

RITMOS HORMONAIIS DO PÂNCREAS ENDÓCRINO: DOS FUNDAMENTOS CRONOBIOLOGÍCOS ÀS IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

*HORMONE RHYTHMS OF THE ENDOCRINE PANCREAS: FROM THE
CHRONOBIOLOGICAL FUNDAMENTALS TO THE CLINICAL IMPLICATIONS*

Edson Delattre

Docente. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Instituto de Biologia - UNICAMP

CORRESPONDÊNCIA: Edson Delattre – Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Barão Geraldo – CEP 13 083-970 Campinas - SP. Fax: (19) 37886185 - E-mail: delattre@unicamp.br

DELATTRE E. Ritmos hormonais do pâncreas endócrino: dos fundamentos cronobiológicos às implicações clínicas. **Medicina, Ribeirão Preto**, 37: 51-64, jan/jun 2004.

RESUMO: Inicialmente, são apresentadas as bases teóricas para o conhecimento dos ritmos endócrinos, considerando-se que, virtualmente, todas as secreções hormonais apresentam acentuadas oscilações, o que demonstra um alto grau de organização temporal do sistema endócrino. A seguir, o trabalho revisa a ritmicidade do pâncreas endócrino, ressaltando os ritmos circadianos e ultradianos da insulina, em razão de sua importância para a fisiologia e fisiopatologia desse órgão. São apresentados tanto os resultados obtidos *in vitro*, quanto aqueles verificados clinicamente. Discutem-se as razões biológicas para a secreção pulsátil dos hormônios em geral, bem como as alterações desse ritmo em patologias do pâncreas endócrino.

UNITERMOS: Cronobiologia. Ritmos Endócrinos. Ritmo Circadiano. Ritmo ultradiano. Secreção pulsátil. Célula Beta. Insulina; secreção.

1- A RITMICIDADE DA NATUREZA VIVA

Ritmicidade é um fenômeno inerente aos reinos dos seres vivos em geral, sendo encontrada em todos os níveis de organização, desde em simples células (ou seres unicelulares), tecidos e órgãos, até em organismos por inteiro⁽¹⁾.

Ritmo é a organização de um fenômeno no tempo. É, freqüentemente, descrito por seu período, média ou nível e fase⁽²⁾.

Os ritmos biológicos são importantes para a saúde e bem estar do organismo, por duas razões. Primeiro, por permitirem temporização ótima das atividades biológicas, no contexto dos ciclos geofísicos e ambientais⁽³⁾. Assim, mudanças fisiológicas, metabólicas e comportamentais, nos organismos vivos, estão, usualmente, sincronizadas com mudanças geofísicas, periódicas, de nosso ambiente, tais como a rotação diária da Terra em torno do seu eixo (ritmos circadianos) e o

movimento anual da Terra em volta do Sol (variações sazonais)⁽²⁾. Conseqüentemente, os ritmos capacitam o organismo a antecipar eventos periódicos em seu ambiente, podendo, assim, iniciar processos de desenvolvimento lento⁽³⁾. Segundo, por proverem um arcabouço para a organização temporal da fisiologia e do comportamento, contribuindo, desse modo, para a manutenção de um meio interno equilibrado⁽³⁾. Assim, uma relação de fase estável, entre os diversos ritmos fisiológicos e comportamentais, leva à constituição de uma ordem temporal interna, que parece ser condição de saúde para qualquer organismo⁽⁴⁾. Nesse sentido, têm-se acumulado evidências de que estados patológicos estão associados a ritmos anormais, bem como há, atualmente, substancial suporte para a hipótese de que alterações da organização temporal podem estar envolvidas na etiologia de várias doenças⁽⁵⁾. Conclui-se, portanto, que a eficiência biológica é derivada da precisa organização das funções vitais, tanto no espaço quanto no tempo⁽⁶⁾.

2- RITMOS CIRCADIANOS

HALBERG, 1959⁽⁷⁾, introduziu a denominação *circadiano* para os ritmos endógenos, com período de cerca de 24 h. Esses ritmos evoluíram como resposta às enormes flutuações do ambiente físico, associadas com a alternância dia e noite. A aquisição de tais programas temporais, bem como o seu adequado ajuste ao ciclo ambiente de 24 h, capacita o organismo a se preparar antecipadamente para enfrentar diferentes situações⁽⁸⁾. Evidencia-se, assim, o conceito proposto por MOORE-EDE, 1986⁽⁹⁾, de *homeostasia antecipadora* ou *prediva*.

Ritmos circadianos foram documentados em, praticamente, todas as espécies e em todos os níveis de organização dos seres vivos⁽¹⁾. Tais ritmos provêm alto grau de organização temporal dentro dos organismos, permitindo a realização de diferentes estados, por meio da segregação de seus momentos de ocorrência⁽⁸⁾. É difícil demonstrar-se uma variável corporal que não apresente flutuação circadiana⁽¹⁾.

Há 50 anos, ASCHOFF e HALBERG (*In: REINBERG & SMOLENSKY, 1983*)⁽¹⁰⁾ desenvolveram a idéia de que variações cíclicas de fatores ambientais são capazes de influenciar a expressão de ritmos circadianos. Tais variações passaram a ser denominadas *sincronizadores*, *agentes arrastadores* ou “*zeitgebers*”. “*Zeitgeber*” é neologismo alemão, cujo significado etimológico é *doador de tempo* (“*zeit*” = tempo; “*geber*” = doador); expressa uma oscilação externa, que é capaz de sincronizar um ritmo biológico gerado endogenamente.

Um sincronizador não cria um ritmo; ele é capaz, apenas, de influenciar sua expressão, *verbi gratia* (v.g.), forçando a alteração do seu período e/ou a temporização do seu pico em relação à hora do dia⁽¹⁰⁾. O *zeitgeber* mais potente, para a maioria dos animais, é o ciclo claro-escuro⁽³⁾. Recentemente, caracterizou-se um novo fotorreceptor, a melanopsina, presente em uma subpopulação de células ganglionares da retina, que são sensíveis à luz e se projetam nos núcleos supraquiasmáticos, atuando como *zeitgeber*, para a sincronização fótica dos ritmos circadianos⁽¹¹⁾. Para a espécie humana, entretanto, os fatores socioecológicos, decorrentes da organização social do trabalho e do lazer, são, pelo menos, tão importantes quanto aquele sincronizador^(1,3).

A maioria das flutuações diárias das variáveis fisiológicas e comportamentais é verdadeiramente endógena, uma vez que persistem mesmo quando não há sinalização externa⁽³⁾, estabelecendo-se a condição de *ritmo em livre-curso*. Ritmos em livre-curso

expressam a ação, apenas, dos relógios internos, dissociados, portanto, da ação dos sincronizadores^(3,4). Exemplo importante dessa anormalidade funcional pode ocorrer em pacientes internados em UTIs não temporizadas, onde ritmos atenuados ou mesmo abolidos representariam um óbice ao restabelecimento de sua homeostase.

Acredita-se que, em animais mais complexos, as células individuais, os tecidos e os órgãos sejam dirigidos por um complexo de osciladores primários e secundários⁽¹⁾. O período e a fase dos ritmos são coordenados por relógios-marcapasso, localizados em vários níveis da organização biológica, sendo aqueles localizados no cérebro, aparentemente, os mais importantes⁽⁶⁾. Não obstante, existem osciladores circadianos na retina, em ilhotas de Langerhans, no fígado, pulmões e em fibroblastos⁽¹¹⁾.

Conquanto os núcleos supraquiasmáticos sejam o principal marcapasso circadiano em roedores, eles, provavelmente, não são os únicos⁽¹²⁾. Em primatas, enquanto esses núcleos controlam o ciclo vigília-sono, a secreção de somatotrofina e ritmos comportamentais, um segundo oscilador parece ser responsável pelo controle do sono REM (*Rapid Eye Movements*), do cortisol sérico e da temperatura central⁽¹³⁾.

Não obstante a pineal atue como relógio biológico em vertebrados inferiores⁽¹⁴⁾, em mamíferos não há evidências de que a pineal, por si, seja capaz de gerar ritmos circadianos, além de estar claro que não é necessária para a expressão desses ritmos, em roedores⁽¹⁵⁾. Concluiu-se, entretanto, que, em mamíferos adultos, a melatonina atua modulando a fase e a força de acoplamento da ritmicidade circadiana⁽¹⁶⁾. Em humanos, por sua vez, há indicações de que essa indolamina pode atuar como *zeitgeber* interno⁽⁵⁾.

Embora os ritmos sejam dirigidos por oscilador(es) endógeno(s), o ambiente rítmico normal e os hábitos rítmicos também apresentam seus efeitos. Essas influências são os agentes *mascardores*. Mascaramento, portanto, são os efeitos diretos e imediatos, exercidos por sinais do ambiente sobre o ritmo expresso. Assim, efeitos *mascardores* são uma conseqüência natural e inevitável de se viver em um ambiente rítmico. Conseqüentemente, a expressão final de um ritmo é a mistura de efeitos *mascardores* com os efeitos gerados pelo sistema de temporização interna do animal⁽¹⁷⁾.

3- RITMOS ENDÓCRINOS

Uma característica notável do sistema endócrino é seu elevado grau de organização temporal⁽⁵⁾. O in-

teresse pelos ritmos biológicos aumentou grandemente, desde o reconhecimento do seu papel essencial em manter a função endócrina normal. Evidências, mostrando que estados patológicos estão associados a ritmos anormais, têm-se acumulado, e terapias que levam em conta a organização temporal da secreção endócrina foram desenvolvidas⁽⁸⁾.

A secreção de, provavelmente, todos os hormônios é afetada, de uma ou outra forma, pelo sistema do relógio circadiano⁽¹⁵⁾. Embora uma estrutura temporal, circadiana, do sistema endócrino esteja presente em nível celular e em órgãos, *inter alia*, é evidente que existe uma hierarquia de ritmos⁽¹⁸⁾.

Os ritmos endócrinos, bem como os demais ritmos biológicos, podem ser classificados de acordo com sua frequência de oscilação. Presumivelmente, em razão de sua ubiquidade nos seres vivos, a periodicidade circadiana (ritmos com períodos endógenos situados na faixa de 20 a 28 h) é usada para subdividir o espectro de ritmos biológicos em outras duas faixas: a faixa *ultradiana*, que inclui ritmos com períodos menores que 20 h, e a faixa *infradiana*, na qual os ritmos apresentam períodos maiores que 28 h⁽¹⁹⁾ (Tabela I).

Três diferentes tipos de mecanismos parecem interagir, para produzir os complexos padrões da secreção hormonal durante o ciclo de 24 h: pulsatilidade, ritmicidade circadiana e efeitos intrínsecos do sono⁽⁸⁾.

As implicações clínicas da ritmicidade circadiana, em Endocrinologia, dizem respeito tanto ao diagnóstico, quanto ao tratamento de patologias. Enquanto variações circadianas podem complicar a interpretação dos procedimentos de diagnóstico, elas podem, também, ser usadas para maximizar seu poder discriminatório, por selecionar, adequadamente, o momento de coleta da amostra que melhor diferenciará entre várias condições. Igualmente, melhores protocolos terapêuticos podem ser delineados, por levarem em conta as propriedades cronobiológicas do sistema⁽⁸⁾.

Assim, os valores medidos no exame clínico de um paciente incluirão, usualmente, tanto o componente endócrino do ritmo, quanto o mascaramento desse ritmo por fatores ambientais⁽²⁰⁾.

3.1- Variação Circadiana da Secreção de Insulina

O ritmo de insulina pode ser um importante mediador do controle neuroendócrino do metabolismo⁽²¹⁾. Nesse sentido, constatou-se que, em fígado de rato, insulina é o principal controlador da variação diária de síntese da proteína carreadora de esterol (SCP). Esta proteína é o mais importante regulador intracelular do metabolismo e transporte lipídicos, em hepatócitos⁽²²⁾. Assim, o período diário de elevada insulinemia pode ser importante para o controle da atividade lipogênica⁽²³⁾.

A função desempenhada por insulina, na regulação glicêmica, parece ser programada em base circadiana, ao invés de representar um fenômeno de retroalimentação, independente de tempo, como postulado pela hipótese homeostática convencional⁽²⁴⁾. Nesse sentido, há indicações de que os ritmos diários da insulinemia não são meras reações homeostáticas às variações da glicemia⁽²⁵⁾ ou à ingestão alimentar⁽²¹⁾.

DELATTRE, CIPOLLA-NETO & BOSCHERO, 1999⁽²⁶⁾, demonstraram variação circadiana da secreção de insulina, *in vitro*, em ilhotas isoladas de rato. Essa variação manifestou-se nos meios de incubação contendo glicose, nas concentrações de 100 e 150 mg/dL, portanto, na faixa fisiológica dessa dextrose. Nesses experimentos, ilhotas pancreáticas foram isoladas, com colagenase, do pâncreas de ratos Wistar, adultos, às 0, 4, 8, 12, 16 e 20 h. Grupos de cinco ilhotas foram incubados em tampão Krebs, com diferentes concentrações de glicose, durante uma hora, a 37 °C, sendo a insulina medida por radioimunoensaio. A secreção de insulina pelas ilhotas de rato (espécie de hábitos predominantemente noturnos) foi significativamente maior no período de ausência de luz, nas diferentes concentrações de glicose. Assim, neste período, a curva de resposta ao secretagogo está deslocada para a esquerda, conforme se pode observar na Figura 1. Resultados concordantes foram obtidos por outros pesquisadores⁽²⁷⁾, perfundindo ilhotas isoladas de rato.

A variação circadiana da secreção de insulina pode estar ligada a um ritmo endógeno da função da célula beta ou a uma ritmicidade de receptores de insulina, bem como à ritmicidade da ligação desse hormônio^(27,28). Sustentam a primeira hipótese várias linhas de investigação. Assim, demonstrou-se variação

Tabela I - Padrões de ritmos biológicos e seus respectivos períodos (T)

Ultradianos	$T < 20 \text{ h}$
Circadianos	$20 \text{ h} \leq T \leq 28 \text{ h}$
Infradianos	$T > 28 \text{ h}$
Circasseptanos	$T = 7 \pm 3 \text{ dias}$
Circatrigintanos	$T = 30 \pm 5 \text{ dias}$
Circanuais	$T = 1 \text{ ano} \pm 3 \text{ meses}$

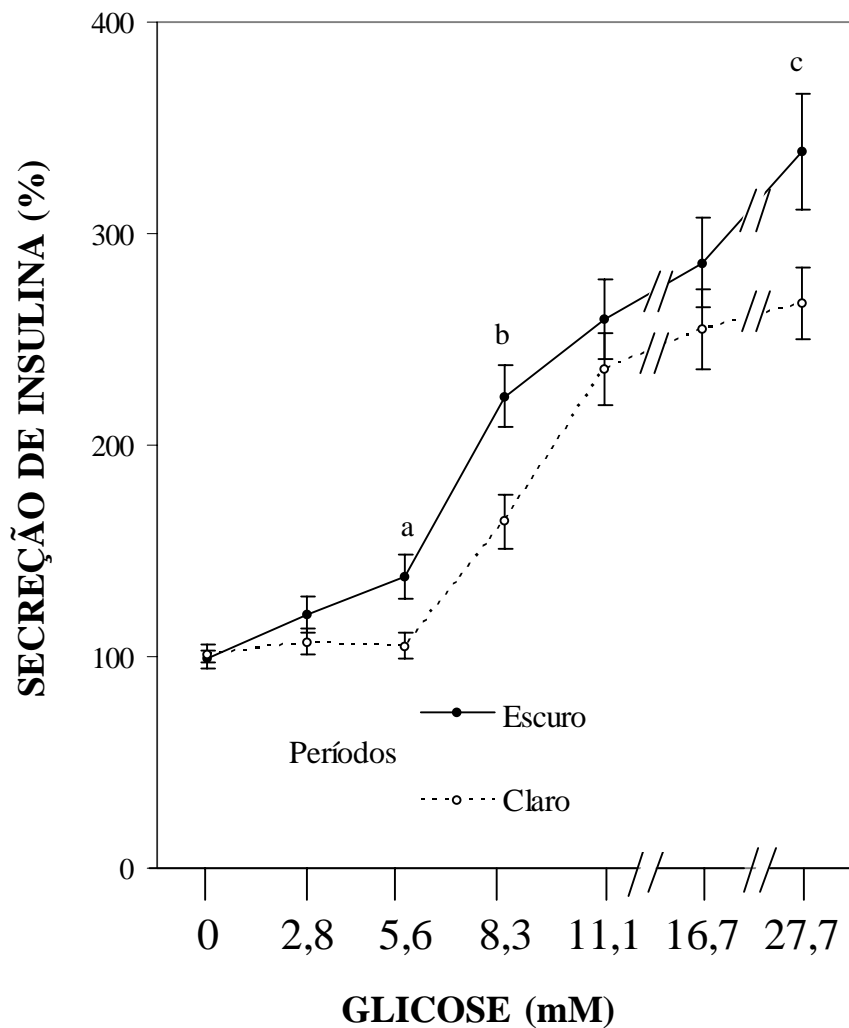


Figura 1 - Comparação dos efeitos de concentrações crescentes de glicose sobre a secreção de insulina, por ilhotas de Langerhans (grupos de cinco), isoladas de rato, entre experimentos realizados nos períodos *claro* (8,12 e 16 h) e *escuro* (20, 0 e 4 h) (horários de sacrifício dos ratos). As ilhotas foram incubadas por 60 min, a 37 °C, em tampão Krebs. Os valores de secreção (normalizados) representam a média (\pm epm) de 46 a 77 observações. a: $p < 0,005$ vs *claro*; b: $p < 0,0025$ vs *claro*; c: $p < 0,025$ vs *claro*. Modificado de DELATTRE, CIPOLLA-NETO & BOSCHERO⁽²⁶⁾.

circadiana do volume nuclear da célula beta⁽²⁹⁾. Igualmente, verificou-se variação circadiana da pulsatilidade *in vivo* dos peptídeos pancreáticos insulares⁽³⁰⁾. Finalmente, confirmou-se a existência de ritmo circadiano do peptídeo C, em indivíduos saudáveis⁽³¹⁾.

Em contraposição, a segunda hipótese é sustentada por investigações indicativas de variação circadiana da ligação de insulina aos receptores de hemácias ou de monócitos^(32,33). Ainda, nesse sentido, considera-se que a secreção de insulina seria modulada por alterações da sensibilidade dos tecidos peri-

féricos a esse hormônio⁽³⁴⁾.

O mecanismo de variação diária da secreção de insulina, em indivíduos normais, é desconhecido⁽³⁵⁾, mas parece ser, primariamente, endógeno em origem⁽²⁴⁾ e controlado diretamente por um oscilador circadiano, que influencia a secreção pancreática e o metabolismo de glicose, por meio de um sinal neural, modulado pelos núcleos supraquiasmáticos⁽³⁶⁾. Tal idéia é coerente com a verificação de que a lesão bilateral desses núcleos, em ratos, aboliu a ocorrência do ritmo diário da insulinemia⁽³⁷⁾.

3.2- Variação Circadiana da Glicemia e da Insulinemia em Humanos

Variação diária da tolerância à glicose foi, inicialmente, demonstrada por diferentes grupos de pesquisadores^(38/42). Outrossim, constatou-se variação circadiana, tanto da glicemia, quanto da insulinemia, em indivíduos submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT) oral⁽⁴²⁾. Vários grupos confirmaram aqueles achados, mostrando diminuição da tolerância à glicose no período da tarde e/ou da noite, comparada com a tolerância pela manhã^(43/51). Entretanto, a intensidade da variação diária desse teste foi significativa e inversamente relacionada ao grau de obesidade dos pacientes⁽⁵²⁾. Alguns grupos de pesquisadores, até mesmo, não detectaram variação circadiana da tolerância à glicose em pacientes nos quais essa tolerância é deficiente, tais como indivíduos obesos⁽⁵³⁾ ou pacientes diabéticos⁽⁵⁴⁾. Menores glicemias também foram observadas pela manhã, em experimentos em que refeições padronizadas foram ingeridas ao longo do dia⁽⁴³⁾.

Constatou-se que indivíduos normais reagiram ao GTT vespertino, tal como diabéticos moderados, atribuindo-se o fato à diminuída resposta inicial do pâncreas à glicose⁽⁵⁴⁾. Resultados semelhantes foram obtidos após administração endovenosa de glicose ou glicose mais glucagon⁽⁴⁸⁾. O termo *diabetes vespertino* passou a ser usado para descrever esse fenômeno, que reflete um decréscimo progressivo da tolerância à glicose, atingindo um mínimo na metade do período de sono, em indivíduos normais^(43,55).

Variação circadiana da insulina plasmática foi observada em humanos que ingeriram três refeições padronizadas durante o dia^(56,57). Diversos pesquisadores confirmaram essas constatações, ao registrarem maiores respostas secretórias de insulina no período matutino, tanto no GTT^(42,46,47,51,54,58,59), quanto após refeições padronizadas⁽⁶⁰⁾. Tais constatações repetiram-se em humanos saudáveis, após administração de glucagon⁽⁵⁹⁾ ou, ainda, em diabéticos tratados com diferentes hipoglicemiantes orais⁽⁵⁶⁾.

Em voluntários normais, submetidos ao GTT, verificou-se menor razão insulina/glicose, nos experimentos efetivados à tarde e à meia-noite⁽⁴¹⁾. Sugeriu-se que a causa desse fenômeno seria a variação circadiana do processo que regula a síntese e secreção de insulina⁽⁴¹⁾. Associou-se o declínio progressivo da tolerância a carboidratos, das 8 às 18 h, à redução da secreção de insulina, estimada pelo peptídeo C, bem como à redução da ação periférica de insulina⁽⁶¹⁾. Nesse sentido, detectou-se ritmo circadiano do peptídeo

C, em indivíduos saudáveis⁽⁶¹⁾. Por outro lado, utilizando-se *clamp* hiperglicêmico em humanos, demonstrou-se significativa variação da secreção de insulina, com maior secreção pela manhã, ao se administrar arginina, por via endovenosa⁽³⁵⁾.

Assim, inúmeros pesquisadores atribuíram a redução da tolerância à glicose, nos períodos vespertino e noturno, à diminuída resposta pancreática, interpretando que os maiores níveis glicêmicos, nos testes, nesses períodos, foram resultado da insulinopenia^(42,45,47,54,58,62,63). Igualmente, verificou-se que a resposta das células beta, à ingestão de refeição mista, apresenta variação ao longo do dia⁽⁶⁴⁾.

Portanto, a resposta das células beta a um estímulo particular parece, em parte, ser dependente da hora em que o estímulo é administrado⁽⁶⁵⁾. Nesse sentido, têm-se obtido resultados sugestivos de que a variação da resposta insulínica à glicose pode resultar de alterações circadianas da sensibilidade da célula beta, provocando maior responsividade pela manhã, com redução a partir daí^(42,51,66).

Do ponto de vista clínico, a hora do dia pode ser importante para o diagnóstico e tratamento das condições de diminuição da tolerância à glicose⁽⁵⁰⁾. Sugere-se que a hiperglicemia vespertina é o primeiro estágio no desenvolvimento de intolerância à glicose⁽⁵²⁾. Na seqüência de evolução da moléstia, ocorre perda do ritmo diário da secreção de insulina⁽⁶⁷⁾.

Estendendo as constatações acima, tem-se, também, demonstrado a ocorrência de ritmo circadiano da insulinemia em várias outras espécies de mamíferos^(25,68/73) e em aves⁽²¹⁾.

Por fim, deve-se ressaltar que, enquanto os ritmos circadianos expressam apenas uma frequência, na complexa estrutura temporal humana de múltiplas frequências^(20,74), o comportamento oscilatório ultradiano parece ser a regra, ao invés de exceção, no sistema endócrino^(5,75).

3.3- Variações Ultradianas

As oscilações ultradianas podem ser consideradas transições necessárias para uma eficiência máxima dos organismos, com utilização econômica de energia⁽⁷⁴⁾. Os ritmos ultradianos podem ser modulados por uma escala de tempo circadiana, isto é, a expressão ultradiana ocorre segundo um padrão rítmico circadiano⁽⁷⁴⁾. Talvez o melhor exemplo da modulação circadiana de ritmos ultradianos seja encontrado no sistema endócrino humano. Há evidências de que a fase, a amplitude e a frequência das oscilações ultradianas podem ser moduladas pela frequência circadiana^(15,74).

Os hormônios representam mensagens químicas. Neles, a informação é codificada na forma de variações de concentração, que podem ser graduadas (codificação analógica) ou pulsáteis (codificação digital), e a resposta apresenta-se em espícula⁽⁷⁶⁾. Quando a magnitude da resposta é continuamente graduada, ela é descrita como *amplitude modulada* (AM), que é facilmente observada em sistemas de codificação analógica, enquanto os sinais digitais, usualmente, codificam a informação por meio da frequência de espículas (modulação de frequência, FM)⁽⁷⁶⁾. Diversos mecanismos moduladores da amplitude e/ou da frequência da secreção hormonal, pulsátil ou oscilatória, foram identificados. Entre os preeminentes estão a modulação por retroalimentação, executada pelos hormônios periféricos, e a modulação determinada por sinais centrais, relacionados com a ritmicidade circadiana e o ciclo vigília-sono⁽⁵⁾.

O desenvolvimento e a aplicação de técnicas de mensuração hormonal, sensíveis, precisas e reproduzíveis, aliados a coletas frequentes de amostras, permitiu reconhecer-se que um grande número de hormônios é secretado de maneira pulsátil. Um exemplo de pulsatilidade resulta das medidas da insulina plasmática, conforme apresentado na Figura 2. Não obstante, deve-se atentar para o fato de que flutuações das concentrações hormonais plasmáticas refletem não somente variações da intensidade de secreção, mas, também, os efeitos da diluição, distribuição e degradação do hormônio⁽⁴³⁾.

A alteração da concentração hormonal pode ser o sinal, enquanto a mensagem pode estar no pulso e, não, no nível médio de fundo. Assim, a natureza dinâmica do pulso seria, por si, mais importante que o ponto de ajuste médio. Frequentemente, sistemas hormonais usam pulsações como forma de transmitir mensagens confiáveis, nas incertezas da circulação, cujo tamanho é desconhecido, diluindo, assim, o sinal, e através dos rins e fígado — removendo, portanto, uma quantidade imprevisível — para atingir uma célula cujo receptor encontra-se em estado incerto⁽⁷⁵⁾.

Vantagens biológicas - Diversas vantagens biológicas da transmissão pulsátil de sinais endócrinos e bioquímicos têm sido postuladas. Considera-se, em analogia com a engenharia de sistemas, que a regulação bioquímica, codificada por frequência, seria mais precisa e menos sujeita à degradação por ruído do que o controle dependente de amplitude⁽⁷⁷⁾. A aplicação de um modelo matemático genérico permitiu inferir que o fluxo de substratos, nas vias metabólicas, poderia ser intensificado por meio de oscilações nas

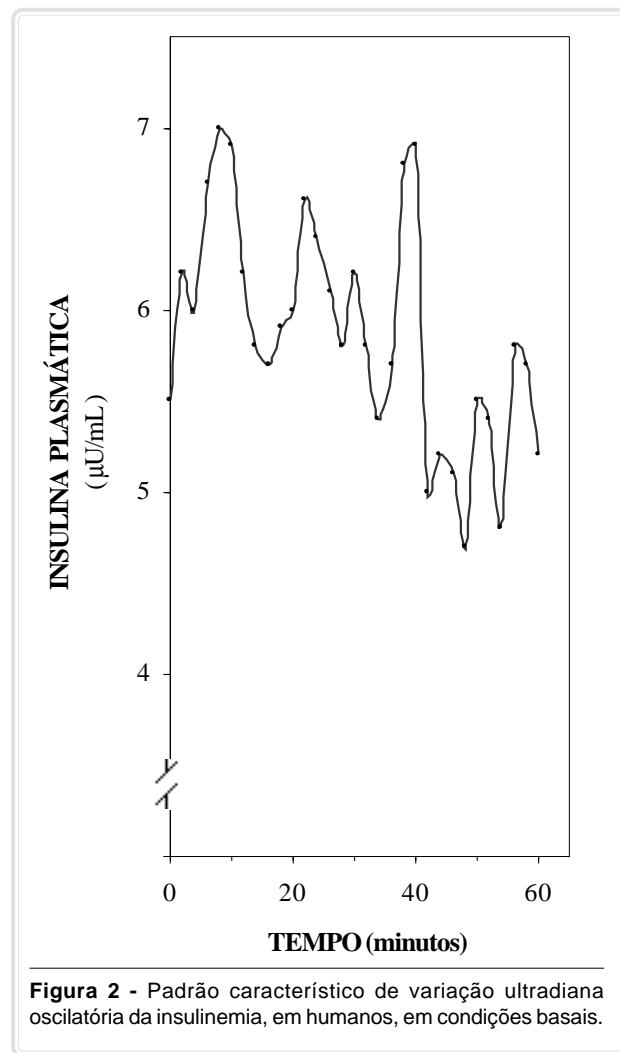


Figura 2 - Padrão característico de variação ultradiana oscilatória da insulinemia, em humanos, em condições basais.

concentrações de intermediários críticos, nessas vias⁽⁷⁸⁾. Outrossim, tem-se ressaltado que as pulsações são *econômicas*; mais precisas em propiciar controle; mais *seguras* que as curvas dose-resposta e permitem aos tecidos periféricos a opção de auto-regulação⁽⁷⁵⁾. Igualmente, tem-se usado o termo *pulse enhancement* para descrever a maior resposta integrada, por unidade de hormônio administrado, que é observada quando um sistema não linear é estimulado de maneira pulsátil, em contraposição à forma contínua⁽⁷⁹⁾. Sugeriu-se, também, que os sistemas biológicos que ciclam rapidamente são capazes de promover transições mais rápidas, para novos estados fisiológicos⁽⁸⁰⁾.

Finalmente, é importante ressaltar-se que o padrão oscilatório dos níveis de hormônio plasmático tem importância fisiológica, como redutor do processo de dessensibilização (*down regulation*) de receptores, aumentando, assim, a ação hormonal⁽⁸¹⁾. Um sinal pul-

sátil permite ao receptor produzir respostas máximas, de maneira repetida, porque o receptor pode se resensibilizar entre sucessivos pulsos, desde que haja tempo suficiente para fazê-lo. A existência de uma frequência ótima resulta da inter-relação entre as restrições antagônicas de produzir tantas respostas quantas possíveis em um dado tempo — o que requer a diminuição do intervalo de tempo entre os pulsos — e preservar a capacidade de produzir respostas de grande amplitude, o que requer o aumento desse intervalo⁽⁸²⁾.

3.4- Variações Ultradianas de Insulina

Oscilações ultradianas da secreção de insulina, com períodos entre 50 e 100 min, foram demonstradas, ao se perfundirem ilhotas isoladas de rato⁽⁸³⁾. Variações equivalentes, com períodos na faixa de 80 a 130 min, foram observadas, em humanos, em resposta a refeições⁽⁸⁴⁾, durante nutrição enteral contínua⁽⁸⁵⁾ e durante infusão constante de glicose⁽⁸⁶⁾. Nutrição enteral contínua, portanto, não impede a ocorrência de ritmo ultradiano da glicemia e da insulinemia⁽⁸⁷⁾.

A causa das oscilações ultradianas da secreção de glucagon e insulina, com período de 70 a 140 min, tem sido atribuída a mecanismos de retroalimentação negativa, entre glicose e insulina⁽⁸⁸⁾.

Por outro lado, a existência de ritmo ultradiano da insulinemia, com período de 6 h, foi demonstrada em humanos, utilizando-se a técnica de análise espectral⁽²⁴⁾.

Secreção pulsátil e oscilações plasmáticas

- Tem-se constatado que a hiperglicemia desencadeia a secreção de insulina, obedecendo a uma cinética baseada não apenas na curva dose-resposta. Desse modo, a secreção ocorre na forma de *pacote* finito — que provoca um *pulso* — após o que o pâncreas torna-se quiescente por cerca de 13 min. Há evidências de que a secreção é realmente *desligada* durante esse período e, então, reativada, dependendo da nova concentração de glicose resultante⁽⁷⁵⁾. Nessas condições, a glicemia pode reagir antes da ocorrência do próximo pulso, o que propicia maior precisão no controle da normoglicemia e evita o risco da hipoglicemia reativa⁽⁷⁵⁾.

Numerosos estudos confirmaram que a secreção da insulina humana é um complexo processo oscilatório, que inclui pulsos rápidos, recorrentes a cada 10 a 15 min, superpostos a oscilações ultradianas mais lentas, com períodos entre 90 e 120 min^(5,89,90,91). Não obstante, pulsos de maior frequência, com recorrência a cada 5 a 7 min, foram registrados por outros pesquisadores⁽⁹²⁾. Mostrou-se, em macacos, que as oscilações dos níveis plasmáticos de insulina foram simila-

res nos períodos imediatamente subseqüentes à ingestão alimentar, no período pós-absortivo imediato e após jejum prolongado⁽⁹³⁾. Em outro sentido, constatou-se, em humanos, significativa correlação entre as amplitudes dos ciclos simultâneos de insulina e glucagon plasmáticos⁽⁹⁴⁾.

Demonstraram-se, em cães, oscilações espontâneas dos quatro peptídios pancreáticos, com períodos situados na mesma faixa daqueles registrados em babuínos e em humanos⁽³⁰⁾. Assim, para o polipeptídio pancreático e somatostatina, os períodos situaram-se na faixa de 4 a 15 min⁽³⁰⁾. Por outro lado, em ratos, verificou-se a existência de oscilações da insulina sérica, *in vivo*, com período de 13,3 min⁽⁹⁵⁾, enquanto, em ilhotas isoladas, constataram-se oscilações da secreção de insulina, com período de 16 min⁽⁹⁶⁾. Igualmente, tem-se verificado, em humanos, que o aumento da concentração de glicose provoca aumento da amplitude, mas não da frequência, das oscilações da secreção de insulina⁽⁹⁷⁾. A ingesta alimentar provoca o mesmo efeito, além de não alterar a secreção basal⁽⁹⁸⁾. Em parcial discordância, estão resultados obtidos *in vivo*, em pâncreas de cães. Segundo seus autores, o mecanismo pelo qual a ingestão de glicose ativa a secreção de insulina inclui aumento de cerca de 400% da massa de insulina, secretada por *burst* (surto), bem como aumento de cerca de 40% da frequência de *bursts*⁽⁹⁹⁾.

Origem - A origem das oscilações ultradianas da glicemia e da insulinemia não está, ainda, totalmente esclarecida⁽⁵⁾. Propôs-se que oscilações dos níveis plasmáticos de insulina, em macacos, refletem oscilações secretórias, ao invés de oscilações do *clearance* metabólico⁽¹⁰⁰⁾. Tal hipótese baseia-se no fato de que oscilações dos níveis plasmáticos do peptídio C, secretado em razão equimolar com insulina, mas depurado diferentemente, a velocidade muito menor que insulina, correlacionam-se precisamente com as oscilações da insulina plasmática. Tais observações também foram confirmadas em humanos⁽⁸⁴⁾. Outrossim, concluiu-se que, em humanos, as oscilações da glicemia, enquanto freqüentemente associadas àquelas de insulina, não são responsáveis pelas oscilações da insulina plasmática, ou não são, para elas, essenciais⁽¹⁰¹⁾. A observação de oscilações, também durante infusão constante de glicose, indica que as mesmas não são dependentes da ingestão alimentar⁽¹⁰²⁾. Há, por outro lado, evidências experimentais de que as oscilações de glicose aumentam a disponibilidade dessa hexose⁽¹⁰³⁾.

A grande amplitude e consistência das oscilações da insulinemia, que provavelmente são reflexo

da secreção de insulina, sugerem que a atividade das células beta, distribuídas pelo pâncreas, deve ser altamente coordenada⁽¹⁰¹⁾. Uma questão fundamental é: como um milhão de ilhotas de Langerhans, distribuídas pelo pâncreas, cada uma contendo até milhares de células beta, são capazes de coordenar a secreção pulsátil de insulina?⁽⁹⁸⁾ Pâncreas isolado de cão, exposto a concentração constante de glicose (200 mg/dL), apresentou oscilações da secreção de insulina, com período de 8 a 12 min por ciclo, indicando que o próprio pâncreas é o *zeitgeber* dos ciclos de glicose e insulina, *in vivo*⁽¹⁰⁴⁾. Em pacientes com transplante de pâncreas, observou-se oscilação da secreção de insulina sob condição basal, bem como durante infusão constante de glicose. O período dominante dessas oscilações parece ser o dobro daquele observado em pâncreas de voluntários saudáveis⁽¹⁰⁵⁾.

O marcapasso que controla a secreção de insulina em humanos é notavelmente estável. Sua periodicidade não é afetada, quando a secreção de insulina é estimulada por glicose, tolbutamida ou bloqueadores alfa-adrenérgicos⁽¹⁰⁶⁾. É crença geral que as medidas, *in vivo*, dos níveis séricos de insulina refletem flutuações da secreção de insulina, e que o marcapasso dessas oscilações está localizado no próprio pâncreas^(81,107), apresentando sensibilidade alterada em vários estados nutricionais⁽⁹³⁾. Constatou-se que ilhotas desligadas do tecido pancreático continuam a secretar insulina de maneira pulsátil⁽¹⁰⁸⁾. Nesse sentido, observou-se que a geração dessa pulsatilidade não depende da inervação extrínseca⁽¹⁰⁹⁾, bem como, sugere-se, oscilações ultradianas podem ser independentemente geradas, a partir de uma fonte insular⁽⁸³⁾. Essas conclusões são concordantes com resultados anteriores, sugestivos de que o marcapasso da secreção de insulina é intrínseco à ilhota^(96,108). De outro modo, demonstrou-se, em tecido de insulinoma humano, que as células beta são capazes de gerar atividade secretória pulsátil de insulina, não dependente de inervação ou da presença de outras células insulares⁽¹¹⁰⁾. Também se demonstrou pulsatilidade inerente à célula beta, na atividade secretória de pró-insulina⁽¹¹⁰⁾. Diante disso, parece razoável assumir que a natureza pulsátil da secreção hormonal seja intrínseca à célula beta⁽¹¹¹⁾.

A secreção pulsátil de insulina está correlacionada com as oscilações da concentração citoplasmática de Ca^{2+} . As elevadas, porém intermitentes, concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} são adequadas para o desencadeamento da exocitose, mas reduzem os riscos de uma sobrecarga intracelular de Ca^{2+} , na célula beta⁽¹¹²⁾. Concentrações elevadas e prolongadas de

Ca^{2+} estão acopladas à iniciação de sinais da apoptose nas células⁽¹¹³⁾.

A secreção oscilatória de insulina estaria relacionada com um ciclo de 14 min da atividade glicolítica da célula beta, onde a glicólise atuaria como marcapasso⁽¹¹⁴⁾. Nessa linha de raciocínio, demonstrou-se acentuada similaridade entre os padrões da oscilação de lactato e insulina, durante perfusão de ilhotas por solução contendo glicose (300 mg/dL)⁽¹¹⁵⁾. A similaridade entre os períodos da oscilação de lactato e de insulina sugere a possibilidade de que as oscilações da glicólise podem prover um mecanismo para a secreção pulsátil de insulina. Consideram, entretanto, improvável que seja o lactato o fator gerador da flutuação de insulina. Uma hipótese lógica é que o metabolismo oscilatório seja responsável pela secreção rítmica de insulina, ao menos quando o estímulo é glicose^(116,117). Oscilações da via glicolítica provocam, sequencialmente, oscilações da razão ATP/ADP, atividade oscilatória dos canais de potássio sensíveis ao ATP, despolarização da membrana plasmática, influxo de cálcio e secreção de insulina, todos de maneira oscilatória⁽⁹⁸⁾. Entretanto, ainda não se demonstrou que uma interferência nesse padrão de metabolismo altera o padrão oscilatório de secreção⁽¹¹⁶⁾. É provável que a atividade de marcapasso, nas células beta, resulte da influência conjunta de vários metabólitos, em múltiplos sítios regulatórios do citosol e das mitocôndrias⁽¹¹⁸⁾.

Vantagens metabólicas - Flutuações regulares dos níveis plasmáticos de hormônios e substratos podem ter evoluído para aumentar não somente a estabilidade pela qual a glicose sanguínea é controlada no jejum, mas, também, a eficiência do armazenamento de carboidratos nos tecidos, nos períodos em que esses nutrientes estão disponíveis⁽¹⁰³⁾. Acredita-se que a secreção pulsátil sincrônica de glucagon e insulina seja um mecanismo pelo qual se limitam os efeitos hepáticos de insulina, mantendo-se, daí, a produção hepática de glicose, mas, permitindo-se suficientes concentrações periféricas de insulina, para inibir excessivo catabolismo⁽⁹⁴⁾.

É provável que a secreção pulsátil de insulina desempenhe importante função no controle metabólico, na situação de mudança do estado alimentar⁽¹¹⁹⁾. Uma possível adaptação é a promoção, por jejum, da redução do período das oscilações da secreção de insulina, com aumento de sua frequência. Tal ajuste é mediado pela interação entre o marcapasso intrapancreático e o sistema nervoso central. O encurtamento do período pode ser um mecanismo de redução da densidade de receptores de insulina. Período menor

(frequência maior) de oscilações pode provocar dessensibilização de receptores, porque um padrão de menores intervalos entre picos de insulina mais se assemelharia a um nível de secreção constante. A maior frequência das flutuações de insulina, associada a menor amplitude, acarretaria uma condição benéfica no jejum, reduzindo a responsividade tecidual à insulina secretada, por meio da dessensibilização de seus receptores. Considera-se que este seja um mecanismo pelo qual o suprimento limitado de glicose pode ser conservado para o sistema nervoso central, durante condições de jejum⁽¹¹⁹⁾. Em favor dessas explicações estão os resultados que mostram estreita associação entre o aumento da frequência de pulsos de insulina e um declínio da sensibilidade periférica à glicose⁽¹²⁰⁾. Este autor⁽¹²⁰⁾ considera que a frequência de pulsos pode ser o maior determinante da sensibilidade periférica à insulina, em indivíduos saudáveis. Ainda, segundo o mesmo⁽¹²⁰⁾, pulsos de insulina com frequência aumentada podem resultar em assincronia e excessiva exposição dos receptores à insulina, com subsequente indução de defeitos nos receptores e em etapas pós-receptores.

Patologias e outras alterações - Acredita-se que a perda da secreção oscilatória coordenada de insulina possa desempenhar um papel na patofisiologia do diabetes⁽⁸⁾. Em humanos acometidos de diabetes *mellitus* tipo 2, as oscilações ultradianas de alta frequência da secreção basal de insulina, comparadas às dos controles saudáveis, são menos regulares e mais rápidas, sendo reduzida sua associação com alterações similares das concentrações de glicose^(94,107,120,121), o que poderia contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina e para a intolerância à glicose. Em consequência, propôs-se que, nessa patologia, a sincronização por glicose, da célula beta anormal, é menos eficiente que em sujeitos normais⁽⁸³⁾. Um crescente corpo de dados experimentais, obtidos *in vitro* e *in vivo*, em humanos, sugere que a pulsatilidade aumenta a eficiência do acoplamento entre a secreção hormonal insular e a resposta ao hormônio. A perda, no diabetes tipo 2, do ciclo secretório de insulina com período de 10 a 14 min, é consistente com esse papel funcional, postulado para a secreção hormonal insular⁽¹²²⁾. Assim, parte da resistência periférica à insulina poderia ser atribuída à qualidade temporal prejudicada, da produção desse hormônio, em oposição à redução da quantidade total produzida⁽¹²³⁾. Corrobora essa idéia a demonstração, em humanos normais, de que insulina é mais efetiva em reduzir a glicemia, quando administrada por via endovenosa, de maneira oscilatória, por

meio de pulsos com períodos de 13 min⁽¹²³⁾ ou de 120 min⁽¹²⁴⁾, do que ao ser injetada sob fluxo constante.

Estudos, utilizando ilhotas de animais-modelo de diabetes, sugerem que a alteração do padrão da insulina plasmática decorreria da redução da amplitude do pulso de oscilação desse hormônio, ao invés de alterações de sua frequência⁽¹¹¹⁾. Menores amplitudes dos pulsos de insulina resultam em uma menor razão sinal/ruído e dificultam a discriminação desses pulsos⁽¹¹¹⁾. Há indicadores de que a frequência de pulsos da secreção de insulina não estaria alterada em indivíduos acometidos de diabetes tipo 2. Ao invés disso, a massa de insulina do pulso é que seria deficiente, talvez em razão de um decréscimo do *pool* de insulina, que pode ser secretado agudamente⁽¹²⁵⁾.

Tem-se constatado maior eficiência da insulina administrada de maneira pulsátil, ao reduzir a glicemia de pacientes acometidos de diabetes tipo 1⁽¹²⁶⁾. A maior ação hipoglicemiante, durante administração pulsátil, está, provavelmente, relacionada com a expressão de receptores de insulina, nos tecidos-alvo⁽¹¹¹⁾. Não obstante, tentativas de melhor controlar esse tipo de diabetes, por administração subcutânea pulsátil de insulina, foram infrutíferas⁽¹²⁷⁾. Outro efeito benéfico da administração pulsátil de insulina parece ser a redução da hiperglicagonemia, em diabéticos⁽⁸¹⁾.

As oscilações ultradianas da insulinemia apresentaram amplitude exagerada em humanos obesos, sem alterações aparentes da frequência ou do padrão de recorrência⁽⁶⁴⁾. Não obstante, em indivíduos saudáveis, não obesos, observou-se que aumento da gordura abdominal está associado com aumento da frequência de pulsos de insulina, na circulação periférica, o que pode ser um indicador precoce do estresse das células beta⁽¹²⁰⁾. Alterações da pulsatilidade também foram detectadas em indivíduos portadores de predisposição genética para a hipertensão essencial⁽¹²⁸⁾. Finalmente, demonstrou-se que pessoas idosas (*ca.* 80 anos), comparadas a jovens, apresentam, durante jejum, pulsatilidade desordenada e redução da amplitude dos pulsos⁽¹²⁹⁾.

Na terapia farmacológica, constatou-se que glicazida aumenta a secreção pulsátil de insulina, em pacientes com diabetes tipo 2. Administração aguda ou crônica dessa sulfoniluréia aumenta a massa dos surtos da secreção de insulina em cerca de 50%, sem interferir na periodicidade ou na regularidade dos pulsos⁽¹³⁰⁾. Outro hipoglicemiante oral, não pertencente à família da sulfoniluréias, a repaglinida, em administração aguda a voluntários normais, provocou efeitos semelhantes⁽¹³¹⁾.

O conjunto de resultados é indicativo da importância fisiológica das pulsações e ensejou a idéia de usar a análise da cinética da secreção de insulina como ferramenta diagnóstica, uma vez que essas alterações da ritmicidade das oscilações da insulina plasmática poderiam ser um marcador precoce do desenvolvimento do diabetes^(98,120,132).

Em síntese, esta revisão objetivou embasar o conhecimento dos ritmos endócrinos e, em especial, dos hormônios pancreáticos, demonstrando a impor-

tância das variações circadianas e ultradianas nessa glândula e, por extensão, na Endocrinologia. Essencialmente, todas as secreções hormonais apresentam acentuadas oscilações, o que evidencia um alto grau de organização temporal do sistema endócrino. Nas últimas décadas, têm-se investigado a função fisiológica e as implicações clínicas das oscilações temporais na secreção hormonal, passando-se a reconhecer a temporização como um elemento-chave no diagnóstico e no tratamento de várias patologias endócrinas.

DELATTRE E. Hormone rhythms of the endocrine pancreas: from the chronobiological fundamentals to the clinical implications. **Medicina, Ribeirão Preto**, 37: 51-64, jan./june 2004.

ABSTRACT: Initially the theoretical basis for the knowledge of the endocrine rhythms are presented, by taking into consideration that all hormonal secretions display stressed oscillations that denotes a high degree of temporal organization in the endocrine system. Next, the work reviews the rhythm of the endocrine pancreas, by pointing out the circadian and ultradian rhythms of insulin, due to its importance for the physiology and physiopathology of that organ. Both the results secured *in vitro* and those noticed clinically are presented. The biological reasons for the pulsatile hormones secretion in general are discussed as well as changes of that rhythm, in endocrine pancreas pathologies.

UNITERMS: Chronobiology. Endocrine Rhythms. Circadian Rhythm. Ultradian rhythm. Pulsatile release. Beta Cell. Insulin; secretion.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - MINORS DS & WATERHOUSE JM. Circadian rhythms and their mechanisms. **Experientia** 42:1-13, 1986.
- 2 - WETTERBERG L. Light and biological rhythms. **J Intern Med** 235: 5-19, 1994.
- 3 - WOLLNIK F. Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. **Lab Anim** 23: 107-125, 1989.
- 4 - PALUDETTI LA; AFECHE SC & BENEDITO-SILVA AA. Conceitos fundamentais. In: CIPPOLA-NETO J; MARQUES N & MENNA-BARRETO LS, eds. **Introdução ao estudo da cronobiologia**, Ícone, São Paulo, p. 25-63, 1988.
- 5 - VAN CAUTER E & TUREK FW. Endocrine and other biological rhythms. In: DeGROOT LJ, ed. **Endocrinology**, Saunders, Philadelphia, v.3, p. 2487-2548, 1995.
- 6 - SMOLENSKY MH & D'ALONZO GE. Medical chronobiology: concepts and applications. **Am Rev Respir Dis** 147: S2-S19, 1993.
- 7 - HALBERG F. Physiologic 24-hour periodicity: general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. **Z Vitam Horm Fermentforsch** 10: 225-296, 1959.
- 8 - VAN CAUTER E. Endocrine rhythms. In: ARENDT J; MINORS DS & WATERHOUSE JM, eds. **Biological rhythms in clinical practice**. Butterworth, London, p. 23-50, 1989.
- 9 - MOORE-EDE MC. Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. **Am J Physiol** 250: R737-752, 1986.
- 10 - REINBERG A & SMOLENSKY MH. Introduction to chronobiology. In: REINBERG A & SMOLENSKY MH, eds. **Biological rhythms and medicine**. Springer-Verlag, New York, p. 1-21, 1983.
- 11 - VOLLRATH L. Chronoendocrinologia – Quo vadis? **Ann Anat** 184: 583-593, 2002.
- 12 - MEIJER JH & RIETVELD WJ. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. **Physiol Rev** 69: 671-707, 1989.
- 13 - CIPOLA-NETO J. Fisiologia do sistema de temporização circadiana. In: MARQUES N & MENNA-BARRETO L, eds. **Introdução ao estudo da cronobiologia**, Ícone, São Paulo, p. 65-146, 1988.
- 14 - FOULKES NS; BORJIGIN J; SNYDER SH & SASSONE-CORSI P. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. **Trends Neurosci** 20: 487-492, 1997.

- 15 - TUREK FW. Circadian rhythms. **Recent Prog Horm Res** **49**: 43-90, 1994.
- 16 - ARENDT J. Role of the pineal gland and melatonin in circadian rhythms. In: **Melatonin and the mammalian pineal gland**. Chapman & Hall, Londres, p. 161-200, 1995.
- 17 - WATERHOUSE J & MINORS D. Masking and entrainment. **Adv Biosci** **73**: 163-171, 1988.
- 18 - SENSI S; PACE-PALITTI V & GUAGNANO MT. Chronobiology in endocrinology. **Ann Ist Super Sanita** **29**: 613-631, 1993.
- 19 - HALBERG F & REINBERG A. Rythmes circadiens et rythmes de basses frequences en physiologie humaine. **J Physiol** **59**: 117-200, 1967.
- 20 - HAUS E & TOUITOU Y. Principles of clinical chronobiology. In: TOUITOU Y & HAUS E, eds. **Biological rhythms in clinical and laboratory medicine**, Springer, Berlin, p. 6-34, 1992.
- 21 - TEDFORD BL & MEIER AH. Daily rhythm of plasma insulin in japanese quail (*Coturnix c. japonica*) fed *ad libitum*. **Comp Biochem Physiol** **104A**:143-145, 1993.
- 22 - HARGIS PM; OLSON CD; CLARKE SD & DEMPSEY ME. Hormonal triggering of the diurnal variation of sterol carrier protein. **J Biol Chem** **261**: 1988-1991, 1986.
- 23 - CINCOTTA AH & MEIER AH. Circadian rhythms of lipogenesis and hypoglycaemic responses to insulin in the golden hamster *Mesocricetus auratus*. **J Endocrinol** **103**: 141-146, 1984.
- 24 - MÉJEAN L; BICAKOVA-ROCHER A; KOLOPP M; VILLAUME C; LEVI F; DEBRY G; REINBERG A & DROUIN P. Circadian and ultradian rhythms in blood glucose and plasma insulin of healthy adults. **Chronobiol Int** **5**: 227-236, 1988.
- 25 - GAGLIARDINO JJ & HERNÁNDEZ RE. Circadian variation of the serum glucose and immunoreactive insulin levels. **Endocrinology** **88**:1529-1531, 1971.
- 26 - DELATTRE E; CIPOLLA-NETO J & BOSCHERO AC. Diurnal variations in insulin secretion and K⁺ permeability in isolated rat islets. **Clin Exp Pharmacol Physiol** **26**: 505-510, 1999.
- 27 - PESCHKE E & PESCHKE D. Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. **Diabetologia** **41**: 1085-1092, 1998.
- 28 - MÉJEAN L; KOLOPP M & DROUIN P. Chronobiology, nutrition and diabetes mellitus. In: TOUITOU Y & HAUS E, eds. **Biological rhythms in clinical and laboratory medicine**. Springer, Berlin, p. 375-85, 1992.
- 29 - HELLMAN B & HELLERSTRÖM C. Diurnal changes in the function of the pancreatic islets of rats indicated by nuclear size in the islet cells. **Acta Endocrinol** **31**: 267-281, 1959.
- 30 - JASPAN JB; LEVER E; POLONSKY KS & VAN CAUTER E. In vivo pulsatility of pancreatic islet peptides. **Am J Physiol** **251**: E215-E226, 1986.
- 31 - NICOLAU GY; HAUS E; LAKATUA DJ; BOGDAN C; POPESCU M; PETRESCU E; SACKETT-LUNDEEN L; STELEA P & STELEA S. Circadian and circannual variations in plasma immunoreactive insulin (IRI) and C-peptide concentrations in elderly subjects. **Endocrinology** **21**: 243-255, 1983.
- 32 - BECK-NIELSEN H & PEDERSEN O. Diurnal variation in insulin binding to human monocytes. **J Clin Endocrinol & Metab** **47**: 385-390, 1978.
- 33 - HUNG CT; BEYER J & SCHULZ G. Fasting and feeding variations of insulin requirements and insulin binding to erythrocytes at different times of the day in insulin-dependent diabetics assessed under the condition of glucose-controlled insulin infusion. **Horm Metab Res****18**: 466-469, 1986.
- 34 - LEVY I; RECASENS A; CASAMITJANA R & FIGUEROLA D. Nocturnal insulin and C-peptide rhythms in normal subjects. **Diabetes Care** **10**:148-151, 1987.
- 35 - LEE A; BRAY GA & KLETZKY O. Nocturnal growth hormone secretion does not affect diurnal variations in arginine and glucose-stimulated insulin secretion. **Metabolism** **40**: 181-186, 1991.
- 36 - SAKAGUCHI T; TAKAHASHI M & BRAY GA. Diurnal changes in sympathetic activity: relation to food intake and to insulin injected into the ventromedial or supra-chiasmatic nucleus. **J Clin Invest** **82**: 282-286, 1988.
- 37 - YAMAMOTO H; NAGAI K & NAKAGAWA H. Role of SCN in daily rhythms of plasma glucose, FFA, insulin and glucagon. **Chronobiol Int** **4**: 483-491, 1987.
- 38 - ROBERTS HJ. Afternoon glucose tolerance testing: a key to the pathogenesis, early diagnosis and prognosis of diabetic hyperinsulinism. **J Am Geriatr Soc** **12**: 423-472, 1964.
- 39 - BOWEN AJ & REEVES RL. Diurnal variation in glucose tolerance. **Arch Intern Med** **119**: 261-264, 1967.
- 40 - CAMPBELL IT; JARRETT RJ; RUTLAND P & STIMMLER L. The plasma insulin and growth hormone response to oral glucose: diurnal and seasonal observations in the Antarctic. **Diabetologia** **11**: 147-150, 1975.
- 41 - VERRILLO A; DE TERESA A & RUCCO E. Circadian variation in glucose tolerance and associated changes in plasma insulin and somatostatin levels in normal volunteers. **Boll Soc Ital Biol Sper** **60**: 2261-2266, 1984.
- 42 - APARICIO NJ; PUCHULU FE; GAGLIARDINO JJ; RUIZ M; LLORENS JM; RUIZ J; LAMAS A & DE MIGUEL R. Circadian variation of the blood glucose, plasma insulin and human growth hormone levels in response to an oral glucose load in normal subjects. **Diabetes** **23**: 132-137, 1974.
- 43 - VAN CAUTER E. Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine function: a minireview. **Horm Res** **34**: 45-53, 1990.
- 44 - SENSI S; CAPANI F; CARADONNA P; POLICICCHIO D & CAROTENUTO M. Comportamento nelle 24 ore della risposta insulinemica ad un costante e ripetuto carico di glucosio in soggetti normali. **Acta Diabetol Lat** **8**: 957-969, 1971.
- 45 - JARRETT RJ; BAKER IA; KEEN H & OAKLEY NW. Diurnal variation in oral glucose tolerance: blood sugar and plasma insulin levels morning, afternoon, and evening. **Br Med J** **1**: 199-201, 1972.
- 46 - SENSI S; CAPANI F; CARADONNA P & DELL'ACQUA GB. Circadian rhythm of immunoreactive insulin under glycemic stimulus. **J Interdiscipl Cycle Res** **4**: 1-13, 1973.
- 47 - 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** **1**: 485-488, 1974.
- 48 - COSCELLI C; ALPI O & BUTTURINI U. The response of glucose, insulin and FFA to intravenous glucose and glucagon in elderly subjects in the course of morning and afternoon tests. **Chronobiologia** **5**: 387-390, 1978.

- 49 - KOFINAS AD; MEIS PJ & ROSE JC. Gestational diabetes reverses the circadian variation of plasma insulin response to intravenous glucose. **Am J Obstet Gynecol** **159**: 607-611, 1988.
- 50 - VAN CAUTER E; BLACKMAN JD; ROLAND D; SPIRE J-P; REFETTOFF S & POLONSKY KS. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. **J Clin Invest** **88**: 934-942, 1991.
- 51 - LEE A; 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** **41**: 750-759, 1992.
- 52 - JARRETT RJ & KEEN H. Further observations on the diurnal variation in oral glucose tolerance. **Br Med J** **4**: 334-337, 1970.
- 53 - MARLISS EB; AOKI TT; UNGER RM; SOELDNER J & GAHILL GF. Glucagon levels and metabolic effects in fasting man. **J Clin Invest** **49**: 2256-2270, 1970.
- 54 - CARROLL KF & NESTEL PJ. Diurnal variation in glucose tolerance and insulin secretion in man. **Diabetes** **22**: 333-348, 1973.
- 55 - JARRETT RJ; VIBERTI GC & AL SAYEGH H. Does "afternoon diabetes" predict diabetes? **Br Med J** **1**: 548-549, 1978.
- 56 - RIGAS AN; BITTLES AH; HADDEN DR & MONTGOMERY DAD. Circadian variation of glucose, insulin, and free fatty acids during long-term use of oral hypoglycaemic agents in diabetes mellitus. **Br Med J** **4**: 25-28, 1968.
- 57 - MALHERBE C; DE GASPARO M; DE HERTOIGH R & HOET JJ. Circadian variations of blood sugar and plasma insulin levels in man. **Diabetologia** **5**: 397-404, 1969.
- 58 - WHICHELOW MJ; STURGE RA; KEEN H; JARRETT RJ; STIMMLER L & GRAINGER S. Diurnal variation in response to intravenous glucose. **Br Med J** **1**: 488-491, 1974.
- 59 - MELANI F; VERRILLO A; MARASCO M; RIVELLESIA; 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** **8**: 85-88, 1976.
- 60 - HAUTECOUVERTURE M; SLAMA G; ASSAN R & TCHOBRUTSKY G. Sex related diurnal variations in venous blood glucose and plasma insulin levels. Effects of estrogens in men. **Diabetologia** **10**: 725-730, 1974.
- 61 - SERVICE FJ; HALL LD; WESTLAND RE; O'BRIEN PC; GO VLW; HAYMOND MW & RIZZA RA. Effects of size, time of day and sequence of meal ingestion on carbohydrate tolerance in normal subjects. **Diabetologia** **25**: 316-321, 1983.
- 62 - JARRETT RJ & KEEN H. Diurnal variation of oral glucose tolerance: a possible pointer to the evolution of diabetes mellitus. **Br Med J** **2**: 341-344, 1969.
- 63 - GAGLIARDINO JJ; HERNÁNDEZ RE & REBOLLEDO OR. Chronobiological aspects of blood glucose regulation: a new scope for the study of diabetes mellitus. **Chronobiologia** **11**: 357-379, 1984.
- 64 - 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** **81**: 442-448, 1988.
- 65 - BYRNE MM; STURIS J; O'MEARA NM & POLONSKY KS. Insulin secretion in humans: physiologic regulation and alterations in disease states. In: LE ROITH D; TAYLOR SI & OLEFSKY JM, eds. **Diabetes mellitus**. Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 3-12, 1996.
- 66 - 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** **262**: E467-E475, 1992.
- 67 - WALSH CH & WRIGHT AD. Diurnal patterns of oral glucose tolerance in diabetics. **Post Grad Med J** **51**: 169-172, 1975.
- 68 - HOLLEY DC & EVANS JW. Effect of confinement on ovine glucose and immunoreactive insulin circadian rhythms. **Am J Physiol** **226**: 1457-1461, 1974.
- 69 - DE SOUZA CJ & MEIER AH. Circadian and seasonal variations of plasma insulin and cortisol concentrations in the syrian hamster, *Mesocricetus auratus*. **Chronobiol Int** **4**: 141-151, 1987.
- 70 - LESAULT A; ELCHINGER B & DESBALS B. Circadian rhythms of food intake, plasma glucose and insulin levels in fed and fasted rabbits. **Horm Metab Res** **23**: 515-516, 1991.
- 71 - JOLIN T & MONTES A. Daily rhythm of plasma glucose and insulin levels in rats. **Horm Res** **4**: 153-156, 1973.
- 72 - IWASHITA S; KIM Y-B; MIYAMOTO H; KOMURO M; TOKUYAMA K & SUZUKI M. Diurnal rhythm of plasma insulin and glucose in rats made obese by a high fat diet. **Horm Metab Res** **28**: 199-201, 1996.
- 73 - FISCHER U; FREYSE E-J; ALBRECHT G; GEBEL G; HEIL M & UNGER W. Daily glucose and insulin rhythms in diabetic dogs on the artificial beta cell. **Exp Clin Endocrinol** **85**: 27-37, 1985.
- 74 - ARAUJO JF & MARQUES N. Intermodulação de frequências dos ritmos biológicos. In: MARQUES N & MENNA-BARRETO L, eds. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. Edusp, São Paulo, p. 85-96, 1997.
- 75 - MATTHEWS DR. Physiological implications of pulsatile hormone secretion. **Ann N Y Acad Sci** **618**: 28-37, 1991.
- 76 - DUNCAN CJ. The evolution of frequency coding in intracellular signaling. **Med Sci Res** **23**: 651-653, 1995.
- 77 - RAPP PE; MEES AI & SPARROW CT. Frequency encoded biochemical regulation is more accurate than amplitude dependent control. **J Theor Biol** **90**: 531-544, 1981.
- 78 - KACZMAREK LKJ. Flux of labeled compounds in biochemical oscillations. **Am J Physiol** **237**: R350-R354, 1979.
- 79 - WEIGLE DS; KOERKER DJ & GOODNER CJ. A model for augmentation of hepatocyte response to pulsatile glucagon stimuli. **Am J Physiol** **248**: E681-E686, 1985.
- 80 - NEWSHOLME EA. Substrate cycles: their metabolic, energetic and thermic consequences in man. **Biochem Soc Symp** **43**: 183-205, 1978.
- 81 - LEFÈBVRE PJ; PAOLISSO G; SCHEEN AJ & HENQUIN JC. Pulsatility of insulin and glucagon release: physiological significance and pharmacological implications. **Diabetologia** **30**: 443-452, 1987.
- 82 - GOLDBETER A; DUPONT G & HALLOY J. The frequency encoding of pulsatility. In: CHADWICK DJ & GOODE JA, eds. **Mechanisms and biological significance of pulsatile hormone secretion**, Wiley, London, p. 19-45, 2000.
- 83 - CHOU H-F; BERMAN N & IPP E. Evidence for pancreatic pacemaker for insulin oscillations in low-frequency range. **Am J Physiol** **266**: R1786-R1791, 1994.

- 84 - SIMON C; FOLLENIUS M & BRANDENBERGER G. Postprandial oscillations of plasma glucose, insulin and C-peptide in man. **Diabetologia** **30**: 769-773, 1987.
- 85 - 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** **64**: 669-674, 1987.
- 86 - VAN CAUTER E; DÉSI R; DECOSTER C; FÉRY F & BALASSE EO. Nocturnal decrease in glucose tolerance during constant glucose infusion. **J Clin Endocrinol & Metab** **69**: 604-611, 1989.
- 87 - BRANDENBERGER G; SIMON C & FOLLENIUS M. Ultradian endocrine rhythms: a multioscillatory system. **J Interdiscipl Cycle Res** **18**: 307-315, 1987.
- 88 - KERN W; OFFENHEUSER S & FEHM HL. Entrainment of ultradian in the secretion of insulin and glucagon to the nonrapid eye movement/rapid eye movement sleep rhythm in humans. **J Clin Endocrinol Metab** **81**: 1541-1547, 1996.
- 89 - LANG DA; MATTHEWS DR; PETO J & TURNER RC. Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. **N Engl J Med** **301**: 1023-1027, 1979.
- 90 - SIMON C. Ultradian pulsatility of plasma glucose and insulin secretion rate: circadian and sleep modulation. **Horm Res** **49**: 185-190, 1998.
- 91 - LEVY JC. Insulin signaling through ultradian oscillations. **Growth Horm IGF Res** **11**, Suppl A:S17-23, 2001.
- 92 - PØRKSEN N; NYHOLM B; VELDHUIS JD; BUTLER PC & SCHMITZ O. In human at least 75% of insulin secretion arises from punctuated insulin secretory bursts. **Am J Physiol** **273**: E908-E914, 1997.
- 93 - HANSEN BC; JEN K-LC; KOERKER DJ; GOODNER CJ & WOLFE RA. Influence of nutritional state on periodicity in plasma insulin levels in monkeys. **Am J Physiol** **242**: R255-R260, 1982.
- 94 - LANG DA; MATTHEWS DR; BURNETT M; WARD GM & TURNER RC. Pulsatile, synchronous basal insulin and glucagon secretion in man. **Diabetes** **31**: 222-226, 1982.
- 95 - CHOU H-F; MCGIVERN R; BERMAN N & IPP E. Oscillations of circulating plasma insulin concentrations in the rat. **Life Sci** **48**: 1463-1469, 1991.
- 96 - BERGSTROM RW; FUJIMOTO WY; TELLER DC & DE HAËN C. Oscillatory insulin secretion in perfused isolated rat islets. **Am J Physiol** **257**: E479-E485, 1989.
- 97 - STURIS J; O'MEARA NM; SHAPIRO ET; BLACKMAN JD; TILLIL H; POLONSKY KS & VAN CAUTER E. Differential effects of glucose stimulation upon rapid pulses and ultradian oscillations of insulin secretion. **J Clin Endocrinol Metab** **76**: 895-901, 1993.
- 98 - SCHMITZ O; BROCK B; HOLLINGDAL M; JUHL CB & PØRKSEN N. High frequency insulin pulsatility and type 2 diabetes: from physiology and pathophysiology to clinical pharmacology. **Diabetes Metab** **28**: 4S14-4S20, 2002. Suppl.6
- 99 - PØRKSEN N; MUNN S; STEERS J; VELDHUIS JD & BUTLER PC. Effects of glucose ingestion versus infusion on pulsatile insulin secretion. The incretin effect is achieved by amplification of insulin secretory burst mass. **Diabetes** **45**: 1317-1323, 1996.
- 100 - KOERKER DJ; GOODNER CJ; HANSEN BW; BROWN AC & RUBENSTEIN AH. Synchronous sustained oscillation of C-peptide and insulin in the plasma of fasting monkeys. **Endocrinology** **102**:1649-1652, 1978.
- 101 - HANSEN BC; JEN K-LC; PEK SB & WOLFE RA. Rapid oscillations in plasma insulin, glucagon, and glucose in obese and normal weight humans. **J Clin Endocrinol & Metab** **54**: 785-792, 1982.
- 102 - 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** **67**: 307-314, 1988.
- 103 - MARSH BD; MARSH DJ & BERGMAN RN. Oscillations enhance the efficiency and stability of glucose disposal. **Am J Physiol** **250**: E576-E582, 1986.
- 104 - STAGNER JI; SAMOLS E & WEIR GC. Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. **J Clin Invest** **65**: 939-942, 1980.
- 105 - KERN W; BORN J; FEHM HL & KERNER W. Sustained oscillatory insulin secretion after pancreas transplantation. **Horm Metab Res** **22**: 644-646, 1990.
- 106 - MATTHEWS DR; LANG DA; BURNETT MA & TURNER RC. Control of pulsatile insulin secretion in man. **Diabetologia** **24**: 231-237, 1983.
- 107 - LANG DA; MATTHEWS DR; BURNETT M & TURNER RC. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. **Diabetes** **30**: 435-439, 1981.
- 108 - CHOU H-F & IPP E. Pulsatile insulin secretion in isolated rat islets. **Diabetes** **39**:112-117, 1990.
- 109 - SONNENBERG GE; HOFFMANN RG; JOHNSON CP & KISSEBAH AH. Low-and high-frequency insulin secretion pulses in normal subjects and pancreas transplant recipients: role of extrinsic innervation. **J Clin Invest** **90**: 545-553, 1992.
- 110 - CHOU H-F; IPP E; BOWSHER RR; BERMAN N; EZRIN C & GRIFFITHS S. Sustained pulsatile insulin secretion from adenomatous human b-cells. Synchronous cycling of insulin, C-peptide, and proinsulin. **Diabetes** **40**: 1453-1458, 1991.
- 111 - BERGSTEN P. Pathophysiology of impaired pulsatile insulin release. **Diabetes Metab Res Rev** **16**: 179-191, 2000.
- 112 - BERGSTEN P; GRAPENGIESSER E; GYLFE E; TENGHOLM A & HELLMAN B. Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. **J Biol Chem** **269** :8749-8753, 1994.
- 113 - TRUMP BF & BEREZESKY IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. **FASEB J** **9**: 219-228, 1995.
- 114 - LIPKIN EW; TELLER DC & DE HAËN C. Dynamic aspects of insulin action: synchronization of oscillatory glycolysis in isolated perfused rat fat cells by insulin and hydrogen peroxide. **Biochemistry** **22**: 792-799, 1983.
- 115 - CHOU H-F ; BERMAN N & IPP E. Oscillations of lactate released from islets of Langerhans: evidence for oscillatory glycolysis in b-cells. **Am J Physiol** **262**: E800-E805, 1992.
- 116 - TORNHEIM K. Are metabolic oscillations responsible for normal oscillatory insulin secretion? **Diabetes** **46**: 1375-1380, 1997.

- 117 - PRENTKI M; TORNHEIM K & CORKEY BE. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. **Diabetologia** **40**: S32-S41, 1997.
- 118 - MACDONALD MJ; AL-MASRI H; JUMELLE-LACLAU M & CRUZ MO. Oscillations in activities of enzymes in pancreatic islet subcellular fractions induced by physiological concentrations of effectors. **Diabetes** **46**: 1996-2001, 1997.
- 119 - SAFARIK RH; JOY RM & CURRY DL. Episodic release of insulin by rat pancreas: effects of CNS and state of satiety. **Am J Physiol** **254**: E384-E388, 1988.
- 120 - PEIRIS NA; STAGNER JI; VOGEL RL; NAKAGAWA A & SAMOLS E. Body fat distribution and peripheral insulin sensitivity in healthy men: role of insulin pulsatility. **J Clin Endocrinol Metab** **75**: 290-294, 1992.
- 121 - POLONSKY KS; GIVEN BD; HIRSCH LJ; TILLIL H; SHAPIRO ET; BEEBE C; FRANK BH; GALLOWAY JA & VAN CAUTER E. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med** **318**: 1231-1239, 1988.
- 122 - WEIGLE DS. Pulsatile secretion of fuel-regulatory hormones. **Diabetes** **36**: 764-775, 1987.
- 123 - MATTHEWS DR; NAYLOR BA; JONES RG; WARD GM & TURNER RC. Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. **Diabetes** **32**: 617-621, 1983.
- 124 - STURIS J; SCHEEN AJ; LEPROULT R; POLONSKI KS & VAN CAUTER E. 24-hour glucose profiles during continuous or oscillatory insulin infusion. Demonstration of the functional significance of ultradian insulin oscillations. **J Clin Invest** **95**: 1464-1471, 1995.
- 125 - BUTLER P. Pulsatile insulin secretion. In: CHADWICK DJ & GOODE JA, eds. **Mechanisms and biological significance of pulsatile hormone secretion**. Wiley, London, p. 190-205, 2000.
- 126 - PAOLISSO G; SCHEEN AJ; LUYCKX AS & LEFÉBVRE PJ. Pulsatile hyperglucagonemia fails to increase hepatic glucose production in normal man. **Am J Physiol** **251**: E1-E7, 1987.
- 127 - LEVY-MARCHAL C; ALBISSER AM & ZINMAN B. Overnight metabolic control with pulsed intermittent versus continuous subcutaneous insulin infusion. **Diabetes Care** **6**: 356-360, 1983.
- 128 - ANDERSEN UB; DIGE-PETERSEN H; FRANSEN EK; IBSEN H & VOLUND A. Basal insulin-level oscillations in normotensive individuals with genetic predisposition to essential hypertension exhibit an irregular pattern. **J Hypertens** **15**: 1167-1173, 1997.
- 129 - MENEILLY GS; RYAN AS; VELDHUIS JD & ELAHI D. Increased disorderliness of basal insulin release, attenuated insulin secretory burst mass, and reduced ultradian rhythmicity of insulin secretion in older individuals. **J Clin Endocrinol Metab** **82**: 4088-4093, 1997.
- 130 - JUHL CB; PØRKSEN N; PINCUS SM; HANSEN AP; VELDHUIS JD & SCHMITZ O. Acute and short-term administration of a sulfonylurea (gliclazide) increases pulsatile insulin secretion in type 2 diabetes. **Diabetes** **50**: 1778-1784, 2001.
- 131 - JUHL CB; PØRKSEN N; HOLLINGDAL M; STURIS J; PINCUS S; VELDHUIS JD; DEJGAARD A & SCHMITZ O. Repaglinide acutely amplifies pulsatile insulin secretion by augmentation of burst mass with no effect on burst frequency. **Diabetes Care** **23**: 675-681, 2000.
- 132 - HELLMAN B; BERNE C; GRAPENGIESSER E; GRILL V; GYLFE E & LUND PE. The cytoplasmic Ca²⁺ response to glucose as an indicator of impairment of the pancreatic beta-cell function. **Eur J Clin Invest** **20**: S10-17, 1990. Suppl. 1

Recebido para publicação em 28/04/2003

Aprovado para publicação em 08/01/2004