquelas fases do sono (14). Menos esclarecidas estão as influências da elevação paulatina do cortisol plasmático sobre a curva glicêmica noturna (14).

Há situações fisiológicas e patológicas em que o ritmo circadiano da glicose se altera.

2b) Indivíduos Idosos e Saudáveis

Com o envelhecimento, há mudanças na composição corporal (diminuição da musculatura e aumento do tecido adiposo abdominal), nos ritmos biológicos (ciclo sono/vigília e ritmos hormonais), diminuição da secreção do GH e diminuição da secreção e ação da insulina (14). Os estudos comparativos entre indivíduos adultos idosos e jovens, todavia, não observaram alteração na variação circadiana da tolerância à glicose durante o dia nos primeiros. Por outro lado, os estudos realizados durante o período noturno, como o de Meneilly *et al.* (54), não demonstraram a ocorrência do fenômeno do alvorecer em indivíduos mais idosos. Aquelles autores realizaram o clamp euglicêmico envolvendo hiperinsulinemia fisiológica pela manhã (9h30-12h00) e compararam-no com o realizado ao amanhecer (5h30-8h00) em cinco adultos mais velhos e saudáveis. Durante os testes, foram medidos os níveis de insulina, o clearance de insulina, a taxa de utilização de glicose e a produção hepática de glicose. Entre os dois estudos, só verificaram diferença quanto a um aumento de 20% no clearance de insulina no início da manhã. Os autores concluíram não ocorrer o fenômeno do alvorecer em adultos mais velhos e saudáveis e especularam que este fato decorresse da diminuição da secreção noturna do GH nesta fase da vida. Outros estudos foram realizados para avaliar o efeito do ciclo sono/vigília sobre o ritmo circadiano da glicose com o envelhecimento. Entre estes, há o de Frank *et al.* (55) em que indivíduos mais velhos, saudáveis e com sobrepeso foram estudados comparativamente com jovens pareados no peso e com jovens com peso ideal. O estudo teve duração de 53 horas, durante as quais recebiam infusão contínua de solução glicosada (5 g/kg de peso.24h), havia mudanças de 12 horas do ciclo

sono/vigília e registro poligráfico dos períodos de sono. Os estágios III e IV do sono, caracterizados por diminuição das ondas lentas nos indivíduos mais velhos, associaram-se a maior elevação da glicemia, que foi devida ao maior peso e menor resposta das células β .

2c) Indivíduos Obesos

Os estudos da função β -celular durante o dia em indivíduos obesos mostraram não haver alteração do padrão secretório, mas hipersecreção de insulina, como resposta à resistência à insulina, característica desta condição (35,56). As avaliações da resposta glicêmica a uma carga oral de glicose administrada pela manhã e à tarde (24,57) indicaram uma relação inversa entre a diminuição da tolerância à glicose da manhã para a tarde e o grau de obesidade. Os estudos em obesos submetidos ao teste endovenoso de tolerância à glicose (41) ou à infusão contínua de solução glicosada (58) não verificaram declínio da tolerância à glicose à tarde apesar de uma diminuição da resposta das células β à glicose, indicando até uma melhora da sensibilidade à insulina. Após um dia habitual, durante a noite, os estudos (35,56,59) observaram em indivíduos obesos as mesmas alterações do metabolismo da glicose que ocorrem em indivíduos não obesos, isto é, com o evoluir da noite há diminuição das concentrações de glicose e de insulina e da taxa de secreção de insulina. Van Cauter et al. (58) estudaram o efeito do sono sobre o metabolismo da glicose em indivíduos obesos. Os participantes do estudo receberam infusão contínua de glicose e os períodos de sono foram registrados em polígrafo. Observaram que não havia alterações do padrão do sono em relação aos controles. Após o início do sono, houve elevação da glicemia e da taxa de secreção de insulina em grau bem menor que a observada nos controles, devido à menor liberação do GH nos indivíduos obesos. Na última parte do sono, não se observou nos obesos diminuição da taxa de secreção de insulina, que pode significar resistência à insulina. Ambas as alterações do metabolismo da glicose determinadas pelo sono podem estar envolvidas na reversão da variação diurna da tolerância à glicose observada na obesidade (60).

2d) Indivíduos com Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)

Em contraste com os vários estudos que investigaram as mudanças circadianas da tolerância à glicose em indivíduos não diabéticos, muito poucos estudos endereçaram este tópico específico a pacientes com DMT2. Observações iniciais das variações diurnas da tolerância oral à glicose em grupo pequeno (61) ou em uma grande população (57) mostraram que o grau de intolerância à glicose à tarde, quando comparada com aquela pela manhã, era menor naqueles indivíduos com as glicemias mais elevadas pela manhã. Posteriormente, estudo em diabéticos tipo 2 durante clamp hiperflicêmico de 72 horas (62) demonstrou, incontestavelmente, variação na quantidade de glicose que necessitava ser infundida para a manutenção dos níveis glicêmicos em cerca de 12 mmol/L (216 mg/dL), durante o período de 24 horas. A taxa de infusão de glicose teve que ser aumentada de mais que três vezes da manhã para o

final da tarde, indicando que, no DMT2, a tolerância à glicose aumentava muito à medida que as horas do dia avançavam. Uma vez que a secreção de insulina foi relativamente constante, o resultado acima é indicativo de um marcante ritmo da sensibilidade à insulina no período de 24 horas, oposto ao que ocorre em indivíduos não diabéticos, isto é, sensibilidade mínima pela manhã e máxima ao final da tarde.

A existência de uma elevação paradoxal da glicemia ao final do período do sono em indivíduos diabéticos em jejum foi relatada pela primeira vez por Hathehol (63) em 1924, e achados semelhantes foram descritos numa série de estudos conduzidos nas próximas três décadas (64-66). Em 1967, Faïman & Moorhouse (17) colheram amostras de sangue a cada 4 horas durante um período de jejum de 72 horas de diabéticos tipo 2. Observaram queda dos níveis glicêmicos durante o dia e elevação durante a noite, cujo pico ocorria às 8h; a amplitude de tal ciclo era tanto maior quanto mais hiperglicêmico era o paciente. Estes estudos pioneiros, embora com limitações próprias, dão suporte à existência de elevação glicêmica no período do amanhecer. Mais tarde, com infusão de glicose por sistema de alça fechada e controlado por retro-alimentação (Biostator) em diabéticos tipo 2, Bolli & Gerich (67) observaram a presença do fenômeno do alvorecer, expresso pelo aumento da necessidade de insulina de 47 a 66% entre as 6h e 9h, comparativamente ao período das 24h às 6h. Tal resultado deve estar superestimado devido à limitação técnica do Biostator, que após utilização prolongada (10-12 horas) causa agregação e degradação da insulina. De fato, em estudo em que foi adicionada albumina à solução de insulina observou-se aumento menor, isto é, de cerca de 40% nas necessidades de insulina depois das 6h em pacientes com DMT2 (68). Alguns outros estudos foram realizados sendo que o fenômeno do alvorecer foi verificado em cerca de 50% deles. Estes estudos (59,69-76) diferiram quanto ao grupo populacional envolvido (grau de obesidade, idade, gravidade e duração do diabetes, tipo de tratamento) assim como, e mais importante, quanto à duração do jejum que precedeu o período noturno de estudo. De fato, Beebe et al. (75) mostraram que o fenômeno do alvorecer foi consistentemente observado apenas quando a última refeição era ingerida no final da tarde e compreendia não mais que 30% das necessidades calóricas diárias totais.

Estudos em diabéticos tipo 2 durante o período de jejum noturno habitual, em que se evidenciou o fenômeno do alvorecer, isto é, elevação glicêmica no final da noite, este se associou à resposta insulínica deficitária, expressa pela concentração plasmática de insulina ou pela taxa de secreção de insulina (74). Também, quando indivíduos com DMT2 e controles foram submetidos a jejum prolongado (30 horas), que provocou a liberação dos hormônios contra-reguladores: GH e cortisol, observou-se maior hiperglicemia no final do período noturno nos diabéticos por inadequada resposta insulínica (76).

A avaliação do balanço metabólico da glicose e lipídios durante o jejum noturno habitual em diabéticos tipo 2 moderadamente hiperglicêmicos evidenciou alterações que explicariam a elevação glicêmica no final do período noturno: produção hepática de glicose acelerada primariamente via neoglicogênese aumentada a partir do lactato, acompanhada de elevação dos níveis de AGLs (74).

Estudo antes mencionado e que observou o fenômeno do alvorecer em diabéticos tipo 2, utilizou a técnica do clamp hiperglicêmico por 72 horas para tentar elucidar sua causa (62). Evidenciou-se que a taxa de

infusão de glicose diminuía de mais de 50% da tarde para o meio da noite e medidas isotópicas indicaram que esta variação refletia produção sistêmica de glicose aumentada. Este resultado foi interpretado como modificação da sensibilidade à insulina. É possível que também tenha contribuído para a queda da taxa de infusão de glicose observada a menor utilização de glicose pelo cérebro, que normalmente ocorre durante o sono em indivíduos não diabéticos (52,53,77,78).

Mais recentemente, foram estudados 9 pacientes com DMT2 (idade: 54 ± 2 anos; índice de massa corporal (IMC): $27,8 \pm 0,8$ kg/m²) tratados apenas com dieta, em duas ocasiões, a um intervalo de uma semana, entre as 5h e 8h (EM) e entre as 17h e 20h (ET) (79). Cada estudo era precedido do mesmo período de jejum (9 horas) e sendo a mesma a última refeição. Os pacientes foram avaliados pela associação de clamp isoglicêmico-hiperinsulinêmico (10 mU/m².min; nível glicêmico: glicemia basal do ET) com infusão de isotopos estáveis de glicose e glicerol. Nas condições basais, observou-se maior concentração plasmática de glicose e de insulina e menor de AGLs no EM vs ET. Durante o clamp, sob condições estáveis e semelhantes de glicemia e insulinemia nos dois períodos, verificou-se maior produção sistêmica de glicose no EM vs ET ($5,61 \pm 1,20$ vs $0,84 \pm 0,59$ μ mol/kg.min; $P < 0,01$) associada à maior lipólise, sem diferença quanto à utilização sistêmica de glicose. Assim, no DMT2 há variações circadianas do metabolismo da glicose e dos lipídios devido à menor sensibilidade à insulina pela manhã (início) que à tarde (final). Posteriormente, estudo semelhante realizado em cinco indivíduos não-diabéticos e com idade e IMC semelhantes aos do grupo de diabéticos, evidenciou resultado oposto ao dos diabéticos quanto à produção sistêmica de glicose, isto é, maior à tarde que pela manhã ($3,16 \pm 0,62$ vs $1,18 \pm 0,21$ μ mol/kg.min; $P < 0,05$) (80). Concluiu-se que no DMT2 o aumento da produção sistêmica de glicose pela manhã pode ser considerado como um evento específico e precoce, que é responsável pelo desenvolvimento da hiperglicemia diagnóstica.

Dos vários e frequentemente contraditórios estudos sobre as variações diurnas e noturnas da regulação da glicemia no DMT2, é possível concluir que pelo menos dois tipos de alterações caracterizam o estado diabético em relação ao não-diabético. Primeiro, a tolerância à glicose aumenta da manhã para o final da tarde, pelo menos em parte devido à melhora da sensibilidade à insulina. Este fato se opõe à situação de normalidade, onde a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina são máximas pela manhã, ao invés de ao final da tarde. Estudos que avaliem o efeito do horário do dia sobre a tolerância à refeição em indivíduos diabéticos são então necessários para fornecer orientações quanto à composição ótima de seu desjejum, almoço e jantar. Segundo, uma elevação da glicemia no final do período noturno de jejum, isto é, o fenômeno do alvorecer, pode ser observado em alguns pacientes com DMT2. A ocorrência do fenômeno do alvorecer parece ser mais frequente em pacientes mais hiperglicêmicos e com período mais longo de jejum antes de se deitar. Os mecanismos subjacentes que causam este fenômeno não estão esclarecidos, havendo alguma evidência de que possam estar envolvidas alterações nas interações entre a ritmicidade dos níveis de cortisol, da secreção de insulina e da sensibilidade à insulina (14).

Além da inversão do ritmo circadiano da tolerância à glicose, também precocemente nos pacientes com DMT2 foram observadas alterações profundas da secreção de insulina: 1) ausência da 1ª fase e diminuição de 70% da secreção de insulina à glicose endovenosa; 2) resposta secretória de insulina diminuída e atrasada a

refeições mistas; 3) distúrbios das oscilações ultradianas e dos pulsos rápidos da secreção de insulina (6); 4) elevação das concentrações circulantes de pró-insulina (6,81). Deve-se ressaltar que estes defeitos da secreção de insulina foram observados tendo-se considerado como fatores interferentes a glicotoxicidade e a resistência à insulina, presentes nos pacientes com DMT2. Além disso, a resistência à insulina parece ser fator necessário para a expressão dos defeitos secretórios das células β no DMT2 (82).

3. Tolerância à Glicose Diminuída

O DMT2 é considerado uma síndrome metabólica de origem genética, cuja manifestação é tardia e influenciada por fatores ambientais. A tolerância à glicose diminuída (TGD) foi originalmente definida como uma condição em que os indivíduos apresentam glicemia de jejum < 140 mg/dL e glicemia de 2 horas após uma carga oral de glicose (75g) > 140 mg/dL e < 200 mg/dL e considerada um estado transitório pelo qual passam a maioria, se não todos, que estão destinados a desenvolverem o diabetes (83,84). Posteriormente, houve diminuição do valor de corte da glicemia de jejum para < 126 mg/dL na definição do estado de TGD (85). Nos últimos anos, estudos epidemiológicos com grupos populacionais de diferentes etnias têm demonstrado que além de risco aumentado para o desenvolvimento do DMT2 o estágio de TGD é preditor independente de risco para as doenças cardiovasculares (86-90).

A prevalência da TGD varia entre as populações, elevando-se em função da idade dos indivíduos. Na população urbana brasileira (participação de 9 grandes cidades), Malerbi *et al.* (91) observaram prevalência de 7,8% nos indivíduos com 30 a 69 anos de idade. Esta frequência é semelhante à do DMT2 nesta população e à observada em países industrializados, onde o DMT2 é considerado importante problema de saúde pública.

Assim, por um lado, é incontestável a importância de se diagnosticar o estado de TGD e intervir com medidas simples como orientação alimentar e atividade física regular, que diminuindo o IMC e a resistência à insulina tem melhorado a tolerância à glicose e reduzido sua evolução para o DMT2 (92-95). Por outro lado, a identificação de distúrbios metabólicos nesta fase que são próprios do DMT2 auxiliam a compreensão da patogênese do DMT2. Ainda, na TGD, diferentemente de no DMT2, supõe-se que os efeitos prejudiciais da hiperglicemia na secreção e ação da insulina sejam limitados.

Algumas das alterações metabólicas próprias do DMT2 foram demonstradas na TGD. No estágio de TGD, os indivíduos geralmente apresentam outras comorbidades, que podem constituir a síndrome plurimetabólica, e portanto, resistência à insulina. Daí, a importância de no estudo da função β -celular destes indivíduos considerar-se o grau de resistência à insulina. Assim, pareando os indivíduos com TGD e com tolerância à glicose normal (TGN) quanto às características: sexo, idade, IMC e razão cintura-quadril, avaliou-se a secreção de insulina em suas fases precoce e tardia pelo clamp hiperglicêmico e a sensibilidade à insulina pelo clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico e/ou clamp hiperglicêmico em dois grupos populacionais distintos: caucasianos de origem europeia (96) e brancos brasileiros, que resultam da miscigenação das três raças: caucasiana, indígena e negra (97). Em ambos, observou-se

diminuição da secreção de insulina, principalmente de sua 1ª fase (34,6% e 62,0%, respectivamente) sem alteração da sensibilidade à insulina nos indivíduos com TGD relativamente aos com TGN. A disfunção das células β em relação à resistência à insulina presente foi também verificada por outros autores em indivíduos com TGD (98-100). A fase precoce da secreção de insulina diminuída é a principal causa da hiperglicemia e da hipertrigliceridemia pós-prandiais, que caracterizam os portadores de TGD (101). Estes períodos de hiperglicemia são responsáveis pelo desenvolvimento da microangiopatia e associados aos de elevação dos triglicérides plasmáticos e dos outros fatores de risco para doenças cardiovasculares, comumente presentes nos indivíduos com TGD, pela aceleração do processo de aterosclerose (102,103).

Os estudos magistrais de Polonsky e seus colaboradores sobre a função β -celular por meio de infusão de glicose e determinação da taxa de secreção de insulina com base nos parâmetros de cinética do peptídeo C, demonstraram haver na fase de TGD inabilidade das células β em detectar e responder às oscilações agudas da glicemia (99).

Nos indivíduos com TGD, foram verificadas menor supressão da secreção de glucagon pelas células α pancreáticas à glicose (104,105). Mitrakou et al. (104) estudaram indivíduos com TGD, pareados em idade e peso com indivíduos com TGN, após a ingestão de 1 g/kg de peso de glicose, quanto aos balanços hormonal e metabólico. Observaram resposta insulínica atrasada e diminuída aos 30 minutos e menor supressão da resposta do glucagon, causando uma diminuição da razão insulina-glucagon. Este distúrbio bi-hormonal determinou uma menor supressão da produção hepática de glicose e conseqüentemente, elevação dos níveis glicêmicos.

Estudos com diferentes grupos étnicos, inclusive brasileiro, observaram aumento das concentrações plasmáticas de pró-insulina em condições basais e ao estímulo pela glicose e secreção desproporcionada de pró-insulina em relação à de insulina pelas células β pancreáticas de indivíduos com TGD (81,106,107). A causa desta disfunção tem sido considerada como resultado de maior solicitação de secreção e/ou de defeito intrínseco das células β . Em grupo populacional da cidade de Hoorn (Holanda), Ruise et al. (108) estudaram a função β celular em 110 indivíduos com TGD e elevado risco para desenvolverem o DM2. Em condições basais foi determinada a razão pró-insulina/insulina circulantes e pelo clamp hiperglicêmico, a 1ª fase de secreção, como tempo para atingir o valor-pico, e o índice de sensibilidade à insulina. Os autores demonstraram que a razão pró-insulina/insulina foi independentemente associada (considerou-se o grau de sensibilidade à insulina e de hiperglicemia vigentes) com uma resposta atrasada das células β (secreção de insulina) ao estímulo com glicose. Neste mesmo grupo de estudo, Nippels et al. (109) observaram que a elevação da concentração plasmática de pró-insulina em condições basais era um dos parâmetros associados com a progressão para o DM2. Em americanos de origem japonesa, Kahn et al. (110) verificaram que não só a pró-insulina plasmática de jejum mas também a razão pró-insulina/insulina plasmáticas aumentadas se associaram com maior risco para o desenvolvimento do DM2. Mais precisamente, estes autores calcularam que um aumento de 7,54 pmol/L nos valores plasmáticos basais de pró-insulina relacionou-se com risco relativo para o DM2 de 2,73. No grupo populacional participante do San Antonio Heart Study, Haffner et al.

(106) verificaram que houve também associação da elevação da razão pró-insulina/insulina plasmáticas em condições basais com o desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

Alterações do ritmo circadiano da glicose foram observadas com o envelhecimento, na obesidade e no DMT2 (14). Embora ainda não completamente compreendidas, devem estar envolvidas com a patogênese do DMT2 e têm implicações em seu tratamento. Pouco foi estudado quanto a este parâmetro na fase de TGD, considerada pré-diabética, e que se melhor entendida deverá lançar luz sobre a patogênese do DMT2.

Objetivo

Assim, nosso objetivo foi avaliar comparativamente a variação circadiana da tolerância à glicose num dia próximo das condições habituais, observando-se a resposta dos metabólitos: glicose e AGLs sanguíneos e dos hormônios: insulina, pró-insulina, cortisol e do GH plasmáticos em dois grupos de voluntários semelhantes nas principais características clínicas, um apresentando TGD (grupo experimental) e o outro TGN (grupo controle).

Indivíduos e Métodos

a) Indivíduos:

Após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa de nossa Instituição, o projeto de estudo foi divulgado em nosso meio e demais Centros Médicos de nossa cidade e região.

Os critérios de inclusão estabelecidos foram: 1) os indivíduos deveriam estar desprovidos de participar do estudo e, após seu esclarecimento, darem o consentimento livre e por escrito; 2) serem saudáveis; 3) terem atividade física moderada; 4) não serem portadores de doenças crônicas tais como: diabetes mellitus, insuficiência renal, cardíaca ou hepática, hipertensão arterial, anemia, etc; 5) não estarem em uso de medicamentos que sabidamente interferem no metabolismo da glicose (corticóides, diuréticos tiazídicos, anticoncepcionais, β -bloqueadores, etc.); 6) as mulheres em idade fértil terem comprovada a ausência de gravidez.

Aos indivíduos que se adequaram ao estudo, agendou-se uma primeira visita à qual compareciam ao Laboratório de Endocrinologia e Metabolologia às 7h tendo observado um jejum noturno de 8 a 12 horas, e três dias antes, uma dieta contendo no mínimo 250g de carboidratos por dia. Nesta visita, fazia-se uma anamnese dando atenção especial para a história familiar de DM2, isto é, presença de parentes em 1º grau afetados, hábitos de vida e o recordatório alimentar. Também se procedia a uma avaliação clínica geral que incluía as medidas antropométricas como peso, altura, cintura e quadril e da pressão arterial (PA) que foram realizadas com o indivíduo vestindo roupas leves e sem sapatos. As medidas de peso e altura foram avaliadas por meio de balança antropométrica (Filizgala, BR). A circunferência da cintura foi medida utilizando-se uma fita métrica maleável com o indivíduo em posição ortostática considerando-se o menor valor entre o último arco costal e a crista ilíaca e para o quadril, o maior valor na região glútea. A PA foi medida duas vezes pelo método auscultatório considerando-se o valor médio e em posição sentada. Em seguida, colhia-se uma amostra de sangue e de urina para avaliação laboratorial geral (provas de função renal e hepática, eletrólitos, perfil lipídico, hemograma e urinalise) e procedia-se ao TOTG, de acordo com os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Diabetes, 1997 (85). As mulheres participantes que estavam em idade fértil foram sempre estudadas durante a fase folicular do ciclo menstrual.

Aqueles indivíduos, em que as avaliações clínicas e laboratoriais confirmaram sua adequação ao estudo e ao TOTG apresentaram TGN ou TGD, agendou-se a segunda visita que constava de internação por 24 horas na Enfermaria de Clínica Médica II do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB, Unesp). Em 54% dos indivíduos com TGD, o resultado do TOTG atual confirmou o resultado de TOTG prévio.

Cada participante era admitido na Enfermaria às 6h45 e tendo observado as mesmas condições exigidas para a primeira visita. No leito, em decúbito dorsal confortável, era colocado um cateter número 21 na veia cubital de um dos braços para as coletas de sangue e a mesma era mantida pérvia por infusão contínua e lenta de solução fisiológica (máximo: 1 litro em 24 horas).

As coletas das amostras de sangue foram efetuadas durante as 24 horas compreendendo um período diurno com três refeições básicas (7h-22h) e um período noturno de sono (22h-7h).

Nas amostras de sangue coletadas no estado basal e na frequência abaixo descrita, doravam-se:

- a) Glicose plasmática: de hora em hora, até às 24h, e a partir desse horário de duas em duas horas;
- b) AGLs séricos: de hora em hora;
- c) cortisol e GH plasmáticos: de duas em duas horas;
- d) insulina específica e pró-insulina intacta plasmáticas: a cada 30 min após as refeições, até completar duas horas, e nos outros períodos de duas em duas horas.

Foram coletadas 28 amostras no total envolvendo a retirada de uma quantidade de sangue entre 2,5 - 8 mL em cada uma.

As amostras de sangue para as dosagens de glicose foram coletadas em tubos contendo fluoreto de sódio e oxalato de potássio; para as de AGLs em tubo seco e as para dosagens dos hormônios, em tubos contendo heparina. Todas as amostras foram conservadas em gelo e em seguida em geladeira, por no máximo duas horas quando eram centrifugadas. O plasma e/ou soro foram separados e armazenados em freezer a -20°C (glicose até cinco dias) ou em freezer a -70°C (hormônios por quatro a seis meses; AGLs até o final do estudo) para posteriormente serem realizadas as respectivas dosagens.

A dieta foi elaborada por nutricionista de acordo com o recordatório alimentar de cada um e preparada pelo Serviço de Nutrição e Dietética do HC-FMB, Unesp. A dieta era do tipo geral e fornecia 2000 Kcal para mulheres e 2500 Kcal para os homens e era dividida em 3 refeições básicas: a) café da manhã às 8h, compreendendo aproximadamente 20% do valor calórico total (VCT), b) almoço e jantar às 12h e às 18h, respectivamente, com 40% do VCT cada. Cada refeição era composta de 50% de carboidratos, 35% de lipídios e 15% de proteínas.

Todos os indivíduos eram estimulados a terem uma atividade de entretenimento durante o dia (leituras, televisão, trabalhos manuais, conversas com o pessoal da Enfermária, etc.), e à noite dormiram com a luz apagada a partir das 22 horas, sendo que as coletas noturnas foram realizadas cuidadosamente para evitar a interrupção do sono.

Transcorridas as 24 horas, pela manhã após a coleta das 7h, tomavam o café, eram avaliados pela médica responsável e dispensados a seguir.

b) Métodos:

As dosagens de glicose plasmática foram realizadas pelo método da glicose oxidase utilizando-se o aparelho Glucose Analyzer 2 (Beckman Instruments, CA, USA).

Os AGLs foram dosados pelo método imunoenzimático e colorimétrico utilizando-se kit da Wako (Wako Chemicals, VA, USA), cuja especificidade era de 0,1-0,6 mmol/L e sensibilidade de 0,02%.

A insulina específica e a pró - insulina intacta foram medidas pelo método imunoenzimático empregando-se os kits comerciais da DAKO Diagnostics (Dako, Cambridgeshire, UK) com limite de detecção de 3 pmol/L e de $< 0,5$ pmol/L para a insulina e a pró-insulina, respectivamente e coeficientes de variação (CVs) intra-

ensaio de 5,1-7,5% para a insulina e de 2,3-4,0% para a pró-insulina e interensaio de 4,2-9,3% e 4,8-5,5% para a insulina e a pró-insulina, respectivamente.

O cortisol e o GH foram dosados pelo método de radioimunoensaio (RIE) com os kits comerciais da DPC (Diagnostics Products Corporation, CA, USA) cujo CV intra-ensaio foi de 4,4-4,8% e 1,5-5,9% para o cortisol e o GH, respectivamente e interensaio de 5,2-6,4% e 1,8-8,3% para o cortisol e o GH, respectivamente.

O colesterol total e suas frações e os triglicérides foram quantificados pelo método enzimático e colorimétrico, utilizando-se o Vitros-950 (Johnson & Johnson, PA, USA).

Todas as dosagens referentes a cada participante eram realizadas num mesmo ensaio e em duplicata.

c) Análise Estatística:

A comparação entre os dois grupos de estudo segundo parâmetros clínicos e laboratoriais básicos e as glicemias, durante as 24 horas do dia foi realizada considerando-se o teste t de Student para amostras independentes (111).

Em relação às curvas de insulina específica, pró-insulina intacta, cortisol e GH plasmáticos e AGLs séricos durante as 24 horas, utilizou-se o teste de Mann-Whitney (111).

O mesmo procedimento foi realizado quanto às áreas totais sob as curvas (ASC) de AGLs sérico, cortisol e GH plasmáticos e para as áreas incrementais das curvas (Δ ASC) da glicose, insulina específica, pró-insulina intacta plasmáticas que foram calculadas pela técnica de integração numérica denominada fórmula dos trapézios (112).

As avaliações envolvendo os três períodos pós-prandiais: café: 8h-12h; almoço: 12h-18h e Jantar: 18h-22h, compreenderam o cálculo das ASC expressas em horas (ASC_h), para a comparação entre os grupos e intra-grupos. Para estas comparações utilizou-se técnica da análise de variância não paramétrica para medidas repetidas em dois grupos independentes (111).

Quanto às razões entre insulina/glicose, pró-insulina/glicose e pró-insulina/insulina plasmáticas das Δ ASC e ASC sob as curvas de resposta das 24 horas e em cada um dos períodos pós-prandiais, respectivamente dos grupos TGD e TGN, as comparações foram realizadas empregando-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (111).

Todas as discussões no presente estudo foram realizadas considerando-se significância de 5%.

Resultados

Foram candidatos em potencial ao estudo 360 indivíduos dos quais somente 33 se adequavam e aceitaram participar do mesmo. Este limitado número de participantes foi consequência de termos visado a um pareamento do grupo TGD com o TGN, quanto às principais características clínicas e laboratoriais, excetuando-se as glicemias.

Dos 33 participantes, 18 indivíduos compuseram o grupo TGN e 15 indivíduos o grupo TGD, cujos principais dados clínicos e bioquímicos são apresentados na Tabela 1.

Ambos os grupos eram semelhantes em todos os parâmetros analisados, exceto quanto às glicemias de jejum e de duas horas após a carga oral de 75g de glicose, aos AGLs séricos e à pró-insulina intacta plasmática em jejum. Nestes parâmetros em que os grupos se diferenciavam os valores foram mais elevados no grupo TGD, exceto quanto aos dos AGLs séricos que foram maiores no grupo TGN.

De acordo com a classificação da glicemia de jejum pela ADA em 2005 (113), 47% dos indivíduos do grupo TGD apresentavam glicemia alterada, isto é, glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL e ≤ 125 mg/dL.

Em ambos os grupos, houve predomínio do sexo feminino: 78% e 87% nos TGN e TGD, respectivamente. Os participantes tinham idade compreendida entre 30 e 50 anos, apresentavam sobrepeso (114) e a relação cintura/quadril estava no limite superior para o sexo feminino (114,115). Todos se encontravam normotensos (113,116). Quanto ao perfil lipídico, verificou-se discreta elevação dos níveis do LDL-colesterol, principalmente no grupo TGN (117,118). De todos os participantes, apenas uma mulher do grupo TGN era fumante (119) e todos informaram serem moderadamente ativos (120).

As glicemias (mg/dL) durante o período de 24 horas dos indivíduos com TGN e com TGD são apresentados na Figura 1 e Anexo 3: Tabela I, mostrando que a curva glicêmica do grupo TGD atingiu valores significativamente superiores em relação aos do grupo TGN na maioria dos horários (68,2%). A Δ ASC glicêmica (Figura 2, Anexo 3: Tabela II) conseqüentemente, resultou ser significativamente maior no grupo TGD em comparação ao TGN.

Embora a curva glicêmica do grupo TGD tenha se apresentado, na maioria dos momentos, significativamente mais elevada que a do grupo TGN, não observamos diferença entre esses grupos quanto à correspondente curva insulinêmica (μ mol/L) (Figura 3, Anexo 3: Tabela III). Tal resultado foi confirmado pela respectiva Δ ASC da insulina específica plasmática (Figura 2, Anexo 3: Tabela II). Ao analisarmos a curva da insulina específica plasmática, a mesma usure que no grupo TGN após o café e almoço houve liberação bifásica da insulina, mas monofásica após o jantar, enquanto no grupo TGD a liberação deste hormônio nos períodos pós-prandiais foi sempre monofásica.

Por outro lado, as concentrações da pró-insulina intacta plasmática (μ mol/L) foram significativamente mais elevadas nos indivíduos TGD, em cerca de 50% dos horários, principalmente no período noturno e antes e 1,5 a 4,5 horas após o café (Figura 4, Anexo 3: Tabela IV). A Δ ASC da pró-insulina plasmática (Figura 2, Anexo 3: Tabela II), foi então mais elevada no grupo TGD do que no TGN, sem todavia atingir diferença significativa.

Quanto à razão entre a Δ ASC da insulina específica e da glicose plasmáticas, o seu valor foi quase duas vezes menor no grupo TGD em relação ao TGN, devido principalmente à maior área incremental da glicemia (Figura 5, Anexo 3: Tabela V). Como as Δ ASC da pró-insulina intacta e da glicose plasmáticas foram mais elevadas no grupo TGD comparativamente ao TGN, a respectiva razão não diferiu entre os mesmos (Figura 5, Anexo 3: Tabela V). Por outro lado, a razão resultante do mesmo cálculo para a pró-insulina intacta e insulina específica plasmáticas foi duas vezes maior nos indivíduos TGD, devido à maior Δ ASC da pró-insulina e à menor da insulina (Figura 5, Anexo 3: Tabela V).

A resposta total durante os três períodos pós-prandiais: pós-café (8-12h), pós-almoço (12-18h) e pós-jantar (18-22h) foram analisadas quanto à glicose, insulina específica e pró-insulina intacta plasmáticas considerando a comparação entre os períodos em cada grupo (comparações intra-grupos) e de cada período entre os dois grupos: TGD e TGN (comparações inter-grupos). Para tais comparações, foi necessário expressar a resposta total (ASC) das três variáveis em cada período pós-prandial, por hora, pois o período pós-almoço compreendeu duas horas a mais que os outros dois períodos.

No grupo TGN a ASC horária (ASC_h) da glicemia foi significativamente mais elevada no período pós-jantar que após as outras duas refeições precedentes (Figura 6, Anexo 3: Tabela VI). Tal resposta foi acompanhada por ASC_h da insulina específica e pró-insulina intacta plasmáticas semelhantes em todos os períodos pós-prandiais (Figura 6, Anexo 3: Tabela VI). No grupo TGD a ASC_h da glicemia foi significativamente maior após o café e o jantar, sendo a resposta insulínica mais elevada apenas após o café e a da pró-insulina intacta plasmática, semelhante após as três refeições (Figura 6, Anexo 3: Tabela VI).

Na comparação entre os grupos, a ASC_h glicêmica foi significativamente mais elevada após o café e o almoço nos indivíduos TGD e não houve diferença entre os dois grupos após o jantar (Figura 6, Anexo 3: Tabela VI). A diferença de respostas glicêmicas foram acompanhadas apenas de maior ASC_h da pró-insulina intacta plasmática, pós-café no grupo TGD (Figura 6, Anexo 3: Tabela VI).

O grupo TGD não diferiu do TGN em relação à razão entre a ASC da insulina específica e da glicose plasmáticas para os três períodos pós-prandiais (Tabela 2). O mesmo ocorreu para a razão entre a ASC da pró-insulina intacta e da glicose plasmáticas (Tabela 2). Por outro lado, os indivíduos TGD apresentaram a razão entre a ASC da pró-insulina intacta e da insulina específica plasmáticas significativamente mais elevada nos três períodos pós-prandiais (Tabela 2).

Em condições basais, as concentrações de AGLs séricos (Figura 7, Anexo 3: Tabela VII) em ambos os grupos estavam acima do limite superior do método, e após as refeições havia uma pequena diminuição desses valores. Estes resultados, então, determinaram uma ASC semelhante entre os grupos (Figura 8, Anexo 3: Tabela VIII).

Quanto à curva do cortisol plasmático (ng/dL), esta mostrou as variações circadianas clássicas em cada grupo e ambas as curvas foram semelhantes entre si (Figura 9 e 10, Anexo 3: Tabela IX). Como consequência desta resposta, a ASC do cortisol plasmático não diferiu entre os grupos (Figura 8, Anexo 3: Tabela VIII).

Os níveis de GH plasmático (ng/mL) durante as 24 horas do estudo mostraram variações semelhantes nos dois grupos e em ambos não pudemos observar a elevação de seus níveis com a fase de sono profundo (Figura 11 e 12, Anexo 3: Tabela X). Tal resultado determinou ASC não diferente entre os grupos (Figura 8, Anexo 3: Tabela VIII).

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos participantes dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e com tolerância à glicose diminuída (TGD).

Características	Grupo		P
	TGN	TGD	
N	18	15	
Sexo (F/M)	14/4	13/2	
Idade (anos)	44 ± 9	42 ± 14	NS
História Familiar de DMT2 (%)	44,4	26,7	NS
IMC (kg/m ²)	27,0 ± 3,4	26,8 ± 3,9	NS
C/Q	0,80 ± 0,10	0,80 ± 0,10	NS
PA sistólica (mmHg)	113 ± 9	116 ± 14	NS
PA diastólica (mmHg)	74 ± 8	73 ± 10	NS
Colesterol (mg/dL)	208 ± 51	193 ± 44	NS
HDL-colesterol (mg/dL)	55 ± 22	49 ± 10	NS
LDL-colesterol (mg/dL)	121 ± 43	118 ± 41	NS
Triglicérides (mg/dL)	148 ± 63	129 ± 55	NS
AGL jejum (mmoL/L)*	1,50 ± 0,60	0,98 ± 0,50	<0,05
Glicose jejum (mg/dL)*	87 ± 9	98 ± 9	< 0,005
Insulina específica jejum (pmoL/L) [†]	83 ± 45	71 ± 58	NS
Pró-Insulina intacta jejum (pmol/L)[†]	3,0 ± 1,4	5,0 ± 1,1	<0,05
Glicose 2h-TOTG (mg/dL)	102 ± 19	165 ± 14	<0,001

Valores expressos como média ± desvio padrão; NS: Não Significativo; IMC: Índice de Massa Corporal; C/Q: Cintura/Quadril; PA: Pressão Arterial; TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose; DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2. AGL: ácidos graxos livres sérico.

*: 4 medidas

†: 2 medidas

Tabela 2. Razões entre a área sob a curva (ASC) da insulina específica (pmoL/L) e da glicose (mmoL/L) plasmáticas, e da pró-insulina intacta e da glicose (mmoL/L) plasmáticas e da pró-insulina intacta (pmoL/L) e da insulina específica (pmoL/L) plasmáticas dos três períodos pós-prandiais: café, almoço e jantar, segundo os grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD).

ASC	Grupo	Período		
		Café (8-12 h 00)	Almoço (12-18 h 00)	Jantar (18 -22 h 00)
Insulina/Glicose	TGN	43 ± 13 ^a	35 ± 13 ^a	45 ± 19 ^a
	TGD	34 ± 7 ^a	29 ± 8 ^a	38 ± 10 ^a
P		>0,05	>0,05	>0,05
Pró-Insulina/Glicose	TGN	1,6 ± 0,8 ^a	1,8 ± 1,0 ^a	1,9 ± 0,9 ^a
	TGD	2,0 ± 0,7 ^a	2,7 ± 0,6 ^a	3,1 ± 1,1 ^a
P		>0,05	>0,05	>0,05
Pró-Insulina/Insulina	TGN	0,04 ± 0,02 ^a	0,05 ± 0,03 ^a	0,04 ± 0,02 ^a
	TGD	0,07 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,03 ^b	0,08 ± 0,03 ^b
P		<0,05	<0,05	<0,05

Valores expressos como mediana ± semi-amplitude interquartílica; pelo menos uma letra diferente é significativo

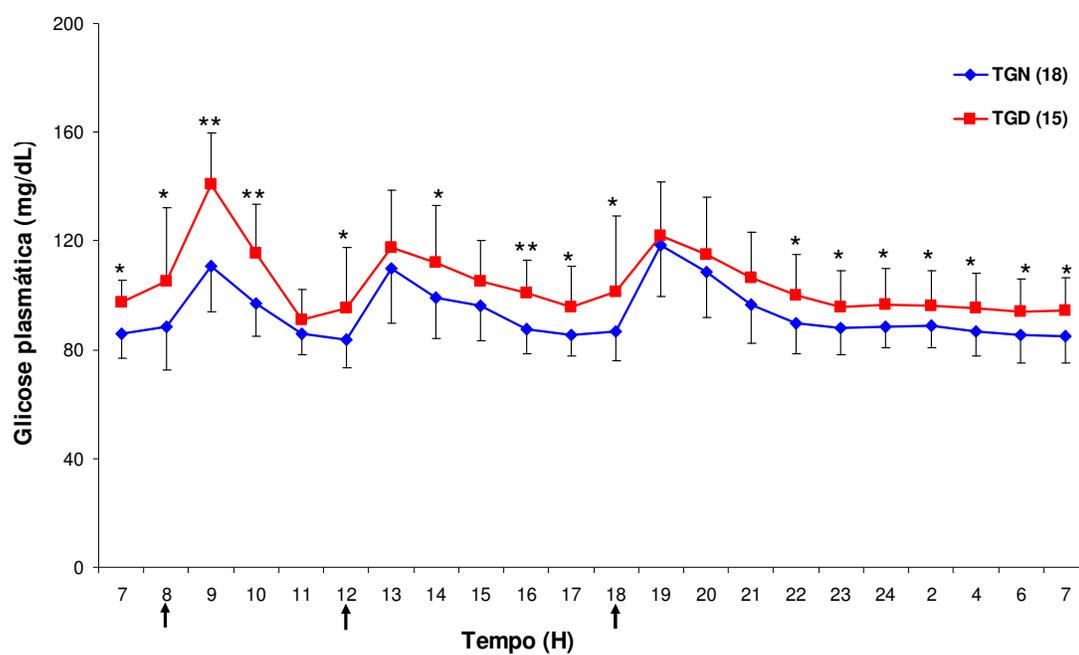


Figura 1. Glicose plasmática (mg/dL) durante 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores são expressos como média \pm desvio padrão; *P<0,05, **P<0,001; \uparrow horário das refeições.

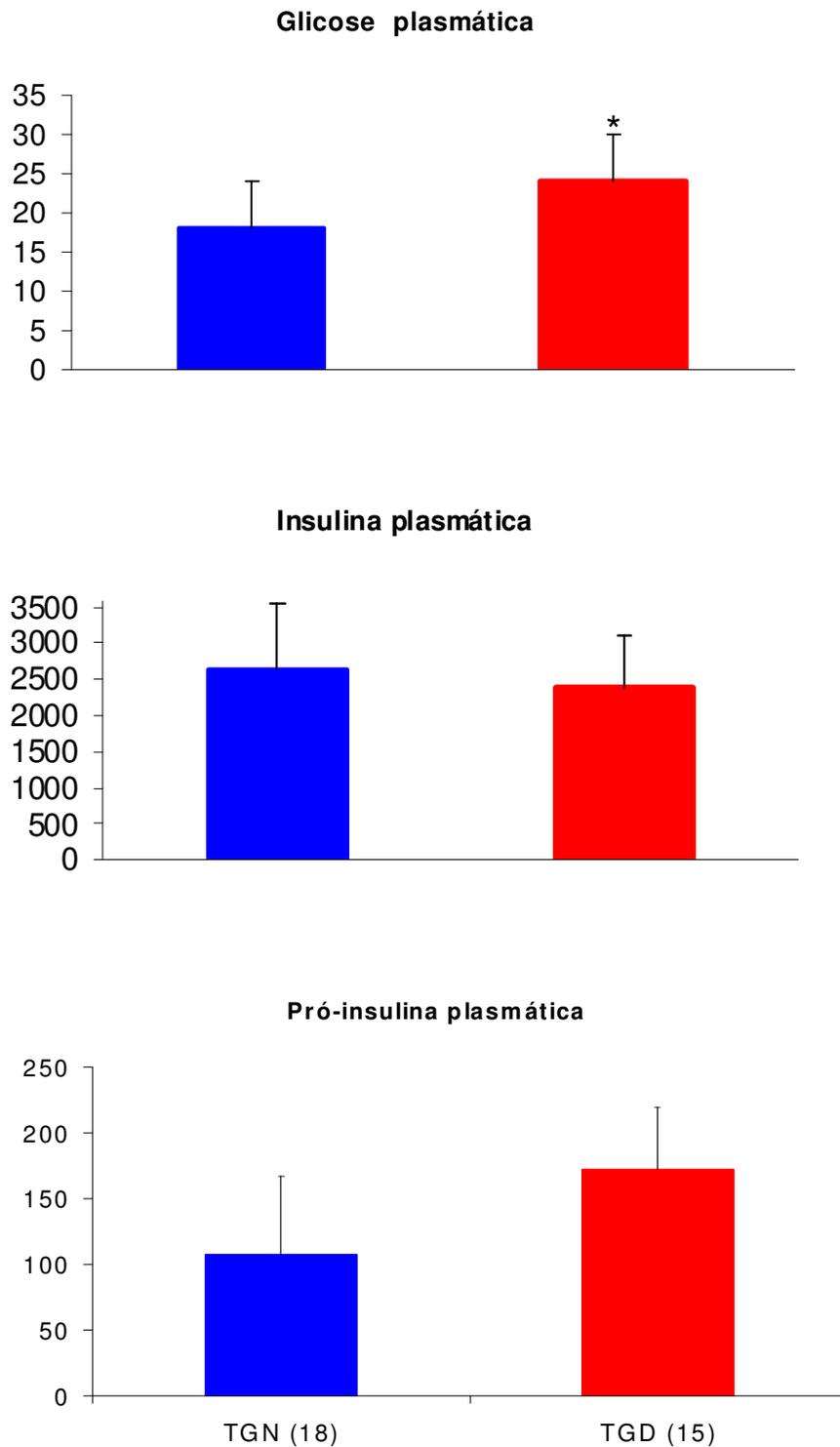


Figura 2. Área incremental sob a curva da glicose ($\text{mg.dL}^{-1}.\text{h}$), insulina específica ($\text{pmoL.L}^{-1}.\text{h}$) e pró-insulina intacta ($\text{pmoL.L}^{-1}.\text{h}$) plasmáticas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica; * $P < 0,05$.

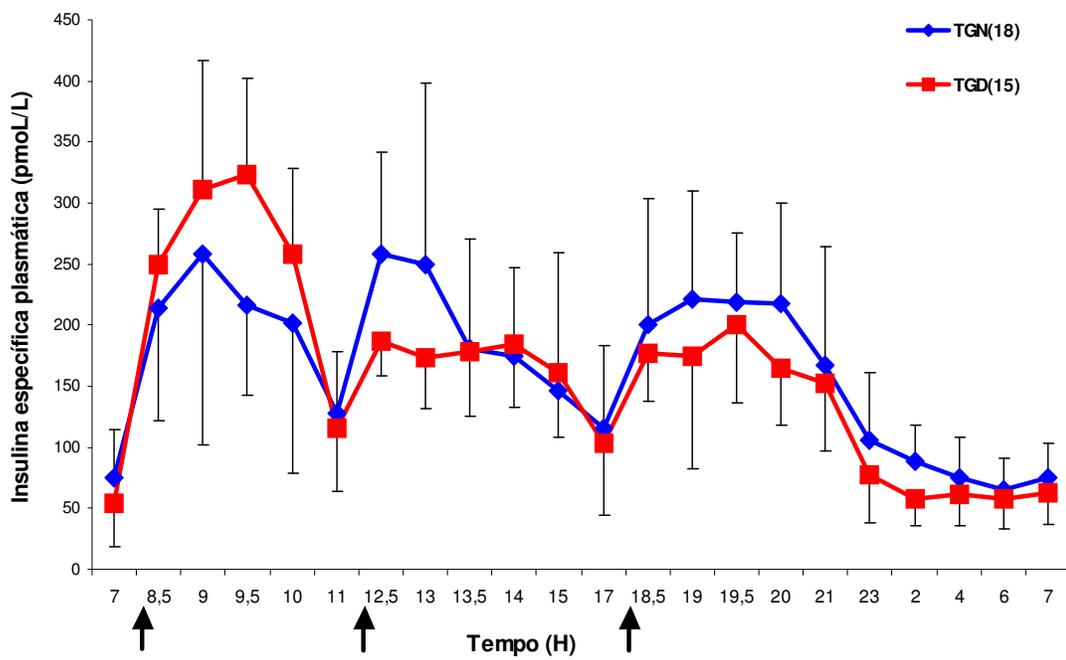


Figura 3. Insulina específica plasmática (pmol/L) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores são expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica; \uparrow horário das refeições.

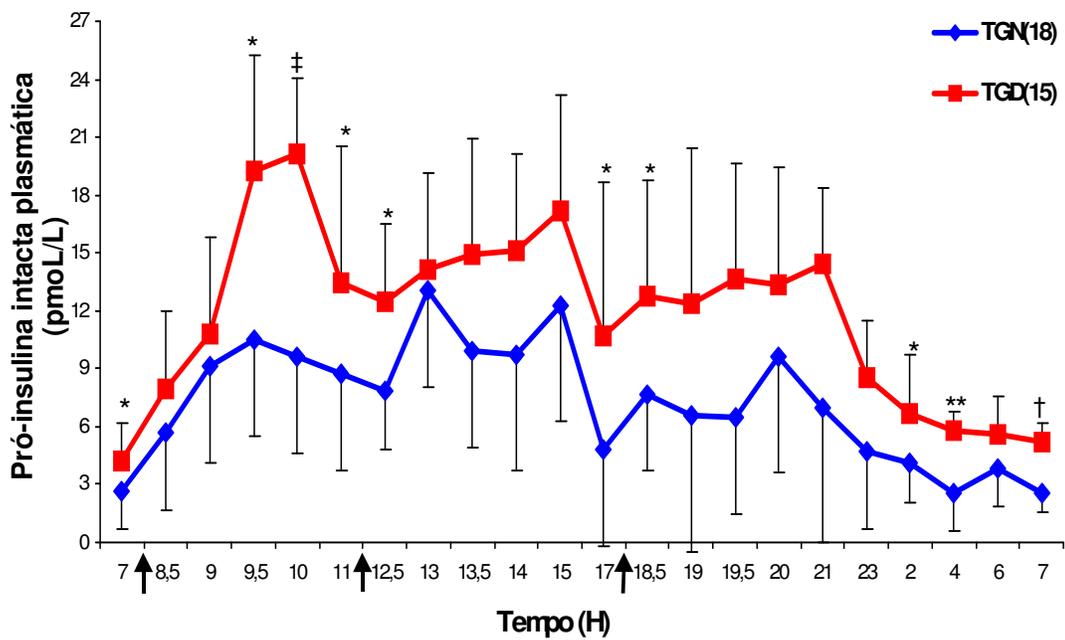


Figura 4. Pró-insulina intacta plasmática (pmol/L) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores são expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, † $P < 0,005$, ‡ $P < 0,001$; ↑ horário das refeições.

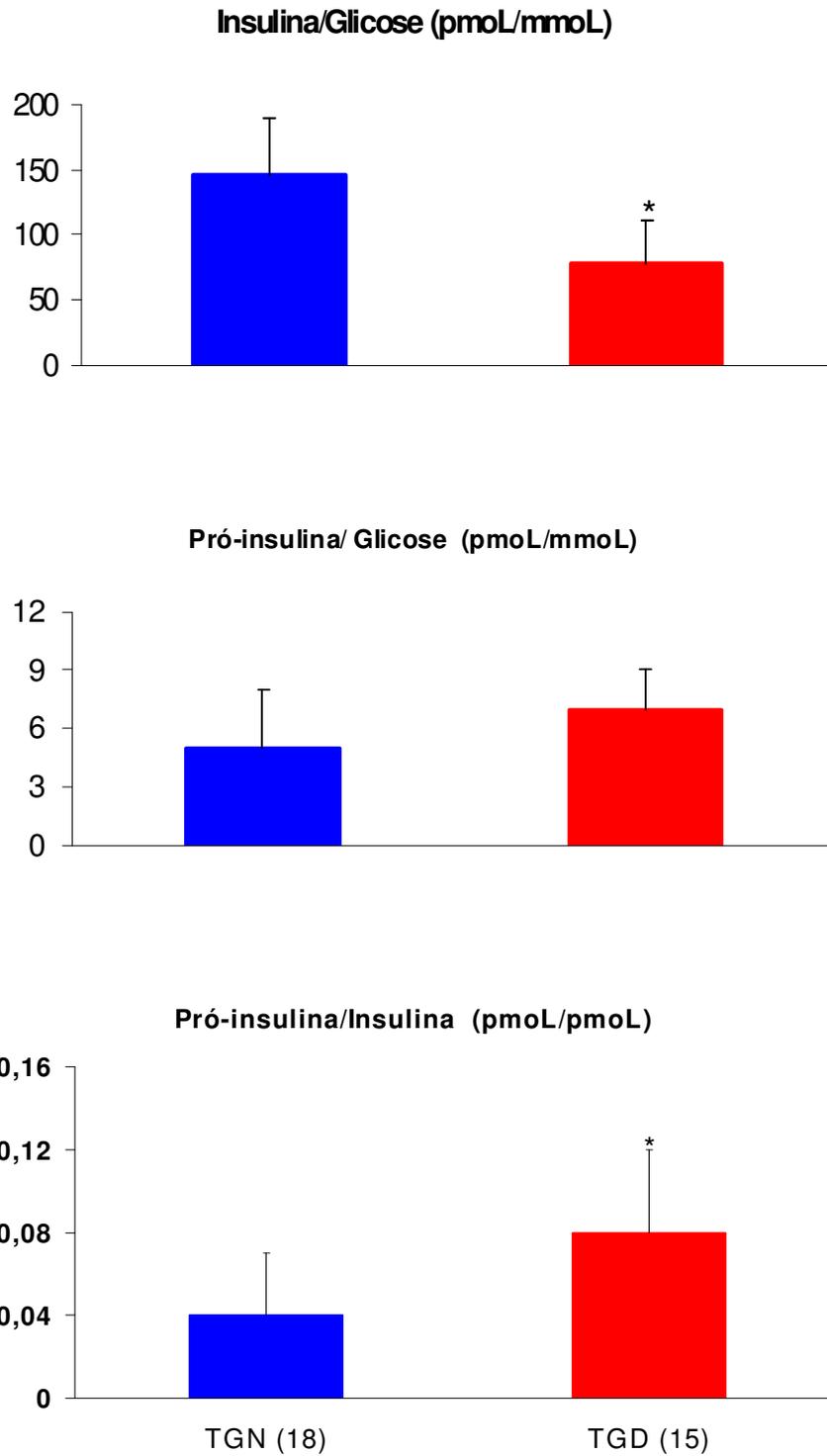


Figura 5. Razões entre as áreas incrementais sob a curva da glicose, insulina específica e pró-insulina intacta plasmáticas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica; *P<0,05.

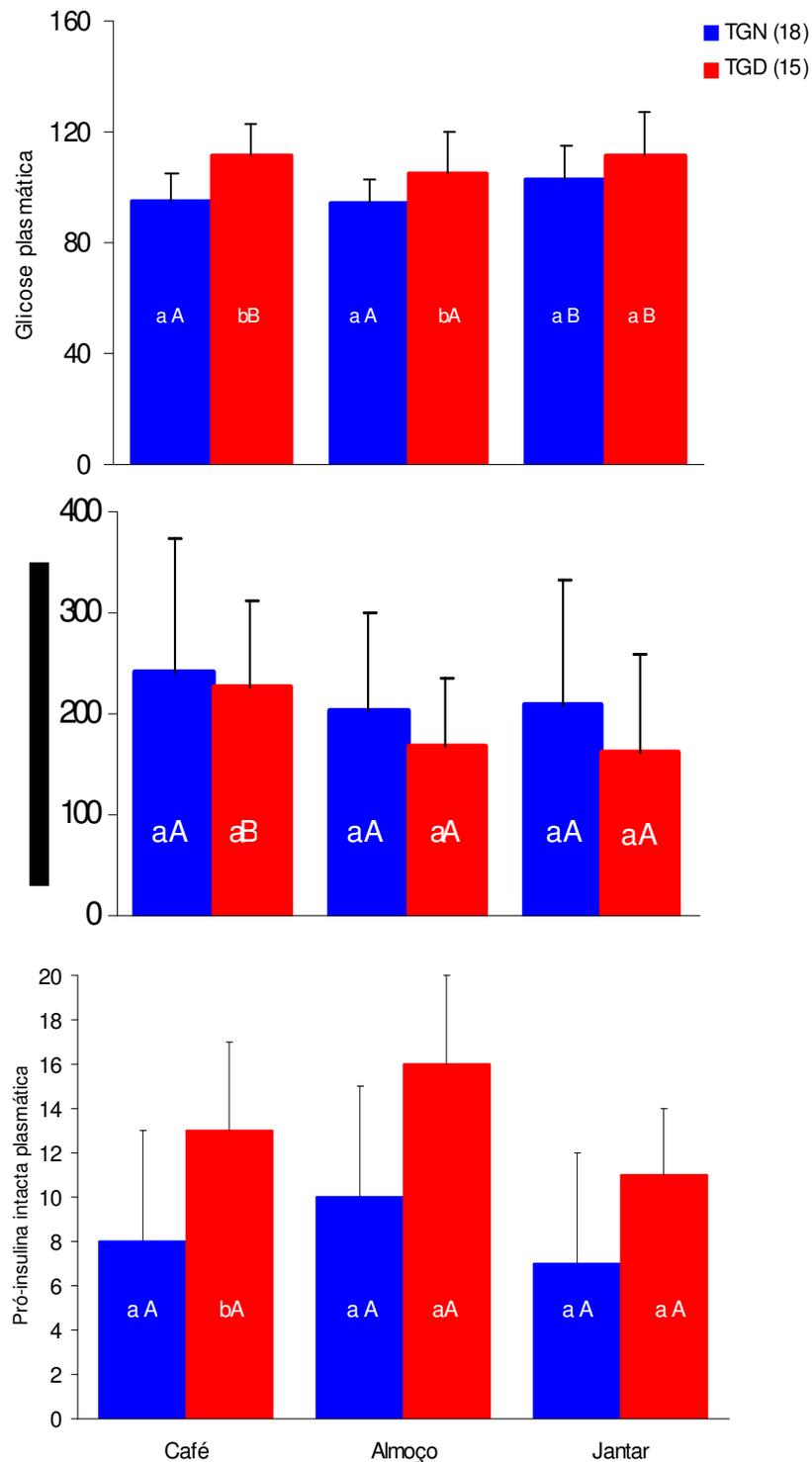


Figura 6. Área sob a curva horária da glicose* (mg.dL⁻¹.h), insulina específica* (pmoL.L⁻¹.h) e pró-insulina intacta** (pmoL.L⁻¹.h) plasmáticas de cada período pós-prandial: café, almoço e jantar segundo os grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores expressos como média ± desvio padrão (*) ou mediana ± semi-amplitude interquartilica (**); letras minúsculas: comparação dos períodos entre os grupos; letras maiúsculas: comparação dos períodos intra-grupo; pelo menos uma letra diferente é significativo.

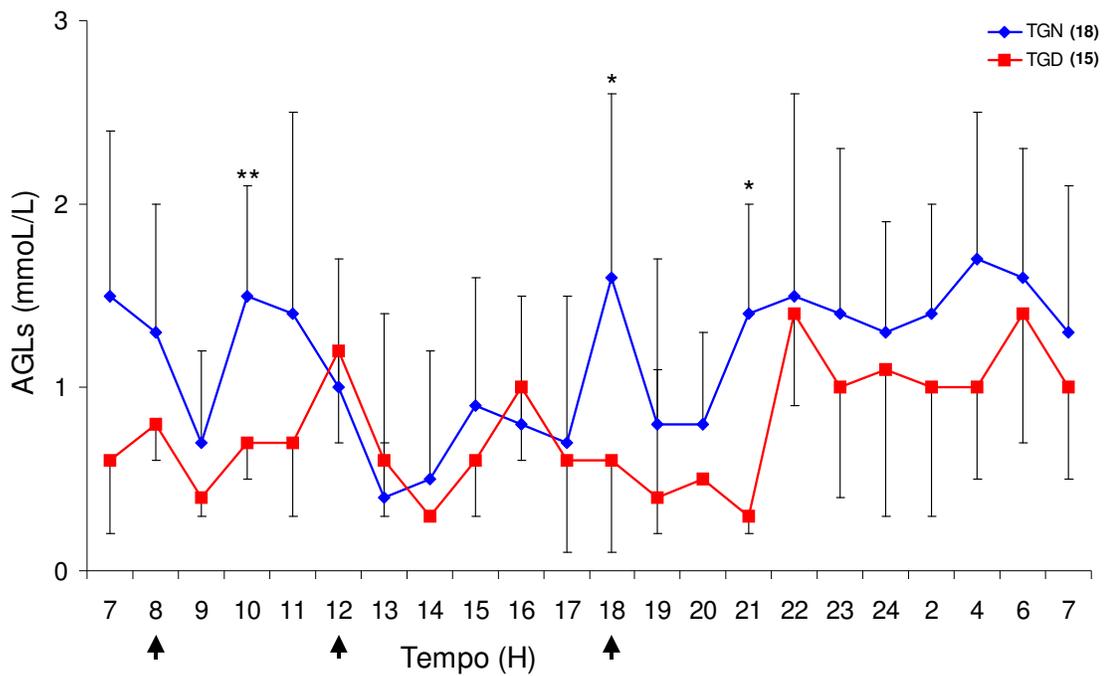


Figura 7. Valores dos ácidos graxos livres (AGLs) séricos durante as 24 horas dos indivíduos dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores são expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartilica; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; \uparrow horário das refeições.

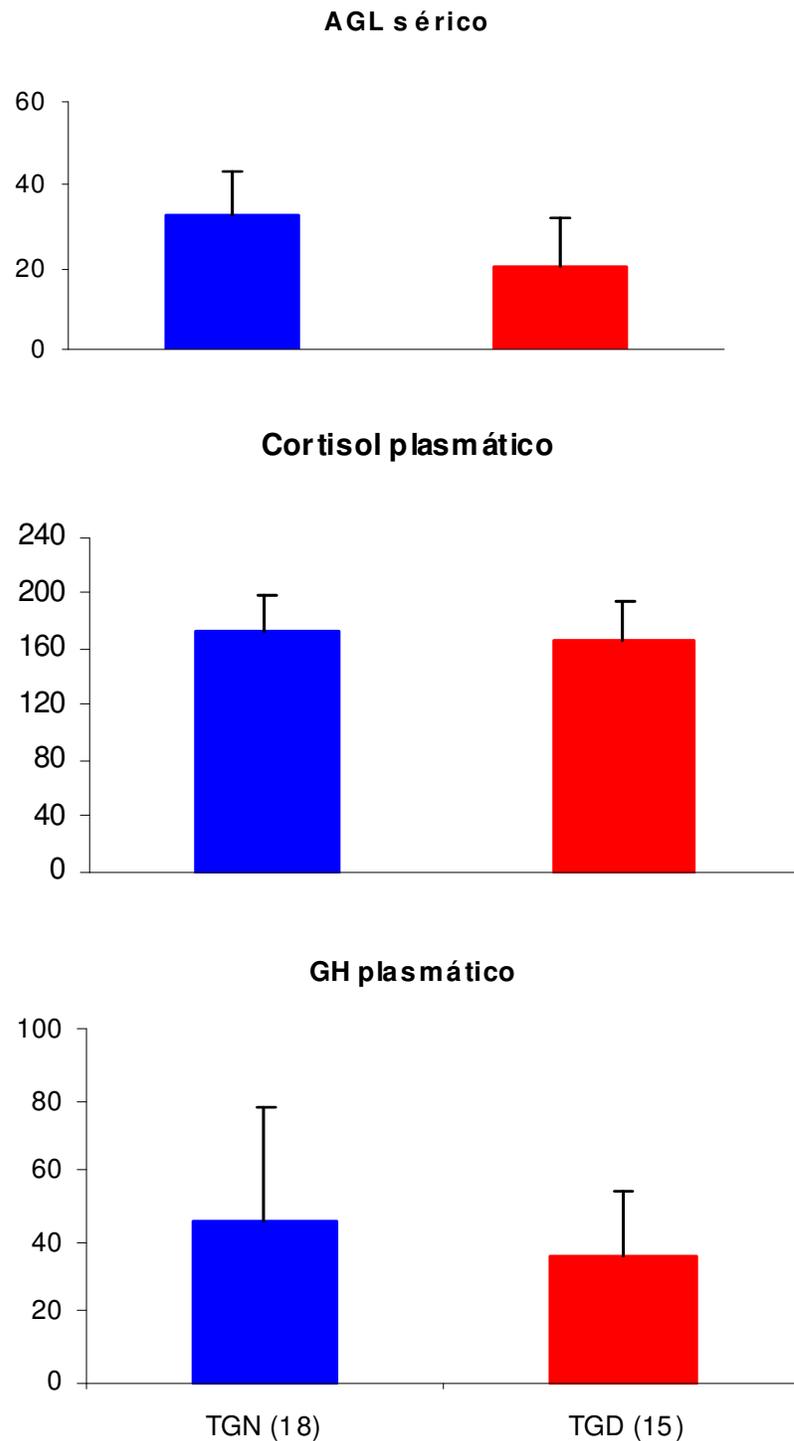


Figura 8. Área total sob a curva de ácidos graxos livres (AGLs) séricos (mmoL.L⁻¹.h), cortisol (µg.dL⁻¹.h) e hormônio de crescimento (GH) (ng.mL⁻¹.h) plasmáticos durante o período de 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores expressos como mediana ± semi-amplitude interquartílica.

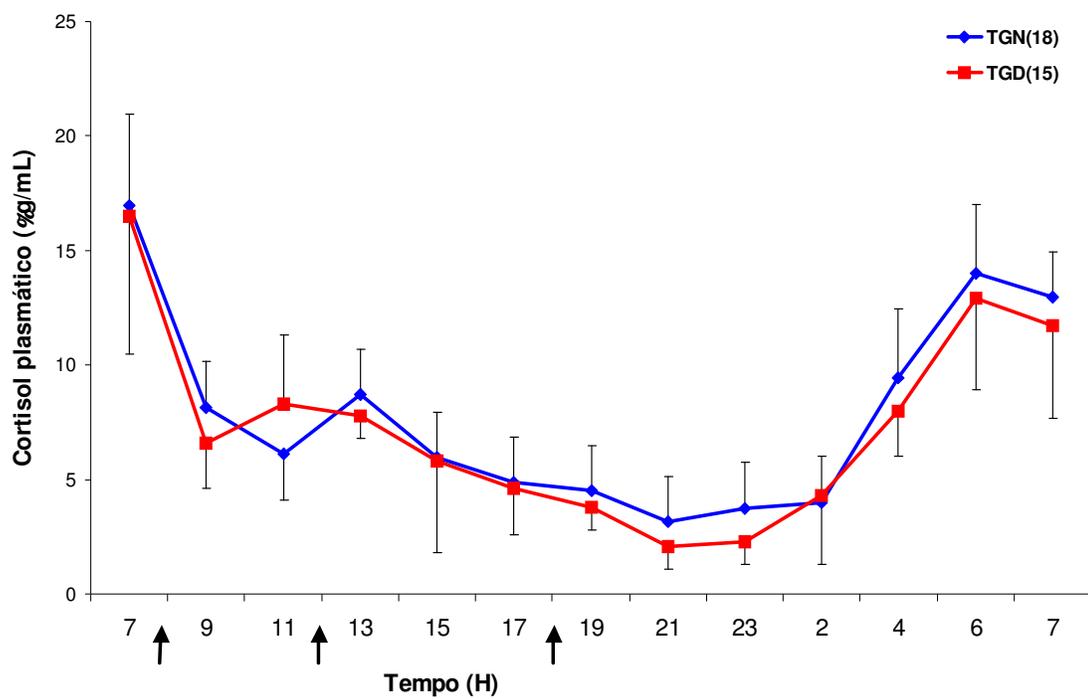


Figura 9. Cortisol plasmático ($\mu\text{g/dL}$) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores são expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica; \uparrow horário das refeições.

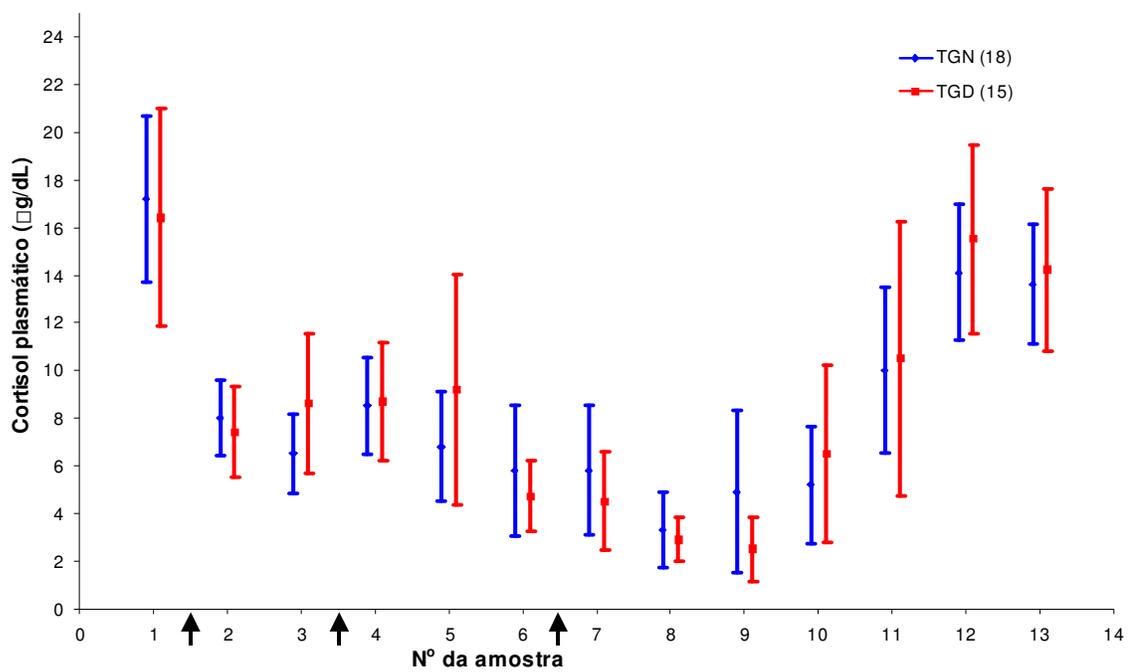


Figura 10. Comparação dos valores do Cortisol plasmático ($\mu\text{g/dL}$) entre os limites de confiança de cada amostra, durante as 24 horas, dentro e entre os grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartilica; \uparrow horário das refeições.

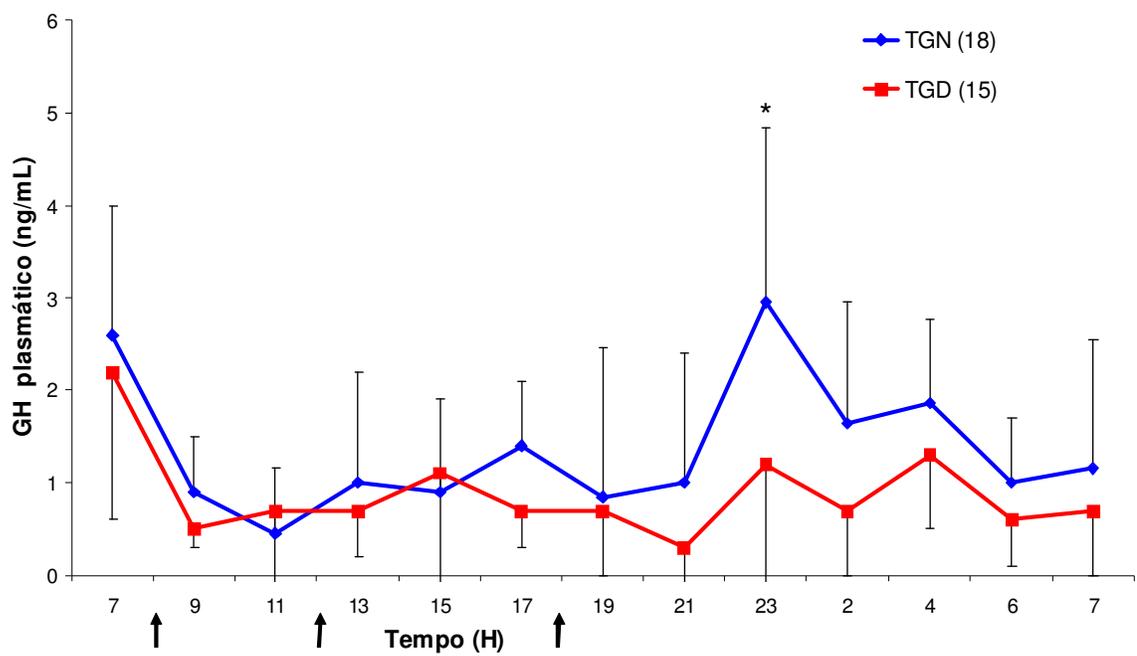


Figura 11. Hormônio do crescimento (GH) plasmático (ng/mL) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica; * $P < 0,05$; \uparrow horário das refeições.

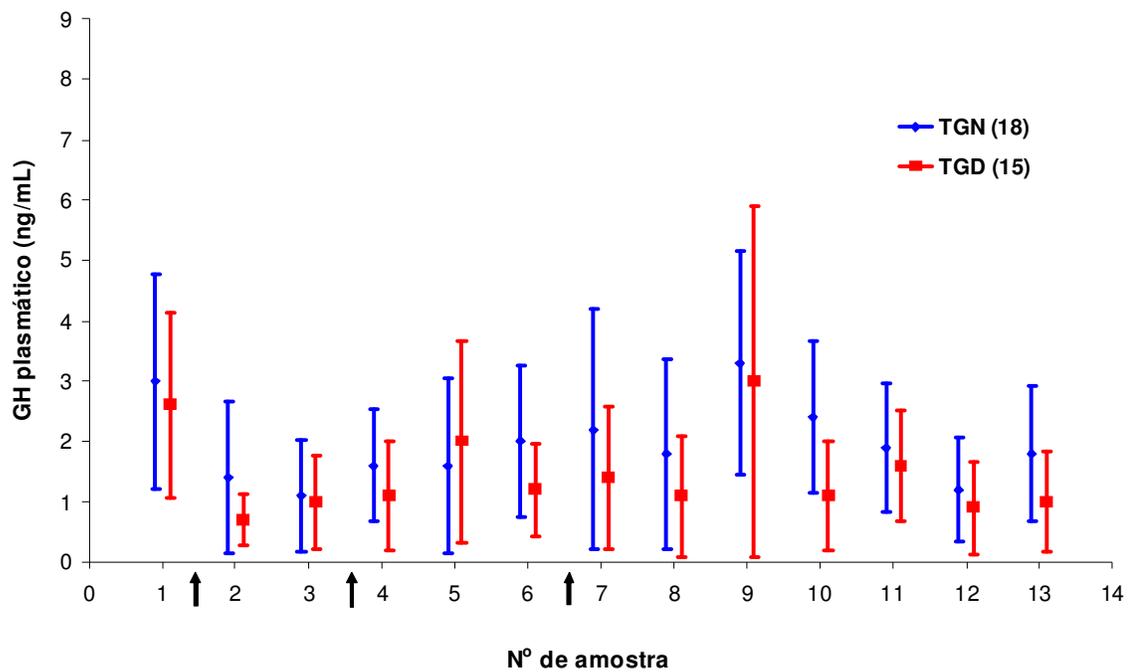


Figura 12. Comparação dos valores do hormônio de crescimento (GH) plasmático (ng/mL) entre os limites de confiança de cada amostra, durante as 24 horas, dentro e entre os grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD). Valores expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica; \uparrow horário das refeições.

Discussão

Nosso objetivo foi avaliar se no estágio intermediário de TGD está presente a inversão da variação diurna da tolerância à glicose, como ocorre no DMT2 (57,58,62,79,80).

Para tal selecionamos entre os voluntários aqueles com TGD e sem as comorbidades que costumam a ela se associar (121) ou se presentes, ocorrerem em pequeno número e grau de expressão. Ainda, estando bem estabelecida a inter-relação da função das células β e da sensibilidade à insulina (122) e sendo possível alteração da variação diurna da tolerância à glicose na obesidade (14), buscamos o melhor pareamento possível entre estes indivíduos e aqueles com TGN, que constituiriam o grupo controle.

Obtivemos assim, dois grupos semelhantes na maioria dos parâmetros avaliados e caracterizados por: predominância do sexo feminino, idade média, sobrepeso sem predomínio da gordura abdominal, normotensos e pequena elevação dos níveis séricos de colesterol.

Deve-se destacar neste ponto que ambos os grupos também não diferiam quanto aos valores basais de insulina específica plasmática, que são considerados índice de resistência à insulina (106,109).

A maior frequência de parentes em primeiro grau com DMT2 seria esperada nos indivíduos com TGD por ser o DMT2 doença de origem genética, geralmente poligênica (123) e o estágio de TGD, considerado intermediário na evolução da TGN para o DMT2. O grupo TGD estudado, todavia, não diferiu do TGN provavelmente, porque os indivíduos com TGN que se interessaram em participar do estudo foram principalmente aqueles com presença de história familiar de DMT2. Assim, o grupo TGN não foi o grupo controle a que buscamos inicialmente, pois em indivíduos com TGN e parentes em 1º com DMT2 bem pareados com indivíduos sem história familiar foi demonstrada deficiência de secreção de insulina (123). Todavia, dois fatores são atenuantes: 1) em indivíduos de nossa população com parentes em primeiro grau com DMT2 e comprovadamente com TGN não observamos nenhum dos dois defeitos básicos do DMT2, isto é, deficiência de secreção e ação da insulina (124); 2) alteração da variação diurna da tolerância à glicose deve ser distúrbio mais tardio naqueles que evoluem para o DMT2.

Por outro lado, os dois grupos eram dissemelhantes apenas quanto a quatro parâmetros.

De acordo com o critério de classificação de tolerância à glicose utilizado (85), o grupo TGD necessariamente apresentou glicemia de 2 h após a carga oral de 75 g de glicose mais elevada que a do grupo TGN. Embora a glicemia de jejum estivesse abaixo de 100 mg/dL em 53% dos indivíduos com TGD, foi significativamente mais elevada que a dos indivíduos com TGN, como ocorre frequentemente.

É difícil explicar os valores basais de AGLs séricos aumentados nos participantes com TGN. O esperado é que ambos os grupos não diferissem quanto a este parâmetro uma vez que seguiram o mesmo protocolo de estudo e elevação das concentrações de AGL em jejum, por menor inibição da lipólise pela insulina, só foi observada em diabéticos tipo 2 não obesos e com hiperglicemia mais severa (73,125), além de em indivíduos obesos diabéticos (126,127) ou não (128).

Em indivíduos com DMT2, há elevação dos níveis circulantes de pró-insulina intacta e de seu metabolito 32-33 pró-insulina, relacionada com o grau da hiperglicemia e observada em diferentes grupos étnicos (81,107,110,129-133). Esta secreção aumentada de pró-insulina em detrimento da de insulina é considerada

resultado, fundamentalmente, de disfunção das células β associada à maior demanda de secreção pela hiperglicemia (134). Nosso resultado de o grupo com TGD apresentar concentração basal de pró-insulina intacta plasmática significativamente mais elevada que o grupo TGN foi observado previamente em nossa população (107) e em outros grupos populacionais (81,106,133). Interessantes foram os resultados relatados por Kahn *et al.* (110) em americanos de origem japonesa acompanhados por cinco anos e por Nippels *et al.* (109) em grupo com aumentado risco para o DM2, participantes do Hoorn Study e acompanhados por dois anos. Valores aumentados de pró-insulina plasmática de jejum foi uma das alterações que sinalizaram progressão da TGD para o DM2. A observação de secreção aumentada de pró-insulina em condições basais, na ausência de hiperglicemia e de maior resistência à insulina (pareamento adequado dos grupos), sugere defeito intrínseco e precoce das células β na provável evolução para o DM2.

Indivíduos com TGD, pareados com aqueles com TGN e não tendo outras comorbidades (comuns neste estágio), apresentaram alterações do metabolismo da glicose durante um dia habitual com as três refeições básicas e o período noturno de sono.

O ciclo de 24 h de um dia habitual pode ser dividido em dois períodos: o diurno, das 7/8h às 22/23h e compreendendo os três períodos pós-prandiais, alvos do estudo e que serão considerados posteriormente; o noturno, abrangendo as nove horas seguintes de sono. Neste segundo período, observamos queda inicial com estabilidade a seguir das concentrações plasmáticas de glicose, insulina específica e pró-insulina intacta em ambos os grupos, sendo as de glicose e pró-insulina significativamente mais elevadas no TGD. O estudo não teve como objetivo observar o fenômeno do alvorecer. Assim, durante o período de jejum noturno, os indivíduos com TGD apresentaram provavelmente uma maior produção endógena de glicose, por pelo menos em parte, uma secreção desproporcionalmente aumentada de pró-insulina em relação à de insulina e secreção de insulina relativa às concentrações glicêmicas diminuída. É conhecido que a pró-insulina tem somente 5-10% da atividade metabólica da insulina (133).

A análise comparativa da resposta global (24 h) da glicose, insulina específica e pró-insulina intacta plasmáticas entre os grupos TGD e TGN permitiu constatar também a presença de dois defeitos principais no TGD, que caracterizam esta fase de intolerância à glicose. Ambos os grupos apresentaram resposta incremental de 24 h da insulina específica plasmática semelhante associada à resposta incremental glicêmica aumentada nos indivíduos com TGD, o que causou a razão entre ambas respostas 1,85 vezes menor nestes indivíduos em relação àqueles com TGN. Estes resultados são indicativos de resposta β -celular diminuída ao estímulo glicêmico nos participantes com TGD. Segundo, o grupo TGD apresentou uma resposta incremental total - envolvendo períodos de jejum e pós-prandiais - de pró-insulina intacta plasmática duas vezes maior que a de insulina específica plasmática em relação à mesma razão apresentada pelo grupo TGN. Então, os indivíduos com TGD caracterizaram-se também por uma resposta β -celular desproporcionada de pró-insulina relativa à de insulina.

Em indivíduos obesos, Genuth (135) também observou que os com TGD apresentavam níveis glicêmicos basais e pós-refeições mais elevados e acompanhados de valores de insulina plasmática semelhantes aos daqueles com TGN.

Na fase de TGD, precedente à de DMT2, encontramos, então, hiperglicemia após as refeições básicas e resposta insulínica inapropriadamente normal como já observadas em diabéticos não obesos (136) e em diabéticos tipo 2 (72).

Além dos distúrbios da função β -celular apresentados pelo grupo TGD durante as 24 h de um dia habitual, às refeições mistas a resposta insulínica foi monofásica, sugerindo ausência da 1ª fase de secreção. É bem conhecido que este é um dos defeitos mais precoces das células β -pancreáticas, determinante da hiperglicemia pós-prandial (101) e verificado por diferentes metodologias e em diversos grupos populacionais nos indivíduos com TGD (96-98,104).

Qualitativamente, a resposta insulínica entre os grupos TGD e TGN mais se diferenciou após o café e mais se assemelhou após o jantar. O café da manhã estimulou a liberação bifásica, bem definida, de insulina pelos indivíduos TGN e um pico secretório 30 minutos mais tardio nos indivíduos TGD. Ao almoço, continuou a ocorrer uma resposta insulínica bifásica apenas nos TGN. Por outro lado, o jantar provocou resposta insulínica monofásica em ambos os grupos. Esta menor diferença entre os grupos com o correr do dia é conseqüente a uma deterioração da função β -celular nos indivíduos TGN, devido à provável falta do efeito restaurador das células β pelo período de repouso noturno (72).

Está bem estabelecido haver uma secreção β -celular desproporcionada de pró-insulina em relação à de insulina no DMT2, em condições basais e aos estímulos, por disfunção das células β (134). Na população japonesa, diabéticos tipo 2 não obesos apresentaram correlação positiva entre resposta de insulina e pró-insulina a uma carga oral de glicose, como os indivíduos com TGN, mas naqueles a inclinação da reta desviava-se para a esquerda (81). Demonstraram assim, de forma bem clara, uma secreção desbalanceada pelas células β . Em índios Pima, Saad et al. (133) observaram que a hiperglicemia era determinante da elevação da razão pró-insulina/insulina nos com DMT2 enquanto nos com obesidade simples, a resistência à insulina causava diminuição da mesma razão. Desta verificação depreende-se a importância de na avaliação da secreção de insulina pelas células β em indivíduos com qualquer grau de intolerância à glicose utilizar-se de ensaios específicos (132). O valor duas vezes maior da razão entre a resposta total acima dos níveis basais, durante um dia habitual, da pró-insulina e insulina plasmáticas, nos participantes com TGD comparativamente àqueles com TGN é comparável ao de uma vez e meia e três vezes para indivíduos japoneses com TGD e DMT2, respectivamente, em relação aos indivíduos com TGN, em resposta à ingestão de 100 g de glicose, verificados por Yoshioka et al. (81). Vários outros estudos, envolvendo grupos populacionais brasileiro e de outras etnias, também observaram que a secreção desproporcionada de pró-insulina em relação à de insulina é defeito precoce, encontrado já na fase de TGD (106-108).

Assim, além de os indivíduos classificados como TGD o terem sido com base em dois TOTGs em 54% do grupo, apresentaram distúrbios metabólicos próprios deste estágio de intolerância à glicose: curva glicêmica

mais elevada; níveis insulínêmicos baixos em relação aos glicêmicos; níveis de pró-insulina elevados em relação aos de insulina; provável ausência da 1ª fase da secreção insulínica.

No grupo de indivíduos com TGD bem estabelecida, sem comorbidades e bem pareados com indivíduos com TGN buscamos, então, verificar se havia alteração da variação diurna da tolerância à glicose em condições próximas das fisiológicas.

A análise da resposta da glicose, insulina e pró-insulina plasmáticas às três refeições, expressa como ASC_{G} , nos indivíduos TGN mostra que a glicemia se elevou mais após o jantar e foi acompanhada de aumento semelhante da insulina e da pró-insulina aos das duas refeições precedentes. Tais resultados sugerem uma menor resposta β -pancreática à refeição mista no final do período diurno. Outro dado a ser observado é o café, contendo a metade do conteúdo calórico do almoço e do jantar, ter estimulado igual resposta β -celular. A menor tolerância à glicose no final do período diurno foi previamente relatada por vários autores, às refeições mistas (27,29) e a diferentes estímulos glicêmicos (14,80). Tal resposta é agravada pelo maior conteúdo calórico e de carboidratos e pelo horário mais tardio de ingestão da última refeição (27,29) e causada por uma menor função das células β (26,27,29,72). Esta seria devido à variação circadiana da responsividade das células β à ingestão de uma refeição ou à necessidade das células β terem que resintetizar a insulina, pois não mais haveria a influência da secreção de insulina pós-café como ocorreria após o almoço (26,35). Pelo contrário, a maior resposta relativa de insulina após o café poderia ter como causas: a menor sensibilidade à insulina; a variação circadiana da responsividade das células β aos estímulos; a capacidade de as células β se refazerem durante o período noturno de jejum, estando em melhores condições de resposta ao estímulo glicêmico (26,35).

Nos indivíduos TGD, como nos TGN, o jantar determinou uma maior elevação glicêmica que o almoço sem uma maior resposta insulínica. Todavia, diferentemente dos com TGN, o café provocou elevação glicêmica semelhante à do jantar associada à maior resposta insulínica. Considerando-se que o café é a menor refeição e que provavelmente estejam presentes os três fatores referidos para os indivíduos com TGN, conclui-se haver resistência à insulina e déficit relativo de secreção de insulina. Em diabéticos tipo 2, foi observada inversão do ritmo diurno da tolerância à glicose, com melhora da manhã para o início da noite, seja ao estímulo com refeições mistas (72), seja com infusão controlada de glicose (58,62,79) associada a aumento da sensibilidade à insulina com o evoluir do dia. Administrando o TOTG às 9h30 e às 16h30 a indivíduos nas três categorias de tolerância à glicose: TGN, TGD e DMT2, Jarrett & Keen (20) observaram diminuição da tolerância à tarde nos dois primeiros grupos e desaparecimento desta variação nos com DMT2. Assim, nos indivíduos com TGD que estudamos, observaram-se pela manhã alterações próprias do DMT2 e ao final do período diurno alterações próprias de indivíduos com TGN.

Na comparação entre os grupos TGD e TGN, observamos resposta glicêmica mais elevada após o café e o almoço nos primeiros e semelhante após o jantar, esta, provavelmente, pela diminuição da tolerância à glicose no final do dia ocorrida igualmente nos dois grupos. A maior resposta glicêmica após as duas primeiras refeições nos indivíduos TGD foram acompanhadas de respostas insulínicas semelhantes às dos com TGN, o que sugere secreção β -pancreática inapropriadamente normal. Todavia, a razão entre a ASC da insulina e da glicose plasmáticas foi menor

no grupo TGD, sem atingir significância. Em indivíduos com DMT2, comparativamente ao grupo controle, observou-se maior elevação glicêmica às três refeições acompanhada de resposta insulínica semelhante, e portanto, inapropriadamente normal (72,136). A função β -celular foi avaliada nestes indivíduos, por simples medida da concentração plasmática da insulina (135) ou por método mais elaborado envolvendo o cálculo da taxa de secreção de insulina com base na cinética do peptídeo C (72). Os mesmos achados relativos aos portadores de DMT2 foram observados por Genuth (135) em indivíduos com TGD e obesidade, em resposta às três refeições básicas. A maior resposta glicêmica após o café apresentada pelo grupo TGD foi associada à maior resposta β -celular de pró-insulina, sem diferença quanto à de insulina, o que determinou uma resposta β -pancreática desproporcionada. Resposta esta, que foi observada também após o almoço e o jantar e é distúrbio precoce da função β -celular bem observado por Yoshioka *et al.* (81) em indivíduos com TGD e DMT2 ao TOTG e já bem estabelecido nos estados de intolerância à glicose (101,134).

No DMT2, a deficiência de secreção e de ação da insulina causa lipólise aumentada e, então, maior oxidação dos AGLs liberados pelos tecidos. A oxidação dos AGLs estimula a neoglicólise e acarreta menor oxidação da glicose (ciclo de Randle) contribuindo para a hiperglicemia (73,137,138). Por outro lado, os tecidos respondem às ações metabólicas da insulina com diferentes graus de sensibilidade, sendo a inibição da lipólise uma das mais sensíveis (139). Assim, em diabéticos tipo 2 não obesos e moderadamente hiperglicêmicos - glicemia de jejum menor que 175 mg/dL (73) ou 151 mg/dL (125) - não foi observada elevação dos níveis de AGL sérico e nem da oxidação dos mesmos em condições basais (125). Às refeições (73) e ao estímulo com insulina - clamp euglicêmico (125) houve supressão adequada dos valores de AGLs séricos. Com base nestes dados, podemos justificar a semelhança observada entre a curva e a ASC de AGLs séricos dos indivíduos com TGD e TGN, não obesos e pareados quanto aos índices demográficos.

Como seria esperado, em ambos os grupos observamos no período de 24 h de estudo o ritmo circadiano clássico do cortisol. Em estudo semelhante ao nosso, mas envolvendo apenas indivíduos saudáveis Malherbe *et al.* (26) também observaram a variação circadiana do cortisol. Os estudos que buscaram verificar a presença do fenômeno do alvorecer em indivíduos saudáveis (33,34,37,140) e em pacientes com DMT2 (59,62,69,71-74,76) observaram sempre o ritmo circadiano do cortisol, que não se relacionou com as alterações metabólicas ocorridas no período noturno.

Em ambos os grupos estudados, os níveis plasmáticos de GH foram oscilantes durante as 24 h, não se observando picos relacionados com as refeições (141) e com as fases iniciais do sono profundo (37,142). Em grande parte, tal se deveu a não termos feito dosagens mais frequentes deste hormônio. Também os grupos não diferiram quanto à quantidade total de GH secretada em 24 h. A elevação da concentração plasmática de GH na primeira parte da noite foi considerada pelo grupo de Bolli (33,67,143) responsável pelo fenômeno do alvorecer, isto é, resistência hepática à insulina que causa hiperglicemia no início da manhã, e observado em indivíduos com TGN e diabéticos, principalmente nos de tipo 1. As variações noturnas da secreção de GH parecem ser uma função hipotalâmica (142), que alguns autores relacionaram com as alterações metabólicas deste período (140) e outros, em

maior número, não (34,37,142). Desconhecemos dados que justificariam alteração da secreção de GH em indivíduos com TGD.

Então, não podemos explicar as diferenças na variação diurna da tolerância à glicose e no metabolismo da glicose durante 24 h, entre o grupo TGD e o TGN por alterações dos valores sanguíneos de AGLs, cortisol e GH.

Conclusões

Em indivíduos com TGD bem caracterizados e estudados em condições próximas das fisiológicas observamos variação diurna da tolerância à glicose composta daquela descrita em pacientes com DM2 em em indivíduos com TGN.

Estes achados não puderam ser explicados por alterações das concentrações de AGL sérico, nem das de cortisol e GH plasmáticos.

Este estudo precisaria ser ampliado, podendo contribuir para a conduta médica nesta fase de pré-diabetes.

Resumo

Em indivíduos saudáveis sob diferentes estímulos glicêmicos, ficou demonstrada diminuição da tolerância à glicose da manhã para o final da tarde. Esta variação ocorreria por diminuição da secreção e sensibilidade insulínicas, com comprovada diminuição da utilização esplâncica e periférica de glicose. Em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), foi observada inversão do ritmo da tolerância à glicose, isto é, menor pela manhã com melhora ao final da tarde, acompanhada da respectiva variação da sensibilidade à insulina. Pela manhã, verificou-se maior produção sistêmica de glicose e lipólise, sem alteração da utilização sistêmica de glicose. Os mecanismos determinantes deste ritmo e seus fatores interferentes no DMT2 são controversos. No estágio de tolerância à glicose diminuída (TGD), já estão presentes alguns dos distúrbios metabólico-hormonais próprios do DMT2, para os quais medidas terapêuticas têm se mostrado benéficas. Pouco foi estudado sobre a tolerância à glicose durante o evoluir do período diurno em indivíduos com TGD, daí nosso objetivo de avaliá-la visando à melhor compreensão metabólica, em condições próximas das fisiológicas, desta fase de pré-diabetes.

Métodos: Indivíduos saudáveis e com comprovada tolerância à glicose normal (TGN) ou TGD foram avaliados durante um ciclo de 24 h por coletas de amostras de sangue a intervalos de 30 a 120 minutos. Foram dosados: glicose, ácidos graxos livres (AGLs), insulina específica, pró-insulina intacta, cortisol e hormônio do crescimento (GH), utilizando os métodos da glicose oxidase, imunoenzimático e colorimétrico, imunoenzimático e radioimunoensaio, respectivamente. Durante o dia, recebiam uma dieta de 2000 kcal, contendo 50% de carboidratos, 35% de lipídios e 15% de proteínas e fracionada em três refeições: café - 8h - 20% VCT, almoço - 12h - 40% VCT e jantar - 18h - 40% VCT e desenvolviam atividades leves. Das 22 às 7h tinham o período de sono. Foi realizada análise comparativa entre os grupos TGD e TGN quanto às características clínicas e bioquímicas basais e ao período de 24 h em relação às concentrações sanguíneas das variáveis, à área incremental sob as curvas (Δ ASC) e às suas respectivas razões entre insulina e glicose, pró-insulina e glicose e pró-insulina e insulina considerando-se os testes *t* de Student e de Mann-Whitney. Para os três períodos pós-prandiais, foram feitas análises intra- e inter-grupos quanto à área sob a curva horária (Δ ASC_h) da glicose, insulina e pró-insulina plasmáticas e às razões acima referidas utilizando-se análise de variância e o teste de Mann-Whitney, respectivamente. Considerou-se em todas as análises significância de 5%.

Resultados: Participaram do estudo 18 indivíduos (14F/4M) com TGN e 15 (13F/2M) com TGD. Ambos os grupos não diferiram quanto à idade, índice de massa corporal, razão cintura/quadril, pressão arterial, perfil lipídico e insulina plasmática basal. O grupo TGD apresentou valores significativamente mais elevados das glicemias de jejum (98 ± 9 vs 87 ± 9 mg/dL; $P < 0,005$) e de 2 h após a carga oral de glicose (165 ± 14 vs 102 ± 19 mg/dL; $P < 0,001$) e da pró-insulina plasmática de jejum ($5,0 \pm 1,1$ vs $3,0 \pm 1,4$ pmol/L; $P < 0,05$). A curva glicêmica de 24 h e a respectiva Δ ASC foram mais elevadas no grupo TGD (24 ± 6 vs 18 ± 6 mg.dL⁻¹.h; $P < 0,05$); as concentrações plasmáticas de insulina nas 24 h e a respectiva Δ ASC não diferiram entre os grupos (2409 ± 711 vs 2646 ± 900 pmol.L⁻¹.h; $P > 0,05$); os valores de pró-insulina plasmática foram mais elevados no grupo TGD durante o período noturno e antes e após o café, sendo sua respectiva Δ ASC maior, sem todavia atingir significância (172 ± 47 vs 107 ± 60 pmol.L⁻¹.h; $P > 0,05$). A razão das Δ ASC entre insulina e glicose plasmáticas foi 1,85 vezes

menor no grupo TGD; entre pró-insulina e glicose plasmáticas não diferiu entre os grupos e entre pró-insulina e insulina plasmáticas foi 2 vezes maior no grupo TGD. Os indivíduos TGN apresentaram maior $ASC_{\text{g}}^{\text{glicêmica}}$ após o jantar (café: 95 ± 10 , almoço: 94 ± 9 , jantar: $103 \pm 12 \text{ mg.dL}^{-1} \cdot \text{h}$; $P < 0,001$) sendo as ASC_{g} da insulina e pró-insulina plasmáticas semelhantes entre as três refeições. As ASC_{g} da glicose plasmática após o café e o jantar foram semelhantes e mais elevadas que a após o almoço nos indivíduos TGD (café: 111 ± 12 , almoço: 105 ± 15 , Jantar: $111 \pm 16 \text{ mg.dL}^{-1} \cdot \text{h}$; $P < 0,001$), com as respectivas ASC_{g} da insulina e da pró-insulina plasmáticas semelhantes, exceto pela maior resposta insulínica após o café (café: 228 ± 84 , almoço: 168 ± 66 , jantar: $162 \pm 96 \text{ pmol.L}^{-1} \cdot \text{h}$; $P < 0,001$). Entre os grupos, o TGD diferiu do TGN por apresentar maior $ASC_{\text{g}}^{\text{glicêmica}}$ após o café e o almoço, maior ASC_{g} da pró-insulina plasmática após o café (13 ± 4 vs $8 \pm 5 \text{ pmol.L}^{-1} \cdot \text{h}$; $P < 0,05$) e razão entre a ASC da pró-insulina e da insulina plasmáticas significativamente maior nos três períodos pós-prandiais (café: $0,07 \pm 0,02$ vs $0,04 \pm 0,02 \text{ pmol}/\text{pmol}$, almoço: $0,09 \pm 0,03$ vs $0,05 \pm 0,03 \text{ pmol}/\text{pmol}$, jantar: $0,08 \pm 0,03$ vs $0,04 \pm 0,02 \text{ pmol}/\text{pmol}$; $P < 0,05$). Os dois grupos foram semelhantes quanto às concentrações durante as 24 h e à resposta total (ASC) das variáveis: AGL sérico, cortisol e GH plasmáticos; ambos os grupos apresentaram o ritmo circadiano do cortisol.

Conclusões: Os distúrbios metabólicos observados não puderam ser explicados pelas alterações das concentrações de AGL sérico, nem das de cortisol e GH plasmáticos. A variação da tolerância à glicose encontrada no grupo TGD precisaria ser confirmada, podendo influenciar a conduta médica nesta fase de pré-diabetes.

Abstract

It has been recognized that in normal subjects, glucose tolerance to different glucose stimulus diminishes from morning to evening. This resulted of impaired insulin secretion and decreased insulin sensitivity, with impaired splanchnic and peripheral glucose utilization. In subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM) it has been observed that inversion of daytime variation in glucose tolerance, that is, lower in the morning than in the evening, with some variation in insulin sensitivity. Higher endogenous glucose production and lipolysis without change of glucose utilization have been observed. The mechanisms underlying daytime variations in glucose tolerance and T2DM alterations are controversial. Some of the metabolic and hormonal disorders of T2DM have already been observed in impaired glucose tolerance (IGT) phase, and treatment has been valuable. There are few studies about daytime variations in glucose tolerance in IGT subjects. Our objective was to evaluate near physiological conditions to better understand IGT metabolism.

Methods: Healthy subjects with proved normal glucose tolerance (NGT) or IGT were studied over a 24-h cycle. Blood samples were drawn every 30 to 120 minutes. Plasma glucose was determined by glucose oxidase; serum free fatty acids (FFA) by immunoenzymatic colorimetric assay; plasma specific insulin and intact proinsulin by immunoenzymatic assay; and plasma cortisol and growth hormone (GH) by radioimmunoassay. During the day, the subjects consumed a diet of 2,000 kcal containing 50% carbohydrate, 35% fat, and 15% protein. Twenty percent of the total calories were eaten at breakfast (8 a.m.) and 40% at lunch (12 a.m.) and dinner (6 p.m.), respectively. They slept from 10 p.m. to 7 a.m. Group mean or median of clinical and biochemical characteristics; 24-h curves of variables; glucose, insulin, and proinsulin incremental area under the curves (Δ AUC), and their ratios of insulin to glucose, proinsulin to glucose, and proinsulin to insulin were compared by Student's *t*-test or by Mann-Whitney test. Intra- and inter-groups comparisons were performed in relation to hourly glucose, insulin, and proinsulin area under the curve (h AUC) and their ratios over the three postprandial periods by analysis of variance and by Mann-Whitney test, respectively. Significance of differences was at 5% level.

Results: Eighteen NGT subjects (14F/4M) and 15 IGT subjects (13F/2M) participated in the study. Both groups had similar age, body mass index, waist-hip ratio, blood pressure, lipid profile, and fasting plasma insulin. The IGT group presented higher fasting plasma glucose levels (98 ± 9 vs. 87 ± 9 mg/dL; $P < 0.005$), plasma glucose 2 h after glucose load (165 ± 14 vs. 102 ± 19 mg/dL; $P < 0.001$), and fasting plasma proinsulin levels (5.0 ± 1.1 vs. 3.0 ± 1.4 pmol/L; $P < 0.05$). Plasma glucose 24-h curve and glucose Δ AUC were higher in the IGT group (24 ± 6 vs. 18 ± 6 mg·dL⁻¹·h; $P < 0.05$); 24-h plasma insulin levels and insulin Δ AUC were similar between groups ($2,409 \pm 711$ vs. $2,646 \pm 900$ pmol·L⁻¹·h; $P > 0.05$, for IGT and NGT, respectively); plasma proinsulin levels were higher in the IGT group, during the night and before and after breakfast, proinsulin Δ AUC was higher, but the difference was not significant (172 ± 47 vs. 107 ± 60 pmol·L⁻¹·h; $P > 0.05$). The Δ AUC ratio of insulin to glucose was 1.85 times lower in the IGT group, proinsulin to glucose was similar between groups, and proinsulin to insulin was 2.0 times higher in IGT group. NGT subjects showed higher glucose h AUC after dinner (breakfast: 95 ± 10 , lunch: 94 ± 9 , dinner: 103 ± 12 mg·dL⁻¹·h; $P < 0.001$), and insulin and proinsulin h AUC were similar among the three meals.

Glucose h AUC after breakfast and dinner in IGT subjects was similar and higher than after lunch (breakfast: 111 ± 12 , lunch: 105 ± 15 , dinner: 111 ± 16 mg.dL⁻¹.h; $P < 0.001$), and insulin and proinsulin h AUC₀₋₂ after the meals were similar except for higher insulin h AUC after breakfast (breakfast: 228 ± 84 , lunch: 168 ± 66 , dinner: 162 ± 96 pmol.L⁻¹.h; $P < 0.001$). IGT between groups showed higher glucose h AUC after breakfast and lunch, higher proinsulin h AUC after breakfast (13 ± 4 vs. 8 ± 5 pmol.L⁻¹.h; $P < 0.05$), and higher AUC ratio of proinsulin to insulin after the three meals (breakfast: 0.04 ± 0.02 vs. 0.07 ± 0.02 pmol/pmol, lunch: 0.05 ± 0.03 vs. 0.09 ± 0.03 pmol/pmol, dinner: 0.04 ± 0.02 vs. 0.08 ± 0.03 pmol/pmol; $P < 0.05$). The two groups were similar in relation to 24-h concentrations and total response (AUC) of serum FFA, plasma cortisol, and GH; both groups showed cortisol circadian rhythm.

Conclusions: IGT subjects well characterized and that have been studied in close to physiological conditions presented daytime variations in glucose tolerance that included those described in T2DM patients and in NGT individuals. As these metabolic disorders could not be explained by changes in either concentrations of serum FFA or plasma cortisol and GH. Daytime in glucose tolerance found in the IGT group should be supported by other studies, and may have clinical implications for the treatment of these subjects.

Referências Bibliográficas*

*International Committee of Medical Journals Editors. Uniforms requirements for manuscripts submitted to biochemical journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington 2001. 248p.

1. DeFronzo RA, Ferrannini E. Regulation of intermediary metabolism during fasting and feeding. In: DeGroot LJ, editors. *Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 2001. p.1389-410.
2. American Diabetes Association. Postprandial blood glucose. Consensus Statement. *Diabetes Care* 2001; 24:775-8.
3. Stumvoll M. Control of glycaemia: from molecules to men. *Diabetologia* 2004; 47:770-81.
4. Lang DA, Matthews DR, Peto J, Turner RC. Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N Engl J Med* 1979; 301:1023-7.
5. Shapiro ET, Tillil H, Polonsky KS, Fang VS, Rubenstein AH, van Cauter E. Oscillations in insulin secretion during constant glucose infusion in normal man: Relationship to changes in plasma glucose. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:307-14.
6. Polonsky KS. The β -cell in diabetes: from molecular genetics to clinical research. *Diabetes* 1995; 44:705-17.
7. Boden G, Ruiz J, Urbain J-L, Chen X. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 1996; 271:E246-52.
8. Matthews DR, Naylor BA, Jones RG, Ward GM, Turner RC. Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes* 1983; 32:617-21.
9. Marsh BD, Marsh DJ, Bergman RN. Oscillations enhance the efficiency and stability of glucose disposal. *Am J Physiol* 1986; 250:E576-82.
10. Bowden CR, Bergman RN, Marsh DJ. Cause of glucose oscillations during glucose infusion: periodic variation in glucose uptake. *Am J Physiol* 1980; 238:E395-407.
11. Jaspán JB, Lever E, Polonsky KS, van Cauter E. In vivo pulsatility of pancreatic islet peptides. *Am J Physiol* 1986; 251:E215-26.
12. Hansen BC, Jen K-LC, Pekk SB, Wolfe RA. Rapid oscillations in plasma insulin, glucagon, and glucose in obese and normal weight humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54:785-92.
13. Matthews DR, Lang DA, Burnett MA, Turner RC. Control of pulsatile insulin secretion in man. *Diabetologia* 1983; 24:231-7.
14. van Cauter E, Polonsky KS, Scheen AJ. Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr Rev* 1997; 18:716-38.
15. Lambert AE, Hoet JJ. Diurnal pattern of plasma insulin concentration in the human. *Diabetologia* 1965; 2:69-72.
16. Freinkel N, Mager M, Vinnick L. Cyclicity in the interrelationships between plasma insulin and glucose during starvation in normal young men. *J Lab Clin Med* 1968; 71:171-8.
17. Faiman C, Moorhouse JA. Diurnal variation in the levels of glucose and related substances in healthy and diabetic subjects during starvation. *Clin Sci* 1967; 32:111-26.
18. van Cauter E, Dériz D, Decoster C, Féry F, Balasse EO. Nocturnal decrease in glucose tolerance during constant glucose infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:604-11.

19. La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. A daily rhythm in glucose tolerance: A role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes* 2001; 50:1237-43.
 20. Jarrett RJ, Keen H. Diurnal variation of oral glucose tolerance: A possible pointer to the evolution of diabetes mellitus. *Br Med J* 1969; 2:341-4.
 21. Jarrett RJ, Baker JA, Keen H, Oakley NW. Diurnal variation in oral glucose tolerance: Blood sugar and plasma insulin levels morning, afternoon, and evening. *Br Med J* 1972; 1:199-201.
 22. Carroll KF, Nestel PJ. Diurnal variation in glucose tolerance and insulin secretion in man. *Diabetes* 1973; 22:333-48.
 23. Aparicio NJ, Puchulu FE, Gasliardino JJ, Ruiz M, Llorens JM, Ruiz J, et al. Circadian variation of the blood glucose, plasma insulin and human growth hormone levels in response to an oral glucose load in normal subjects. *Diabetes* 1974; 23:132-7.
 24. Zimmet PZ, Wall JR, Rome R, Stimmler L, Jarrett RJ. Diurnal variation in glucose tolerance: Associated changes in plasma insulin, growth hormone, and non-esterified fatty acids. *Br Med J* 1974; 1:485-91.
 25. Jarrett RJ, Viberti GC, Sayegh HA. Does "afternoon diabetes" predict diabetes? *Br Med J* 1978; 1:548-9.
 26. Malherbe C, De Gasparo M, De Hertogh R, Hoet JJ. Circadian variations of blood sugar and plasma insulin levels in man. *Diabetologia* 1969; 5:397-404.
 27. Service FJ, Hall LD, Westland RE, O'Brien PC, Go VLW, Haymond MW, et al. Effects of size, time of day and sequence of meal ingestion on carbohydrate tolerance in normal subjects. *Diabetologia* 1983; 25:316-21.
 28. Nuttall FQ, Gannon MC, Wald JL, Ahmed M. Plasma glucose and insulin profiles in normal subjects ingesting diets of varying carbohydrate, fat and protein content. *J Am Coll Nutr* 1985; 4:437-50.
 29. van Cauter E, Shapiro ET, Tillil H, Polonsky KS. Circadian modulation of glucose and insulin responses to meals: Relationship to cortisol rhythm. *Am J Physiol* 1992; 262:E467-75.
 30. Simon C, Brandenberger G, Follenius M. Ultradian oscillations of plasma glucose, insulin, and C-peptide in man during continuous enteral nutrition. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:669-74.
 31. Simon C, Brandenberger G, Saini J, Ehrhart J, Follenius M. Slow oscillations of plasma glucose and insulin secretion rate are amplified during sleep in humans under continuous enteral nutrition. *Sleep* 1994; 17:333-8.
 32. Whiclow MJ, Sturge RA, Keen H, Jarrett RJ, Stimmler L, Grainger S. Diurnal variation in response to intravenous glucose. *Br Med J* 1974; 1:488-91.
 33. Bolli GB, De Feo P, De Cosmo S, Perriello G, Ventura MM, Calcinaro F, et al. Demonstration of a dawn phenomenon in normal human volunteers. *Diabetes* 1984; 33:1150-3.
 34. Mauras N, Blizzard RM, Link K, Johnson ML, Rosol AD, Veldhuis JD. Augmentation of growth hormone secretion during puberty: Evidence for a pulse amplitude-modulated phenomenon. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:596-601.
-

35. Polonsky KS, Given BD, van Cauter E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 1988; 81:442-8.
 36. Simon C, Brandenberger G, Follenius M. Absence of the dawn phenomenon in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:203-5.
 37. Close JN, Nestler JE, Blackard WG. Sleep-associated fall in glucose disposal and hepatic glucose output in normal humans: putative signaling mechanism linking peripheral and hepatic events. *Diabetes* 1989; 38:285-90.
 38. Arslanian S, Ohki Y, Becker DJ, Drash AL. Demonstration of a dawn phenomenon in normal adolescents. *Horm Res* 1990; 34:27-32.
 39. van Cauter E, Blackman JD, Roland D, Spire J-P, Refetoff S, Polonsky KS. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *J Clin Invest* 1991; 88:934-42.
 40. Verrillo A, De Teresa A, Martino C, Di Chiara G, Pinto M, Verrillo L, et al. Differential roles of splanchnic and peripheral tissues in determining diurnal fluctuation of glucose tolerance. *Am J Physiol* 1989; 257:E459-65.
 41. Lee AT, Ader M, Bray GA, Bergman RN. Diurnal variation in glucose tolerance: cyclic suppression of insulin action and insulin secretion in normal weight, but not obese, subjects. *Diabetes* 1992; 41:742-9.
 42. Gibson T, Jarrett RJ. Diurnal variation in insulin sensitivity. *Lancet* 1972; 2:947-8.
 43. Sensi S, Capani F. Circadian rhythm of insulin-induced hypoglycemia in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 43:462-5.
 44. Baker JA, Jarrett RJ. Diurnal variation in the blood-sugar and plasma-insulin response to tolbutamide. *Lancet* 1972; 2:945-7.
 45. Melani F, Verrillo A, Marasco M, Rivellese A, Osorio J, Bertolini MG. Diurnal variation in blood sugar and serum insulin in response to glucose and/or glucagon in healthy subjects. *Horm Metab Res* 1976; 8:85-8.
 46. Taraka Y, Sekine M, Wakatsuki M, Ohgawara H, Shizume K. Levels of pancreatic glucagon, insulin and glucose during twenty-four hours of the day in normal subjects. *Horm Metab Res* 1975; 7:205-6.
 47. Dincen S, Alzaid A, Miles J, Rizza RA. Metabolic effects of the nocturnal rise in cortisol on carbohydrate metabolism in normal humans. *J Clin Invest* 1993; 92:2283-90.
 48. Kalhan SC, Adam PAJ. Inhibitory effects of prednisone on insulin secretion in man: Model for duplication of blood glucose concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 41:600-10.
 49. Longano CA, Fletcher HP. Insulin release after acute hydrocortisone treatment in mice. *Metabolism* 1983; 32:603-8.
 50. Plat L, Byrne MM, Sturis J, Polonsky KS, Mockel J, Féry F, et al. Effects of morning cortisol elevation on insulin secretion and glucose regulation in humans. *Am J Physiol* 1996; 270:E36-42.
 51. Scheen AJ, Byrne MM, Plat L, Leproult R, van Cauter E. Relationships between sleep quality and glucose regulation in normal humans. *Am J Physiol* 1996; 271:E261-70.
-

52. Boyle DJ, Scott JC, Krentz AJ, Nagy RJ, Comstock E, Hoffman C. Diminished brain glucose metabolism is a significant determinant for falling rates of systemic glucose utilization during sleep in normal humans. *J Clin Invest* 1994; 93:529-35.
 53. Maquet P. Sleep function(s) and cerebral metabolism. *Behav Brain Res* 1995; 69:75-83.
 54. Meneilly GS, Elahi D, Minaker KL, Rowe JW. The dawn phenomenon does not occur in normal elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:292-6.
 55. Frank S, Roland DC, Sturis J, Byrne MM, Spire JP, Refetoff S, et al. Effects of aging on glucose regulation during wakefulness and sleep. *Am J Physiol* 1995; 269:E1006-16.
 56. Santiago JV, Haymond MW, Clarke WL, Pagliara AS. Glucagon, insulin, and glucose responses to physiologic testing in normal and massively obese adults. *Metabolism* 1977; 26:1115-22.
 57. Jarrett RJ, Keen H. Further observations on the diurnal variation in oral glucose tolerance. *Br Med J* 1970; 4:334-7.
 58. van Cauter E, Polonsky KS, Blackman JD, Roland D, Sturis J, Byrne MM, et al. Abnormal temporal patterns of glucose tolerance in obesity: relationship to sleep-related growth hormone and circadian cortisol rhythmicity. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1797-805.
 59. Garvey WT, Olefsky JM, Rubenstein AH, Kolterman OG. Day-long integrated serum insulin and C-peptide profiles in patients with NIDDM. *Diabetes* 1988; 37:590-9.
 60. Roberts HJ. Afternoon glucose tolerance testing: a key to the pathogenesis, early diagnosis and prognosis of diabetic hyperinsulinism. *J Am Geriatr Soc* 1964; 12:423.
 61. Sensi S, Capani F, Caradonna P, Dell'Acqua GB. Circadian rhythm of immunoreactive insulin under glycemic stimulus. *J Interdiscipl Cycle Res* 1973; 4:1-13.
 62. Boden G, Chen X, Urbain JL. Evidence for a circadian rhythm of insulin sensitivity in patients with NIDDM caused by cyclic changes in hepatic glucose production. *Diabetes* 1996; 45:1044-50.
 63. Hatteloh R. Paradoxical rise of the blood sugar concentration in diabetes mellitus. *Acta Med Scand* 1924; 8(suppl.): 211-66.
 64. Hopmann R. Insulinbehandlung unter Berücksichtigung des 24-stunden-rhythmus des diabetes mellitus. *Acta Med Scand* 1940; 108 (suppl.):143-55.
 65. Izzo JL. Diurnal (24-hour) rhythm in diabetes mellitus: Diurnal variations in levels of glucose in blood and urine. *Proc Am Diabetes Assoc* 1949; 9:247-73.
 66. Möllerström J. Diurnal rhythm in severe diabetes mellitus: The significance of harmoniously timed insulin treatment. *Diabetes* 1954; 3:188-9.
 67. Bolli GB, Gerich JE. The "dawn phenomenon": a common occurrence in both non-insulin-dependent and insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1984; 310:746-50.
 68. Dimitriadis G, Vlachonikolis IG, Hartzigellaki E, Linos A, Kordonouri O, Olexopoulos E, et al. The "dawn phenomenon" in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetes Nutr Metab* 1988; 1:37-41.
-

69. Holman R, Turner R. Maintenance of basal plasma glucose and insulin concentration in maturity-onset diabetes. *Diabetes* 1979; 28:227-30.
 70. Atila JA, Ryder RRV, Vora J, Owens DR, Luzio SD, Williams S, et al. Dawn phenomenon: Its frequency in non-insulin-dependent diabetic patients on conventional therapy. *Diabetes* 1987; 10:461-5.
 71. Chen Y-DI, Jeng C-Y, Hollenbeck CB, Wu MS, Reaven GM. Relationship between plasma glucose and insulin concentration, glucose production, and glucose disposal in normal subjects and patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1988; 82:21-5.
 72. Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 318:1231-9.
 73. Reaven GM, Hollenbeck CB, Jeng C-Y, Wu MS, Chen Y-DI. Measurements of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 1988; 37:1020-4.
 74. Yki-Järvinen H, Helve E, Sane T, Nurjhan N, Taskinen H. Insulin inhibition of overnight glucose production and gluconeogenesis from lactate in NIDDM. *Am J Physiol* 1989; 256:E732-9.
 75. Beebe CA, van Cauter E, Shapiro ET, Tillil H, Lyons R, Rubenstein AH, et al. Effect of temporal distribution of calories on the diurnal patterns of glucose levels and insulin secretion in NIDDM. *Diabetes Care* 1990; 13:748-55.
 76. Shapiro ET, Polonsky KS, Copinschi G, Bosson D, Tillil H, Blackman JD, et al. Nocturnal elevation of glucose levels during fasting in noninsulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:444-54.
 77. Buchsbaum MS, Gillin JC, Wu J, Hazlett E, Sicotte N, Dupont RM, et al. Regional cerebral glucose metabolic rate in human sleep assessed by positron emission tomography. *Life Sci* 1989; 45:1349-56.
 78. Maquet P, Dive D, Salmon E, Sadzot B, Franco G, Poirier R, et al. Cerebral glucose utilization during stage 2 sleep in man. *Brain Res* 1992; 571:149-53.
 79. Perriello G, Pimenta W, Pampanelli S, Lucidi P, Lepore M, Porcellati F, et al. Evidence of associated day-night variations in glucose and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus (abstract). *Diabetes* 1999; 48 (suppl. 1):A293.
 80. Perriello G, Pampanelli S, Porcellati F, Lucidi P, Pimenta W, De Feo P, et al. Evidence of increased day-night variations in systemic glucose production in normal individuals [abstract]. *Diabetes* 2001; 50(suppl. 2):A65.
 81. Yoshioka N, Kuzuya T, Matsuda A, Taniguchi M, Iwamoto Y. Serum proinsulin levels at fasting and after oral glucose load in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1988; 31:355-60.
 82. Porte Jr D, Kahn SE. Hyperproinsulinemia and amyloid in NIDDM: Clues to etiology of islet β -cell dysfunction? *Diabetes* 1989; 38:1333-6.
 83. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28:1039-57.
-

84. World Health Organization Expert Committee: second report on diabetes mellitus. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1980; 646:1-80.
85. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:1183-97.
86. Lowe LP, Liu K, Greenland P, Metzger BE, Dyer AR, Stamler J. Diabetes, asymptomatic hyperglycemia, and 22-year mortality in black and white men: the Chicago Heart Association Detection Project in Industry Study. *Diabetes Care* 1997; 20:163-9.
87. Rodrigues BL, Lau N, Burchfield CM, Abbott RD, Sharp DS, Katsuhito Y, et al. Glucose intolerance and 23-year risk of coronary heart disease and total mortality. The Honolulu Heart Program. *Diabetes Care* 1999; 22:1262-5.
88. Tominaga M, Ezuchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Seikikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999; 22:920-4.
89. Saydah S, Loria C, Eberhardt M, Brancati F. Subclinical states of glucose intolerance and risk of death in the US. *Diabetes Care* 2001; 24:447-53.
90. The DECODE Study Group, on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-h diagnostic criteria. *Arch Intern Med* 2001; 161:397-404.
91. Malerbi DA, Franco LJ, The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care* 1992; 15:1509-16.
92. Pan X-R, Li G-W, Hu Y-H, Wang J-X, Yang W-Y, An Z-X, et al. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 1997; 20:537-44.
93. Khaw K-T, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, et al. Glycated haemoglobin, diabetes and mortality in men in Norfolk Cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC - Norfolk). *Br Med J* 2001; 322:15-8.
94. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämmäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344:1343-50.
95. Knowler W, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346:393-403.
96. Pimenta W, Mitrakou A, Jensen T, Yki-Järvinen H, Daily G, Gerich J. Insulin secretion and insulin sensitivity in people with impaired glucose tolerance. *Diabetic Med* 1996; 13(suppl. 6):S33-6.

97. Pimenta WP, Santos ML, Cruz NS, Aragon FF, Padovani CR, Gerich JE. Brazilian individuals with impaired glucose tolerance are characterized by impaired insulin secretion. *Diabete Metab (Paris)* 2002; 28:468-76.
98. Yoneda H, Ikegami H, Yamamoto Y, Yamato E, Cha T, Kawaguchi Y, et al. Analysis of early-phase insulin responses in nonobese subjects with mild glucose intolerance. *Diabetes Care* 1992; 15:1517-21.
99. Byrne MM, Sturis J, Sobel RJ, Polonsky KS. Elevated plasma 2 h postchallenge predicts defects in β -cell function. *Am J Physiol* 1996; 270:E572-9.
100. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, De Fronzo RA. Beta-cell dysfunction and glucose intolerance: results from the San Antonio Metabolism (SAM) Study. *Diabetologia* 2004; 47:31-9.
101. Gerich JE. Metabolic abnormalities in impaired glucose tolerance. *Metabolism* 1997; 46 (suppl. 1):40-3.
102. Gerich JE. Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1306-16.
103. Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2003; 52:2867-73.
104. Mitrakou A, Kelley D, Mohan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 1992; 326:22-9.
105. Larsson H, Göran B, Åhrén B. Glucose modulation of insulin and glucagon secretion is altered in impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1778-82.
106. Haffner SM, Mykkänen L, Valdez RA, Stern MP, Holloway DL, Monterrosa A, et al. Disproportionately increased proinsulin levels are associated with the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1806-10.
107. Dalbosco IS, Vieira JGH, Nishida SK, Lombardi MT, Moisés RCS, Coifman R, et al. A specific and highly sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for human proinsulin. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29:193-9.
108. Ruige JB, Dekker JM, Nippels G, Popp-Snijders C, Stehouwer CDA, Kostense PJ, et al. Hyperproinsulinaemia in impaired glucose tolerance is associated with a delayed insulin response to glucose. *Diabetologia* 1999; 42:177-80.
109. Nippels G, Popp-Snijders C, Kostense PJ, Bouter LM, Heine RJ. Fasting proinsulin and 2-h post-load glucose levels predict the conversion to NIDDM in subjects with impaired glucose tolerance: The Hoorn Study. *Diabetologia* 1996; 39:113-8.
110. Kahn SE, Leonetti DL, Prigeon RL, Boyko EJ, Bergstrom RW, Fujimoto WY. Proinsulin as a marker for the development of NIDDM in Japanese-American men. *Diabetes* 1995; 44:173-9.
111. Norman GR, Streininger DL. *Biostatistics: the bare essentials*. St. Louis: Mosby-Year Book; 1994.
112. Thomas Jr GB. *Cálculo*. Rio de Janeiro: Editora ao Livro Técnico; 1968.

113. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005; 28 (suppl. 1):S37-42.
 114. National Institutes of Health-National Institute of Health Consensus Development Conference Statement Health Implications of obesity. *Ann Intern Med* 1985; 103(6pt2):1073-7.
 115. World Health Organization. Defining the problem of overweight and obesity. In: *Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO Consultation*. Geneva; 2000. p.241-3.
 116. Sociedade Brasileira de Hipertensão. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2004; 82:8-14.
 117. American Medical Association. Executive summary of the third report of national cholesterol education program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-97.
 118. American Diabetes Association. Dyslipidemia management in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 (suppl. 1):S68-71.
 119. American Diabetes Association. Smoking and diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 (suppl. 1):S68-71.
 120. American Diabetes Association. Physical activity/exercise and diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 (suppl. 1):S58-62.
 121. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14:173-94.
 122. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects: Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993; 42:1663-72.
 123. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 1998; 19:491-503.
 124. Pimenta WP, Santos ML, Cruz NS, Araçoz FF, Padovani CR, Gerich JE. Insulin secretion, insulin sensitivity, and hepatic insulin extraction in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:301-8.
 125. Golay A, DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC, Thorin D, Acheson K, et al. Oxidative and non-oxidative glucose metabolism in non-obese Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1988; 31:585-91.
 126. Boden G, Ray JK, Smith RH, Owen DE. Carbohydrate oxidation and storage in non-insulin dependent diabetic patients. *Diabetes* 1983; 32:982-7.
 127. Bogardus C, Lillioja S, Howard BV, Reaven G, Mott D. Relationship between insulin secretion, insulin action, and fasting plasma glucose concentration in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest* 1984; 74:1238-46.
-

128. Lillioja S, Bogardus C, Mott DM, Kennedy AL, Knowler WC, Howard BV. Relationship between insulin-mediated glucose disposal and lipid metabolism in man. *J Clin Invest* 1985;110:6-15.
129. Ward WK, LaCava EC, Paquette TL, Beard JC, Wallum BJ, Porte Jr D. Disproportionate elevation of immunoreactive proinsulin in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and in experimental insulin resistance. *Diabetologia* 1987; 30:698-702.
130. Deacon CF, Schleser-Mohr S, Ballmann MN, Willms B, Conkon JM, Creutzfeldt W. Preferential release of proinsulin relative to insulin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Endocrinol* 1988; 119:549-54.
131. Hampton SM, Beyzavi K, Teale D, Marks V. A direct assay for proinsulin in plasma and its applications in hypoglycaemia. *Clin Endocrinol* 1988; 29:9-16.
132. Temple RC, Carrington CA, Luzio SD, Owens DR, Schneider AE, Sobey WJ, et al. Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1989; 1:293-5.
133. Saad MF, Kahn SE, Nelson RG, Pettitt DJ, Knowler WC, Schwartz MW, et al. Disproportionately elevated proinsulin in Pima Indians with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:1247-53.
134. Porte Jr D, Kahn SE. β -cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: Potential mechanisms. *Diabetes* 2001; 50 (suppl. 1):S160-3.
135. Genuth SM. Plasma insulin and glucose profiles in normal, obese, and diabetic persons. *Ann Intern Med* 1973; 79:812-22.
136. Behrman RGA, Kisseloh AH, Wynn V. Diurnal patterns of plasma glucagon and insulin in normal and diabetic subjects. *Horm Metab Res* 1978; 10:459-65.
137. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes Care* 1992; 15:318-68.
138. Östenson C-G. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiol Scand* 2001; 171:241-7.
139. Groop LC, Bonadonna RC, Del Prato S, Ratheiser K, Zych K, Ferrannini E, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus: evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* 1989; 84:205-13.
140. Kruszynska YT, Home PD. Night-time metabolic changes in normal subjects in the absence of the dawn phenomenon. *Diabetes Metab (Paris)* 1988; 14:437-42.
141. Hunter WM, Friend JAR, Strong JA. The diurnal pattern of plasma growth hormone concentration in adults. *J Endocrinol* 1966; 34:139-46.
142. Takahashi Y, Kipnis DM, Daughaday WH. Growth hormone secretion during sleep. *J Clin Invest* 1968; 47:2079-90.

143. DeFeo P, Perriello G, Ventura MM, Calcinaro F, Basta G, Lolli C, et al. Studies on overnight insulin requirements and metabolic clearance rate of insulin in normal and diabetic man: Relevance to the pathogenesis of the dawn phenomenon. *Diabetologia* 1986; 29:475-80.

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

FACULDADE DE MEDICINA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

BOTUCATU, SP - Rubião Júnior - Cep 18.618-970 - PABX ☎ (014) 821-2121 - RAMAL 2258 - FAX (014) 821-4691 - TELEX 0142107

Botucatu, 04 de outubro 1.999

Of.300/99-CEP

Prezada Senhora ,

O Projeto de pesquisa intitulado “**Variação circadiana metabólica e hormonal em indivíduos com intolerância à carboidratos**” de autoria de Maria Luiza dos Santos, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião deste CEP aos 04/10/99.

O CEP, no entanto, solicita a pesquisadora que envie relatório, quanto ao grupo controle, a cada 5 (cinco) pacientes estudados, no que diz respeito a ocorrência de complicação neste grupo.

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Profª Drª Marilza Vieira Cunha Rudge
Presidente do CEP

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Walkyria de Paula Pimenta
Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Botucatu

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,

..... RG n.
o

Autorizo a minha participação voluntária no estudo visando a "Verificação da Variação da glicemia e hormônios durante o período de 24 horas".

Para isso declaro que estou ciente dos seguintes procedimentos:

- 1) que mesmo tendo se candidatado ao estudo, antes de efetivamente participar do mesmo (24 horas de internação) serei avaliado clínica e laboratorialmente pela médica responsável e se houver alguma contra-indicação (anemia, hipertensão, etc.) serei comunicado e encaminhado para tratamento adequado;
- 2) que os benefícios deste estudo para os Intolerantes à glicose será o de prevenir riscos cardiovasculares ou o Diabetes mellitus;
- 3) que será necessário à internação no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp, por 01 (um) dia e de preferência num final de semana;
- 4) que haverá a colocação de um cateter numa das veias do braço, que será mantida por soro fisiológico;
- 5) que serão coletadas 12 amostras de sangue de 10 mL cada uma e 12 amostras de 1(um) mL cada, num total de 132 mL, que serão utilizadas para as dosagens de glicose, hormônios e ácidos graxos;
- 6) que fui esclarecido sobre todas as etapas do estudo, com os mínimos detalhes do que ocorrerá antes, durante e depois;
- 7) que durante a minha permanência na enfermaria receberei todos os cuidados para o conforto necessário;
- 8) que haverá acompanhamento integral por parte dos pesquisadores responsáveis;
- 9) não estão previstos nenhum efeito colateral, pois não será administrado nenhum medicamento, apenas o soro fisiológico para a manutenção da veia. Quanto ao procedimento para as coletas de sangue, que é simples e rotineiro, os riscos de qualquer complicação serão pouco prováveis. Se houver qualquer intercorrência estarei sob cuidados médicos da pesquisadora responsável, sem ter nenhum gasto;
- 10) que o estudo poderá ser suspenso se durante o mesmo ocorrer desistência ou desconforto do voluntário;
- 11) que terei liberdade para recusar a participação, ou retirar o meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem perder o direito de ser atendido nesta Instituição;
- 12) que haverá sigilo e privacidade quanto à minha participação no estudo;
- 13) que a locomoção e deslocamento do hospital será feita com meus próprios recursos.

Maria Luiza dos Santos
(0—14) 3815 72 38

Prof^a. Dr.^a Walkyria de Paula Pimenta
(0—14) 3882 61 30

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,

..... RG n.
o

Autorizo a minha participação voluntária no estudo visando a "Verificação da Variação da glicemia e hormônios durante o período de 24 horas".

Para isso declaro que estou ciente dos seguintes procedimentos:

- 1) que mesmo tendo se candidatado ao estudo, antes de efetivamente participar do mesmo (24 horas de internação) serei avaliado clínica e laboratorialmente pela médica responsável e se houver alguma contra-indicação (anemia, hipertensão, etc.) serei comunicado e encaminhado para tratamento adequado;
- 2) que os benefícios deste estudo para os com tolerância à glicose normal será o de prevenir riscos cardiovasculares ou o Diabetes mellitus;
- 3) que será necessário à internação no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp, por 01 (um) dia e de preferência num final de semana;
- 4) que haverá a colocação de um cateter numa das veias do braço, que será mantida por soro fisiológico;
- 5) que serão coletadas 12 amostras de sangue de 10 mL cada uma e 12 amostras de 1 (um) mL cada, num total de 132 mL, que serão utilizadas para as dosagens de glicose, hormônios e ácidos graxos;
- 6) que fui esclarecido sobre todas as etapas do estudo, com os mínimos detalhes do que ocorrerá antes, durante e depois;
- 7) que durante a minha permanência na enfermaria receberei todos os cuidados para o conforto necessário;
- 8) que haverá acompanhamento integral por parte dos pesquisadores responsáveis;
- 9) não estão previstos nenhum efeito colateral, pois não será administrado nenhum medicamento, apenas o soro fisiológico para a manutenção da veia. Quanto ao procedimento para as coletas de sangue, que é simples e rotineiro, os riscos de qualquer complicação serão pouco prováveis. Se houver qualquer intercorrência estarei sob cuidados médicos da pesquisadora responsável, sem ter nenhum gasto;
- 10) que o estudo poderá ser suspenso se durante o mesmo ocorrer desistência ou desconforto do voluntário;
- 11) que terei liberdade para recusar a participação, ou retirar o meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem perder o direito de ser atendido nesta Instituição;
- 12) que haverá sigilo e privacidade quanto à minha participação no estudo;
- 13) que a locomoção e deslocamento do hospital será feita com meus próprios recursos.

Maria Luiza dos Santos
(0—14) 3815 72 38

Prof^a. Dr.^a Walkyria de Paula Pimenta
(0—14) 3882 61 30

Tabela I. Glicose plasmática (mg/dL) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e com tolerância à glicose diminuída (TGD).

Tempo (H)	Grupo		P
	TGN	TGD	
N	18	15	
7	86 ± 9	97 ± 8	<0,05
8*	88 ± 16	105 ± 27	<0,05
9	111 ± 17	141 ± 19	<0,001
10	97 ± 12	116 ± 18	<0,001
11	86 ± 8	91 ± 11	NS
12*	84 ± 10	95 ± 22	<0,05
13	110 ± 20	117 ± 21	NS
14	99 ± 15	112 ± 21	<0,05
15	96 ± 13	105 ± 15	NS
16	88 ± 9	101 ± 12	<0,001
17	86 ± 8	96 ± 15	<0,05
18*	87 ± 11	101 ± 28	<0,05
19	119 ± 19	122 ± 20	NS
20	109 ± 17	115 ± 21	NS
21	96 ± 14	106 ± 17	NS
22	90 ± 11	100 ± 15	<0,05
23	88 ± 10	96 ± 13	<0,05
24	89 ± 8	97 ± 13	<0,05
2	89 ± 8	96 ± 13	<0,05
4	87 ± 9	95 ± 13	<0,05
6	85 ± 10	94 ± 12	<0,05
7	85 ± 10	94 ± 12	<0,05

Valores expressos como média ± desvio padrão;
 NS: Não significativo; * Refeição após a coleta de sangue.

Tabela II. Área incremental sob a curva (Δ ASC) de glicose, insulina e pró-insulina plasmáticas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD).

Δ ASC	Grupo		P
	TGN	TGD	
Glicose (mmol.L⁻¹.h)	18 ± 6	24 ± 6	<0,05
Insulina (pmol.L ⁻¹ .h)	2646 ± 900	2409 ± 711	>0,05
Pró-Insulina (pmol.L ⁻¹ .h)	107 ± 60	172 ± 47	>0,05

Valores expressos como mediana ± semi-amplitude interquartílica.

Tabela III. Insulina específica plasmática (pmoL/L) durante as 24 horas dos indivíduos com tolerância à glicose normal (TGN) e com tolerância à glicose diminuída (TGD).

Tempo (H)	Grupo		P
	TGN	TGD	
N	18	15	
7	75 ± 40	54 ± 36	NS
8,5*	214 ± 92	250 ± 46	NS
9	259 ± 157	311 ± 106	NS
9,5	217 ± 74	323 ± 79	NS
10	202 ± 123	258 ± 70	NS
11	128 ± 50	116 ± 52	NS
12,5*	258 ± 84	187 ± 28	NS
13	250 ± 148	173 ± 41	NS
13,5	180 ± 90	178 ± 53	NS
14	175 ± 73	184 ± 51	NS
15	146 ± 113	161 ± 53	NS
17	115 ± 68	104 ± 59	NS
18,5*	200 ± 103	177 ± 39	NS
19	221 ± 89	174 ± 92	NS
19,5	218 ± 57	201 ± 64	NS
20	217 ± 83	165 ± 47	NS
21	167 ± 98	152 ± 55	NS
23	106 ± 55	77 ± 39	NS
2	89 ± 29	58 ± 22	NS
4	76 ± 33	62 ± 26	NS
6	65 ± 26	58 ± 25	NS
7	74 ± 29	62 ± 26	NS

Valores expressos como mediana ± semi-amplitude interquartílica; NS: Não Significativo; * Coleta de sangue 30 minutos após a refeição.

Tabela IV. Pró-insulina intacta plasmática (pmoL/L) durante 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD).

Tempo (H)	Grupo		P
	TGN	TGD	
N	18	15	
7	3 ± 2	4 ± 2	<0,05
8,5*	6 ± 4	8 ± 4	NS
9	9 ± 5	11 ± 5	NS
9,5	11 ± 5	19 ± 6	<0,05
10	10 ± 5	20 ± 4	<0,001
11	9 ± 5	14 ± 7	<0,05
12,5*	8 ± 3	13 ± 4	<0,05
13	13 ± 5	14 ± 5	NS
13,5	10 ± 5	15 ± 6	NS
14	10 ± 6	15 ± 5	NS
15	12 ± 6	17 ± 6	NS
17	5 ± 5	11 ± 8	<0,05
18,5*	8 ± 4	13 ± 6	<0,05
19	7 ± 7	12 ± 8	NS
19,5	7 ± 5	14 ± 6	NS
20	10 ± 6	13 ± 6	NS
21	7 ± 7	14 ± 4	NS
23	5 ± 4	9 ± 3	NS
2	4 ± 2	7 ± 3	<0,05
4	3 ± 2	6 ± 1	<0,01
6	4 ± 2	6 ± 2	NS
7	3 ± 1	5 ± 1	<0,005

Valores são apresentados como mediana ± semi-amplitude interquartílica;
NS: não significativo. * Coleta de sangue 30 minutos após a refeição.

Tabela V. Razão entre as áreas incrementais sob a curva (Δ ASC) da glicose (pmoL/mmoL), insulina específica (pmoL/mmoL) e pró-insulina intacta (pmoL/pmoL) plasmáticas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD).

(ASC	Grupo		P
	TGN	TGD	
Insulina/Glicose	146 (43	79 (32	<0,05
Pró-Insulina/Glicose	5 (3	7 \pm 2	NS
Pró-Insulina/Insulina	0,04 \pm 0,03	0,08 \pm 0,04	<0,05

Valores expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica.

Tabela VI. Área sob a curva horária (ASC_h) da glicose (mg.dL⁻¹.h), insulina específica (pmoL.L⁻¹.h) e pró-insulina intacta (pmoL.L⁻¹.h) plasmáticas de cada período pós-prandial: café, almoço e jantar segundo os grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD).

Variável	Grupo	Períodos			P
		Café (8-12 h 00)	Almoço (12-18 h 00)	Jantar (18 -22 h 00)	
Glicose*	TGN	95 ± 10 ^{aA}	94 ± 4 ^{aA}	103 ± 12 ^{aB}	<0,001
	TGD	111 ± 12 ^{bB}	105 ± 15 ^{bA}	111 ± 16 ^{aB}	<0,001
P		<0,001	<0,05	NS	
Insulina*	TGN	240 ± 132 ^{aA}	204 ± 96 ^{aA}	210 ± 120 ^{aA}	NS
	TGD	228 ± 84 ^{aB}	168 ± 66 ^{aA}	162 ± 96 ^{aA}	<0,001
P		NS	NS	NS	
Pró-Insulina**	TGN	8 ± 5 ^{aA}	10 ± 5 ^{aA}	7 ± 5 ^{aA}	NS
	TGD	13 ± 4 ^{bA}	16 ± 4 ^{aA}	11 ± 3 ^{aA}	NS
P		<0,05	NS	NS	

Valores expressos como média ± desvio padrão (*) ou mediana ± semi-amplitude interquartílica (**); letras minúsculas: comparação dos períodos entre os grupos; letras maiúsculas: comparação dos períodos intra grupo; pelo menos uma letra diferente é significativo.

Tabela VII. Valores dos ácidos graxos livres (AGLs) (mmol/L) séricos durante as 24 horas dos indivíduos do grupo com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD).

Tempo (H)	Grupo		P
	TGN	TGD	
N	18	15	
7	1,5 ± 0,9	0,6 ± 0,4	NS
8*	1,3 ± 0,7	0,8 ± 0,2	NS
9	0,7 ± 0,5	0,4 ± 0,1	NS
10	1,5 ± 0,6	0,7 ± 0,2	<0,01
11	1,4 ± 1,1	0,7 ± 0,4	NS
12*	1,0 ± 0,7	1,2 ± 0,5	NS
13	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,3	NS
14	0,5 ± 0,7	0,3 ± 0,8	NS
15	0,9 ± 0,7	0,6 ± 0,3	NS
16	0,8 ± 0,7	1,0 ± 0,4	NS
17	0,7 ± 0,8	0,6 ± 0,5	NS
18*	1,6 ± 1,0	0,6 ± 0,5	<0,05
19	0,8 ± 0,9	0,4 ± 0,2	NS
20	0,8 ± 0,5	0,5 ± 0,7	NS
21	1,4 ± 0,6	0,3 ± 0,1	<0,05
22	1,5 ± 1,1	1,4 ± 0,5	NS
23	1,4 ± 0,9	1,0 ± 0,6	NS
24	1,3 ± 0,6	1,1 ± 0,8	NS
2	1,4 ± 0,6	1,0 ± 0,7	NS
4	1,7 ± 0,8	1,0 ± 0,5	NS
6	1,6 ± 0,7	1,4 ± 0,7	NS
7	1,3 ± 0,8	1,0 ± 0,5	NS

Valores são expressos como mediana ± semi-amplitude interquartilica;
NS: Não significativo; * refeição após a coleta de sangue.

Tabela VIII. Área total sob a curva (ASC) dos ácidos graxos livres (AGL) séricos, cortisol e hormônios do crescimento (GH) plasmáticos durante o período de 24 horas, dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD).

ASC	Grupo		P
	TGN	TGD	
AGL sérico (mmoL.L ⁻¹ .h)	33 ± 11	20 ± 12	NS
Cortisol Plasmático (µg.dL ⁻¹ .h)	171 ± 27	166 ± 28	NS
GH Plasmático (ng.L ⁻¹ .h)	46 ± 32	36 ± 18	NS

Valores expressos como mediana ± semi-amplitude interquartílica; NS: não significativo.

Tabela IX. Cortisol plasmático ($\mu\text{g/dL}$) durante 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e tolerância à glicose diminuída (TGD).

Tempo (H)	Grupo		P
	TGN	TGD	
N	18	15	
7	17 \pm 4	17 \pm 6	NS
9*	8 \pm 2	7 \pm 2	NS
11	6 \pm 2	8 \pm 3	NS
13*	9 \pm 2	8 \pm 1	NS
15	6 \pm 2	6 \pm 4	NS
17	5 \pm 2	5 \pm 2	NS
19*	5 \pm 2	4 \pm 1	NS
21	3 \pm 2	2 \pm 1	NS
23	4 \pm 2	2 \pm 1	NS
2	4 \pm 2	4 \pm 3	NS
4	9 \pm 3	8 \pm 2	NS
6	14 \pm 3	13 \pm 4	NS
7	13 \pm 2	12 \pm 4	NS

Valores expressos como mediana \pm semi-amplitude interquartílica.
 NS: não significativo; * Coletas de sangue 1 hora após a refeição.

Tabela X. Hormônio do crescimento plasmático (ng/mL) durante as 24 horas dos grupos com tolerância à glicose normal (TGN) e diminuída (TGD).

Tempo (H)	Grupo		P
	TGN	TGD	
N	18	15	
7	2,6 ± 1,4	2,2 ± 1,6	NS
9*	0,9 ± 0,6	0,5 ± 0,2	NS
11	0,5 ± 0,7	0,7 ± 0,8	NS
13*	1,0 ± 1,2	0,7 ± 0,5	NS
15	0,9 ± 1,0	1,1 ± 1,6	NS
17	1,4 ± 0,7	0,7 ± 0,4	NS
19*	0,9 ± 1,6	0,7 ± 0,7	NS
21	1,0 ± 1,4	0,3 ± 0,6	NS
23	3,0 ± 1,9	1,2 ± 2,0	NS
2	1,7 ± 1,3	0,7 ± 0,7	<0,05
4	1,9 ± 0,9	1,3 ± 0,8	NS
6	1,0 ± 0,7	0,6 ± 0,5	NS
7	1,2 ± 1,4	0,7 ± 0,7	NS

Valores expressos como mediana ± semi-amplitude interquartílica;
NS: não significativo; * Coletas de sangue 1 hora após a refeição.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)