

Ricardo Barsaglini da Silva Leite

**DETERMINAÇÃO DA GRELINA ACILADA E DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES  
DURANTE TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE NA GESTAÇÃO  
NORMAL E NA GESTAÇÃO COMPLICADA POR DIABETES GESTACIONAL**

Belo Horizonte  
2009

Ricardo Barsaglini da Silva Leite

**DETERMINAÇÃO DA GRELINA ACILADA E DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES  
DURANTE TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE NA GESTAÇÃO  
NORMAL E NA GESTAÇÃO COMPLICADA POR DIABETES GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior

Belo Horizonte  
2009

Leite, Ricardo Barsaglini da Silva.  
L533d Determinação da grelina acilada e dos ácidos graxos livres durante teste de tolerância oral à glicose na gestação normal e na gestação complicada por diabetes gestacional [manuscrito]. / Ricardo Barsaglini da Silva Leite. -- Belo Horizonte: 2009.  
73f.: il.  
Orientador: Antônio Ribeiro de Oliveira Junior.  
Área de concentração: Saúde do Adulto.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Diabetes Gestacional. 2. Ácidos Graxos não-Esterificados. 3. Grelina/metabolismo. 4. Glicemia/metabolismo. 5. Gravidez. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Oliveira Junior, Antônio Ribeiro. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.  
NLM: WQ 248

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitor**

Prof. Ronaldo Tadêu Pena

### **Vice-Reitora**

Profa. Heloisa Maria Murgel Starling

### **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Profa. Elisabeth Ribeiro da Silva

### **Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor**

Prof. Francisco José Penna

### **Vice-Diretor**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

## **CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

### **Coordenador**

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

### **Subcoordenador**

Prof. Joel Alves Lamounier

### **Chefe do Departamento de Clínica Médica**

Prof. José Carlos Bruno da Silveira

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO**

### **Coordenador**

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

### **Subcoordenadora**

Profa. Tereza Cristina Abreu Ferrari

### **Colegiado**

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof. Nilton Alves de Rezende

Profa. Suely Meireles Rezende

Profa. Valéria Azeredo Passos

Elizabete Rosária de Miranda (Disc.Titular)

## RESUMO

O diabetes gestacional é sabidamente um estado de resistência à insulina. Torna-se, portanto, um excelente modelo para o estudo do comportamento de diversas variáveis metabólicas que apresentam alteração com relação à resistência insulínica. Essas variações ocorrem tanto no estado de jejum quanto no estado pós-prandial, motivo pelo qual o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) no diabetes gestacional pode ser utilizado para fins de estudos em resistência insulínica.

O objetivo do primeiro artigo deste trabalho é avaliar o comportamento da grelina acilada durante o TTOG em gestantes com e sem alteração no metabolismo glicêmico. A grelina é um hormônio peptídico produzido principalmente pelo estômago e seu receptor GHS-R1a, expresso principalmente na hipófise e hipotálamo. Entretanto, para a ligação ao receptor GHS-R1a é necessário a acilação de um de seus resíduos – a serina – tornando-a, assim, ativa. Apresenta uma variação circadiana típica em adultos normais, com aumento no estado pré-prandial e decréscimo no estado pós-prandial. A supressão prandial encontra-se prejudicada em várias patologias que apresentam resistência à insulina, como o diabetes e a síndrome do ovário policístico. No metabolismo glicêmico, a grelina acilada promove inibição tônica à secreção de insulina glicose estimulada e aumento da secreção hepática de glicose. Estas ações são supostamente antagonizadas pela grelina não ativa ou desacilada. Torna-se fundamental, portanto, analisar o efeito, padrão e regulação da grelina acilada no metabolismo glicêmico normal ou alterado pelo diabetes gestacional.

Para tal, foram recrutadas 41 mulheres: 28 gestantes realizaram o teste de tolerância oral à glicose (75g-2h-TTOG) após a 24<sup>a</sup> semana de gestação, enquanto outras treze mulheres saudáveis voluntárias, pareadas para o índice de massa corporal, também realizaram o mesmo TTOG e compuseram o grupo controle (NOR). As gestantes avaliadas foram separadas em grupos de acordo com as recomendações da Associação Americana de Diabetes (ADA) no Fourth Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus, sendo quinze gestantes portadoras de diabetes gestacional (GDM) e outras treze gestantes sem alterações no TTOG (GES). Foram determinados os valores basais e após 60 e 120 minutos de glicemia, insulina e grelina acilada.

A grelina acilada não apresentou diferença estatística entre os grupos no estado basal. Os grupos avaliados também não apresentaram variação estatística nos valores de grelina acilada durante o teste de tolerância oral à glicose, se comparado aos seus valores basais de grelina acilada. No entanto, quando comparamos as curvas de grelina acilada avaliadas durante o teste de tolerância à glicose, os grupos foram diferentes estatisticamente na análise de variância bi caudada para medidas repetidas ( $p = 0,018$ ). Ao aplicarmos o teste de Holm-Sidak para diferenciar os grupos durante o TTOG, foi detectada uma diferença entre os grupos GES e GDM aos 60 minutos, com o grupo GDM apresentando valores estatisticamente mais baixos ( $p = 0,006$ ).

Mostramos, assim, pela primeira vez, que a grelina acilada não apresenta supressão à sobrecarga de glicose na gestação com ou sem diabetes gestacional e em mulheres não gestantes pareadas para o índice de massa corporal. No entanto, a grelina acilada apresenta-se mais baixa aos 60 minutos no diabetes gestacional, quando comparada com gestantes sem

diabetes gestacional, apontando para a possibilidade de a grelina acilada apresentar um papel na fisiopatologia do diabetes gestacional.

Altos valores de ácidos graxos livres são descritos como relacionados à fisiopatologia da resistência à insulina. Os ácidos graxos livres foram anteriormente descritos como elevados no terceiro trimestre de gestação.

O objetivo do segundo artigo foi avaliar os ácidos graxos livres na gestação normal e complicada pelo diabetes gestacional, durante o teste de tolerância oral à glicose. Vinte mulheres – quatorze com diabetes gestacional e seis gestantes saudáveis – foram avaliadas no terceiro trimestre de gestação com teste de tolerância oral à glicose (100g-3h-TTOG). Foram determinados os valores de glicemia e dos ácidos graxos livres durante os quatro tempos. Mostramos declínio significativo dos ácidos graxos em ambos os grupos do jejum aos 60 minutos ( $p < 0,05$ ). O grupo com diabetes gestacional mostrou valores mais altos de ácidos graxos livres durante toda a curva, com diferença estatística entre os grupos demonstrada pelo teste de análise de variância bi caudada para medidas repetidas ( $p < 0,001$ ). Os valores dos ácidos graxos livres diminuem durante o TTOG no diabetes gestacional, mas permanecem ainda mais elevados quando comparados à gestação normal. Estes valores mais altos de ácidos graxos livres no grupo de pacientes com diabetes gestacional possivelmente encontram-se relacionados ao quadro de resistência à insulina do diabetes gestacional.

**Palavras-chave:** Diabetes gestacional. Ácidos graxos livres. Grelina. Grelina ativa. Grelina acilada. Metabolismo glicêmico. Gestação. Diabetes.

## ABSTRACT

The gestational diabetes is admittedly an insulin resistant state. It is thus an excellent model to study the pattern of many metabolic values that show differences in insulin resistant states. These differences occur during both the fasting state and the postprandial state. By this reason, the oral glucose tolerance test (OGTT) in gestational diabetes can be used with the purpose of studying insulin resistance.

The objective of our first study is to analyze the acylated ghrelin behavior during OGTT in pregnant women with and without glycemic metabolism disturbance. Ghrelin is an amino acid hormone predominantly produced by stomach, and its receptor GHS-R1a is expressed in pituitary and hypothalamus. However, to be bound, ghrelin has to be acylated in one of its serines residues changing to active form. It has a typical circadian rhythm in healthy human with raise in pre-prandial levels and decline after meals. This postprandial suppression is blunted in pathological conditions with insulin resistance as diabetes and polycystic ovary syndrome. In glycemic metabolism, acylated ghrelin seems to exert a tonic inhibitory regulation on glucose stimulated insulin secretion, and raises hepatic glucose output. These actions are supposed to be opposing by des-acyl ghrelin or non-active ghrelin. Thus, it is extremely important to analyze acyl ghrelin action, pattern and control in normal glycemic metabolism and in gestational diabetes.

For that purpose, a total of 41 women were recruited: 28 pregnant women underwent a routine oral glucose tolerance test (75g-2h-OGTT) after the 24<sup>th</sup> week of pregnancy, while another group of 13 non pregnant healthy volunteer women, matched to age and BMI, underwent the OGTT (control group, NOR). The pregnant women were assigned to two groups according to ADA's fourth Workshop Conference Criteria for Gestational Diabetes recommendations – fifteen pregnant women with gestational diabetes (GDM) and 13 healthy pregnant women (GES). Blood samples were drawn at baseline and 60, 120 min. after glucose overload for the determination of glucose, insulin and acylated ghrelin.

Acylated ghrelin did not show statistical difference in baseline values among groups. None of the groups show significant suppression of acylated ghrelin during OGTT, when compared with its basal acylated ghrelin levels. However, when we compared the acylated ghrelin curves during OGTT, we found statistical difference among the curves by two way ANOVA with repeated measures ( $p = 0.018$ ). When we used Holm-Sidak test to detect which group were different, a significant lower values occurred in GDM at 60 minutes, if compared to GES ( $p = 0.006$ ).

We have showed, for the first time, that acylated ghrelin was not suppressed during glucose overload in the pregnancy with or without gestational diabetes nor in pregnant women matched by BMI. Nevertheless, acylated ghrelin showed lower values at 60 minutes in gestational diabetes when compared with healthy pregnant women; leading to a possibility that acylated ghrelin has a role in the physiopathology of gestational diabetes.

High free fat acids levels are described to be involved in the physiopathology of insulin resistance. Free fat acids were described to be elevated at the third trimester of pregnancy. The objective of the second study was to evaluate the plasma free fat acids levels during oral

glucose tolerance test (OGTT) in normal pregnancy and in pregnancies complicated by gestational diabetes.

A total of 20 pregnant women – 14 pregnant with gestational diabetes and 6 healthy pregnant during third trimester – underwent an oral glucose tolerance test (100g-3h-OGTT). Blood samples were drawn for the determination of glucose and free fat acids at the 4 times.

We showed significant decline in free fat acids values in both groups from fasting to 60 minutes ( $p < 0.05$ ). The gestational diabetes group showed higher free fat acids values during all curve points, with significant difference by Two Way ANOVA Repeated Measures ( $p < 0.001$ ). Free fat acids values declines during OGTT in gestational diabetes but they remain at higher values when compared with normal pregnancy. These higher values in gestational diabetes may be explained by the insulin resistant state of gestational diabetes.

**Keywords:** Active ghrelin. Acylated ghrelin. Diabetes mellitus. Free fat acids. Gestational diabetes. Ghrelin. Glycemic metabolism. Pregnancy.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação Americana de Diabetes / American Diabetes Association
AGL	Ácidos Graxos Livres
AUC	Área Abaixo da Curva / Area Under the Curve
DMG	Diabetes Gestacional
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FFA	Free Fat Acids
GDM	Grupo Diabetes Gestacional / Gestational Diabetes Mellitus
GES	Gestação normal (grupo)
GSIS	Secreção de Insulina Estimulada pela Glicose / Glucose-Stimulated Insulin Secretion
HOMA	Modelo de Avaliação da Homeostase / Homeostatic Model Assessment
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase – Resistência à Insulina / Homeostatic Model Assessment – Insuline Resistance
hPL	Hormônio Lactogênico Placentário Humano / Human Placental Lactogen
IMC	Índice de Massa Corporal
NEFA	Non-Esterified Fatty Acids
NOR	Normal (grupo controle)
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
SEM	Erro Padrão das Médias / Standard Error of the Mean
TTOG	Teste de Tolerância Oral à Glicose

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Glicemia durante o TTOG.....	28
Figura 2: Insulina durante TTOG.....	29
Figura 3: Resistência à insulina.....	30
Figura 4: Grelina acilada durante TTOG .....	31
Figura 5: Glicose durante TTOG .....	41
Figura 6: Ácidos graxos livres durante TTOG.....	42
Figure 1: Glucose during OGTT.....	55
Figure 2: Insulin during OGTT .....	56
Figure 3: Comparison of HOMA-IR values .....	57
Figure 4: Acyl ghrelin during OGTT.....	58
Figure 5: Glucose during OGTT.....	68
Figure 6: Free fat acids (FFA) during OGTT .....	69

## SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	13
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 HIPÓTESES .....	18
3.1 HIPÓTESE EXPERIMENTAL .....	18
3.2 HIPÓTESE NULA .....	19
4 ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA GRELINA ACILADA (ATIVA) DURANTE O TESTE DE TTOG NO DIABETES GESTACIONAL.....	20
4.1 RESUMO.....	20
4.2 INTRODUÇÃO .....	21
4.3 MÉTODOS.....	22
4.3.1 PACIENTES.....	22
4.3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4.4 RESULTADOS .....	23
4.5 DISCUSSÃO .....	24
4.6 LEGENDAS .....	27
4.7 FIGURAS .....	28
4.8 REFERÊNCIAS .....	32
5 ARTIGO 2: OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES ESTÃO AUMENTADOS NO DIABETES GESTACIONAL DURANTE O TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (TTOG).....	36
5.1 RESUMO.....	36
5.2 INTRODUÇÃO .....	37
5.3 MÉTODOS.....	38
5.4 RESULTADOS .....	39
5.5 DISCUSSÃO .....	39
5.6 LEGENDAS .....	40
5.7 FIGURAS .....	41
5.8 REFERÊNCIAS .....	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	45
ANEXO 1: CIRCULATING ACYLATED GHRELIN LEVELS DURING OGTT TEST IN GESTATIONAL DIABETES .....	48
ABSTRACT .....	48
INTRODUCTION .....	49
METHODS.....	50
SUBJECTS.....	50
STATISTICAL ANALYSIS .....	51
RESULTS.....	51

<b>DISCUSSION</b> .....	<b>52</b>
<b>LEGENDS</b> .....	<b>54</b>
<b>FIGURES</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>59</b>

**ANEXO 2: FREE FATTY ACIDS (FFA) ARE INCREASED IN  
GESTATIONAL DIABETES DURING ORAL GLUCOSE TOLERANCE**

<b>TEST (OGTT)</b> .....	<b>63</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>63</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>63</b>
<b>METHODS</b> .....	<b>65</b>
<b>RESULTS</b> .....	<b>65</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>66</b>
<b>LEGENDS</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>70</b>

<b>ANEXO 3: FOLHA DE APROVAÇÃO</b> .....	<b>72</b>
--	-----------

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O controle do balanço energético e da homeostase glicêmica são funções essenciais ao metabolismo humano, sendo executadas por diversos hormônios inter-relacionados. A insulina é o principal hormônio na homeostase glicêmica e recebe influência de vários outros hormônios associados ao balanço energético, como a grelina. Alterações fisiológicas ou patológicas, como as determinadas pela gestação ou diabetes, afetam as relações e o comportamento destes hormônios, tanto no estado de jejum quanto no estado alimentado.

A segunda metade da gestação é caracterizada por uma redução de dois terços na sensibilidade à insulina.<sup>i</sup> O desenvolvimento de resistência à insulina no final da gestação é uma adaptação fisiológica normal que desvia energia materna do carboidrato para a oxidação lipídica, poupando glicose para o feto em crescimento. A insulina regula o metabolismo dos carboidratos e dos lipídios, que se apresentam alterados durante o diabetes gestacional. A gestante com diabetes gestacional apresenta um aumento na resistência à insulina acima do observado na gestação normal.<sup>ii</sup> Tanto um aumento na resistência insulínica quanto uma insuficiência na produção de insulina pelas células pancreáticas contribuem para o desenvolvimento do diabetes gestacional (DMG), fazendo com que o DMG e o diabetes tipo 2 tenham uma fisiopatologia similar. Além disso, o diabetes gestacional é considerado um fator de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 em mulheres, sendo descrita uma incidência de diabetes tipo 2 de 39,9% e de intolerância à glicose de 27% dez anos após uma gestação complicada por DMG.<sup>iii</sup> Um primeiro reconhecimento de mulheres com intolerância

---

<sup>i</sup> Kuhl C, Hornnes PJ, Andersen O. Etiology and pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 1985 Jun;34 Suppl 2:66-70.

<sup>ii</sup> Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Quiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Mar;282(3):E522-33.

<sup>iii</sup> Lauenborg J, Hansen T, Jensen DM, Vestergaard H, Mølsted-Pedersen L, Hornnes P, Loch H, Pedersen O, Damm P. Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population. *Diabetes Care* 2004;27(5):1194-9.

à glicose frequentemente ocorre na gravidez, sendo o DMG a alteração metabólica mais comum ocorrida ao final da gestação.<sup>iv</sup>

As razões para a grande redução da sensibilidade à insulina no DMG ainda não se encontram completamente elucidadas. O DMG, no entanto, resulta da elevação dos níveis de hormônios considerados diabetogênicos, como o hormônio lactogênico placentário (hPL), hormônio placentário do crescimento, progesterona e estrogênio.<sup>v</sup> Entretanto, existem razões para acreditar que outros fatores participem deste processo, como os ácidos graxos livres e hormônios intestinais como a grelina, GLP1 e GIP, uma vez que estes últimos influenciam diretamente a regulação da secreção de insulina e, portanto, o metabolismo dos carboidratos.

O DMG, por outro lado, tem se tornado um excelente modelo para o estudo do comportamento de diversas variáveis metabólicas que apresentam alteração com relação à resistência insulínica, variações que ocorrem tanto em jejum quanto no estado pós prandial, justificando assim a realização dos estudos durante o teste de tolerância oral à glicose. O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) é uma ferramenta comumente utilizada para estudo da homeostase glicêmica, assim como para o diagnóstico de distúrbios desta homeóstase. O primeiro artigo avalia o comportamento da grelina acilada, um hormônio intestinal, durante o TTOG em gestantes com ou sem DMG e em mulheres não grávidas pareadas para o índice de massa corporal. Já o segundo artigo avalia o comportamento dos ácidos graxos livres durante o TTOG em gestantes com ou sem DMG.

A grelina é um hormônio peptídeo de 28 aminoácidos, produzido principalmente pelo estômago, descrito inicialmente como o hormônio ligante do receptor de hormônio do crescimento tipo 1a (GHS-R1a).<sup>vi</sup> O GHS-R1a é predominantemente expresso na hipófise, mas também em menores quantidades na tireoide, pâncreas, baço, miocárdio e adrenal. Já a grelina é produzida predominantemente no estômago. Outras partes do intestino delgado e

---

<sup>iv</sup> Hod M, Merlob P, Friedman S, Schoenfeld A, Ovadia J. Gestational diabetes mellitus. A survey of perinatal complications in the 1980s. *Diabetes*. 1991 Dec;40 Suppl 2:74-8.

<sup>v</sup> Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30 Suppl 2:S112-9.

<sup>vi</sup> Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec;402(6762):656-60.

grosso, adrenal, átrio, mama, esôfago, tubas uterinas, tecido adiposo, rins, pulmão, linfonodos, pâncreas, próstata, testículos, pele, bexiga e tireoide também podem produzi-la.<sup>vii</sup>

A grelina apresenta uma grande variedade de funções fisiológicas, como promover a sensação de fome, participar da homeóstase energética e glicêmica, além de exercer efeitos gastrointestinais, cardiovasculares, pulmonares, ósseos e no sistema imunológico, proliferação e diferenciação celular e fisiologia óssea.<sup>viii</sup> A grelina é o primeiro hormônio natural que necessita que um de seus resíduos de serina seja acilado pelo ácido n-octanoico para ser ativada. Esta acilação é essencial para a ligação ao receptor GHS-R1a e consequente liberação de hormônio do crescimento e provavelmente para todas as outras ações endócrinas.<sup>ix</sup>

A grelina está envolvida no controle da ingestão alimentar e das reservas energéticas corporais. Quando administrado por via central ou periférica leva ao aumento da ingestão calórica em ratos e humanos.<sup>x</sup> Os níveis séricos de grelina apresentam um ritmo circadiano, com elevações pré-refeições e queda imediatamente após ingestão alimentar, reafirmando o seu potencial envolvimento na sensação de fome e também de saciação.<sup>xi</sup> Na obesidade, os valores da grelina são inferiores, ditos suprimidos, quando comparados com pessoas de peso na faixa considerada normal.<sup>xii</sup> Também a supressão da grelina pós-prandial está atrasada e diminuída nas pessoas obesas, mostrando uma correlação entre a obesidade e a regulação da grelina.<sup>xiii</sup> A resistência insulínica desencadeada pela obesidade seria potencialmente

---

<sup>vii</sup> Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2988.

<sup>viii</sup> Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002;440(2-3):235-54.

<sup>ix</sup> Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Dec;279(3):909-13.

<sup>x</sup> Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec 2001;86(12):5992.

<sup>xi</sup> Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50(8):1714-9.

<sup>xii</sup> Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest.* 2001 Jun;24(6):RC19-21.

<sup>xiii</sup> English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2984.

responsável pelos níveis baixos ou suprimidos de grelina nos obesos.<sup>xiv</sup> A supressão prandial é também reduzida em várias outras patologias associadas à resistência à insulina, como diabetes<sup>xv</sup>, síndrome do ovário policístico<sup>xvi</sup> e acromegalia.<sup>xvii,xviii</sup> O achado de grelina aumentada na Síndrome de Prader Willi, condição na qual a obesidade não se encontra associada à resistência insulínica, corroboram com a ideia da correlação entre a sensibilidade à insulina e níveis plasmáticos de grelina.<sup>xix</sup>

Diante destas evidências, a contrarregulação da grelina é potencialmente atribuída à insulina.<sup>xx,xxi</sup> No entanto, outros hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal podem estar envolvidos nesta regulação, apesar da importância de cada um deles ainda necessitar de melhor elucidação. Outros autores, entretanto, demonstraram ausência de uma ação direta da insulina sobre o comportamento da grelina.<sup>xxii</sup> Por outro lado, a grelina acilada parece produzir uma inibição tônica da secreção de insulina glicose estimulada e ainda aumentar a secreção hepática de glicose<sup>xxiii</sup>. Estas ações são potencialmente antagonizadas pela des-acil

---

<sup>xiv</sup> McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Oct;89(4):1630-5.

<sup>xv</sup> Le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatti MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):1068-71.

<sup>xvi</sup> Cappiello V, Ronchi C, Morpurgo PS, Epaminonda P, Arosio M, Beck-Peccoz P, Spada A. Circulating ghrelin levels in basal conditions and during glucose tolerance test in acromegalic patients. *Eur J Endocrinol.* 2002 Apr;147(2):189-94.

<sup>xvii</sup> Barber TM, Casanueva FF, Karpe F, Lage M, Franks S, McCarthy MI, Wass JA. Ghrelin levels are suppressed and show a blunted response to oral glucose in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2008 Apr;158(4):511-6.

<sup>xviii</sup> Anderwald C, Brabant G, Bernroider E, Horn R, Brehm A, Waldhäusl W, Roden M. Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2003 Jul;52(7):1792-8.

<sup>xix</sup> Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50(8):1714-9.

<sup>xx</sup> Cummings DE, Clement K, Purnell JQ et al. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 2002;8(7):643-4.

<sup>xxi</sup> Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi EK, Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Aug;87(8):3997-4000.

<sup>xxii</sup> Caixás A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrère B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Apr;87(4):1902.

<sup>xxiii</sup> Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJD, Abribat T, van Koetsveld PM, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the

grelina,<sup>xxiv</sup> tornando-se, portanto, fundamental analisar o efeito e regulação da grelina acilada e des-acilada no metabolismo glicêmico.

Os ácidos graxos livres apresentam-se elevados ao final da gestação. Estudos clínicos em humanos já demonstraram que a elevação plasmática dos valores de ácidos graxos livres inibe a captação da insulina glicose estimulada em pessoas saudáveis e também em portadores de diabetes tipo 2 (DM2).<sup>xxv</sup> O aumento dos ácidos graxos livres durante a gestação parece estar relacionado à ação lipolítica dos hormônios placentários, em especial o hormônio lactogênico placentário (hPL), que alcança valores altos no último trimestre da gestação. Estudo anterior mostrou que gestantes com diabetes gestacional apresentam valores basais de ácidos graxos livres maiores que gestantes sem alterações no metabolismo glicêmico<sup>xxvi</sup>, apesar destes achados ainda necessitarem de confirmação por outros grupos. Desta forma, os ácidos graxos livres parecem estar implicados na patogênese da resistência insulínica da gestação e do DMG<sup>xxvii</sup>.

O objetivo do segundo estudo foi avaliar de forma dinâmica, através do TTOG, o comportamento dos ácidos graxos livre nas gestantes com DMG quando comparadas às gestantes saudáveis.

---

combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Oct;89(10):5035-42.

Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Feb;90(2):1055-60.

<sup>xxiv</sup> Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA, van de Zande B, Delhanty PJD, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen APN, and van der Lely AJ. Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Jun;293(3):E697-704.

<sup>xxv</sup> Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2003 May;111(3):121-124.

<sup>xxvi</sup> Chen X, Scholl TO. Association of elevated free fatty acids during late pregnancy with preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 2008 Aug;112(2 Pt 1):297-303.

<sup>xxvii</sup> Bomba-Opon D, Wielgos M, Szymanska M, Bablok L. Effects of free fatty acids on the course of gestational diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 Feb-Apr;27(1-2):277-80.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

Avaliar os níveis circulantes de grelina ativa e dos ácidos graxos livres durante teste de tolerância oral à glicose em grávidas com e sem diabetes gestacional.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Relacionar as alterações dos níveis de grelina acilada com a fisiopatologia do diabetes gestacional;
- relacionar as alterações dos níveis de grelina acilada com a fisiopatologia da resistência à insulina;
- relacionar as alterações dos níveis dos ácidos graxos livres com a fisiopatologia do diabetes gestacional;
- relacionar as alterações dos níveis dos ácidos graxos livres com a resistência à insulina.

## **3 HIPÓTESES**

### **3.1 Hipótese experimental**

As gestantes com diabetes gestacional apresentarão alterações significativas nos valores de grelina acilada durante o teste de tolerância oral à glicose quando comparados a gestantes normais e mulheres não grávidas pareadas pela idade e índice de massa corporal.

As gestantes com diabetes gestacional apresentarão valores significativamente diferentes de ácidos graxos livres durante o teste de tolerância oral à glicose quando comparadas às gestantes normais.

### **3.2 Hipótese nula**

Não haverá diferença significativa entre os valores de grelina acilada entre o grupo de gestantes com diabetes gestacional, gestantes normais e mulheres não grávidas pareadas pela idade e índice de massa corporal.

Não haverá diferença significativa nos valores de ácidos graxos livres entre o grupo de gestantes normais e diabetes gestacional.

## 4 ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA GRELINA ACILADA (ATIVA) DURANTE O TESTE DE TTOG NO DIABETES GESTACIONAL

*Ricardo Barsaglini Leite, Guilherme Fagundes Nascimento, Mariana Ferreira Bizzi, Paulo Augusto*

*C. Miranda, Anelise Impelizeri Nogueira, Rodrigo Bastos Foscolo e Antônio Ribeiro de Oliveira*

*Junior\**

### 4.1 Resumo

A grelina é um hormônio peptídico com 28 aminoácidos, produzido predominantemente pelo estômago, mas também detectável em muitos tecidos com uma multiplicidade de funções fisiológicas que afetam a ingestão de alimentos, o metabolismo energético, a homeostase da glicose, entre outras. Os níveis de grelina geralmente aumentam no estado pré-prandial e são suprimidos após as refeições. Entretanto, esta supressão pós-prandial pode estar atenuada em condições patológicas associadas à resistência à insulina como a obesidade e o diabetes. A sensibilidade à insulina diminui durante a gestação, porém o diabetes gestacional representa um estado ainda mais acentuado da resistência à insulina. A grelina provavelmente exerce uma inibição tônica na secreção de insulina através de sua forma acilada. Com o objetivo de avaliar os níveis de grelina ativa durante o TTOG em gestantes com e sem diabetes gestacional, um total de 28 mulheres grávidas submeteram-se ao teste de tolerância oral a glicose (75g-2h-TTOG) após a 24ª semana da gravidez [quinze com diabetes gestacional (GDM) e treze com gestação normal (GES)]. Outras treze mulheres saudáveis não grávidas foram recrutadas para se submeterem ao TTOG como controles (NOR). As amostras foram colhidas nos tempos 0, 60 e 120 minutos, para realização de glicose, insulina e grelina acilada. Não encontramos nenhuma diferença significativa na grelina acilada entre os grupos no tempo 0. A grelina acilada no grupo GDM mostrou-se mais baixa durante o TTOG quando comparado a GES e NOR, especialmente aos 60 minutos ( $P < 0,01$ ). Mostramos pela primeira vez que a grelina acilada tem valores similares em mulheres não grávidas e grávidas saudáveis, embora a grelina acilada possa ter valores ainda mais baixos no diabetes gestacional durante o TTOG.

**Palavras-chave:** Diabetes gestacional. Grelina ativa. Metabolismo da glicose. Gravidez. Diabetes.

**Título resumido:** Grelina acilada no diabetes do gestacional

---

\* Laboratório de Endocrinologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

## 4.2 Introdução

A grelina é um hormônio peptídico de 28 aminoácidos produzido predominantemente pelo estômago, primeiramente caracterizado como um ligante natural do receptor secretor de GH do tipo 1a GHS-R1a, que apresenta forte capacidade de liberação de GH<sup>1</sup>. O GHS-R1a é expresso predominantemente na hipófise e em níveis mais baixos na glândula de tireoide, no pâncreas, no baço, no miocárdio, e na glândula adrenal. Em contraste, a grelina é produzida no estômago, mas apresenta também expressão importante em diversos outros órgãos e tecidos<sup>2</sup>. A grelina apresenta uma grande variedade de funções fisiológicas, como promover a sensação de fome, participar da homeóstase energética e glicêmica, além de exercer efeitos gastrointestinais, cardiovasculares, pulmonares, ósseos e no sistema imunológico, proliferação e diferenciação celular e fisiologia óssea<sup>3</sup>. A grelina é o primeiro hormônio natural conhecido em que o grupo hidroxila de um dos seus resíduos do serina é acilado pelo ácido n-octanoico. Esta acilação é essencial para ligação ao GHS-R1a, liberação de GH, e também, provavelmente, para suas outras ações endócrinas<sup>4</sup>.

As concentrações plasmáticas de grelina em jejum são correlacionadas negativamente com a massa corporal, e apresentam um aumento no tempo pré-prandial e uma queda no tempo das refeições<sup>5</sup>, alcançando um nadir de até 69% dos níveis da linha de base após uma refeição<sup>6</sup>. Os níveis de grelina são aumentados sob condições de balanço energético negativo e reduzidos em estados de balanço energético positivo, sugerindo a participação da grelina na regulação da fome e metabolismo energético. Esta supressão pós-prandial foi descrita atenuada em muitas condições patológicas tais como a obesidade, o diabetes e outras condições que apresentem resistência à insulina, incluindo a acromegalia e a síndrome dos ovários policísticos<sup>7-10</sup>. Certamente, a grelina correlaciona-se inversamente tanto com a resistência à insulina quanto com a concentração em jejum de insulina<sup>11</sup>. A sensibilidade à insulina diminui progressivamente na segunda metade da gestação; o diabetes gestacional se sobrepõe naquelas gestantes que não superam esta resistência à insulina, aumentando a secreção de insulina<sup>12</sup>.

Muitos autores sugerem que a insulina age como contrarregulador negativo da secreção de grelina<sup>13-14</sup>; entretanto esta não é uma questão aceita por todos<sup>15</sup>. Notavelmente, a grelina parece exercer uma ação permissiva na secreção de insulina induzida pela glicose. Ela age como um inibidor tônico através de sua forma acilada<sup>16</sup>. Também é atribuída à grelina acilada

o aumento na glicose plasmática através de maior liberação de glicose hepática em jejum <sup>17</sup>. Não obstante, esta ação é antagonizada pela forma não acilada de grelina <sup>18</sup>; motivo pelo qual é importante analisar o padrão e regulação da grelina pela sua forma acilada no metabolismo glicêmico. Embora muito seja estudado sobre grelina acilada, pouco é conhecido sobre sua secreção na gestação, especialmente no DMG. O objetivo deste estudo foi analisar o padrão dinâmico da grelina acilada durante o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em mulheres grávidas com DMG, uma condição muito prevalente de resistência à insulina.

### **4.3 Métodos**

#### ***4.3.1 Pacientes***

Um total de 43 mulheres foram inicialmente recrutadas dos ambulatórios de diabetes gestacional do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte e do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte no primeiro semestre de 2008. Submeteram-se ao teste oral da tolerância à glicose (75g-2h-TTOG) após a 24<sup>a</sup> semana de gravidez. As mulheres que apresentavam doenças crônicas como diabetes e hipertensão, em uso de qualquer medicação, incluindo contraceptivos hormonais ou fumantes, foram excluídas prontamente do estudo.

Um total de trinta mulheres grávidas foi incluído no estudo. As gestantes foram distribuídas em dois grupos de acordo com a interpretação do TTOG, baseando-se nos critérios da Associação Americana de Diabetes (19) para o diabetes gestacional: diabetes gestacional (GDM: dois valores ou mais anormais de glicose no TTOG) ou tolerância normal a glicose (GES: nenhum valor anormal de glicose no TTOG). Outras treze mulheres saudáveis, não grávidas, pareadas em idade e índice de massa corporal (IMC) aos dois outros grupos, foram recrutadas como grupo controle (NOR).

O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê local de ética em pesquisa. Cada paciente assinou um termo de consentimento elaborado em conformidade com a resolução 196/96 sobre pesquisa em humanos.

Todos os TTOG foram executados entre 07h00 e 08h00 na manhã após jejum noturno de oito horas. Amostras de sangue foram colhidas no tempo 0 para glicose, insulina e grelina acilada seguidos pela ingestão de 75 g de dextrosol. Novas amostras foram colhidas em 60 e 120 minutos para os mesmos procedimentos. As amostras de plasma foram coletadas em tubos de EDTA resfriados, e centrifugados imediatamente e armazenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise. A grelina acilada foi determinada usando o *kit* comercial de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA – Millipore, EZGRA-88K, St. Charles, Missouri, EUA). A insulina também foi dosada utilizando um *kit* de ELISA, e os níveis de glicose foram determinados por quimiluminescência (BIOCLIN/QUIBASA, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Todas as amostras foram dosadas em duplicata. O coeficiente de variação intraensaio foi menor que 10% para todos os exames.

#### **4.3.2 Análise estatística**

Os dados são apresentados como: médias  $\pm$  erro padrão das médias (SEM). A glicose, a insulina, o índice do modelo de avaliação da homeóstase (HOMA-IR)<sup>20</sup> e a grelina acilada foram comparados entre grupos por análise de variância bi caudada para medidas repetidas seguidas pelo método de Holm-Sidak. Um valor de ( $p < 0.05$ ) foi considerado como significativo. Todas as análises estatísticas foram executadas usando o *software* Sigma Stat (*software* 2008 de Systat, SigmaPlot para Windows 11.0.0.77, Alemanha).

#### **4.4 Resultados**

Os grupos GDM e GES realizaram os exames em semanas de gestação similares (GDM  $29,29 \pm 2,58$ ; GES  $30,00 \pm 3,68$ ).

Como indicada na Figura 1, os três grupos (GDM, GES, NOR) mostraram curvas diferentes de glicose durante o TTOG ( $p < 0,05$ ). Os valores ao tempo 0 já se mostravam diferentes entre os grupos: o grupo GDM mostrou os valores mais elevados enquanto o grupo GES apresentou os valores mais baixos ( $p < 0,05$ ). Além disso, o grupo GDM exibiu valores mais elevados do que os grupos GES e NOR em todos os tempos ( $p < 0,001$ ). Os grupos GES e

NOR não mostraram diferenças significativas em níveis da glicose após a sobrecarga de glicose durante o teste.

Como mostrado na Figura 2, os níveis de insulina basal nos grupos GDM e GES mostraram os valores mais elevados quando comparados ao grupo NOR, alcançando significância quando comparado com o grupo GDM ( $p < 0,05$ ). Aos 60 minutos, não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos. Entretanto, aos 120 minutos, os grupos GDM e GES mostraram valores significativamente mais altos quando comparados ao grupo NOR ( $p < 0,001$ ). A análise do índice de HOMA-IR no basal, demonstrado na Figura 3, mostra, como esperado, que os grupos de mulheres grávidas exibem um HOMA-IR mais elevado, embora diferença estatística possa seja detectada somente quando o grupo GDM foi comparado ao grupo NOR ( $p < 0,05$ ).

Como indicado na Figura 4, a grelina acilada mostrou uma tendência para valores de linha de base mais baixos no grupo GDM, quando comparado com o grupo GES e NOR. Interessantemente, a gestação normal ou a gestação complicada pelo DMG não mudaram significativamente os níveis de grelina acilada durante o TTOG. Entretanto, os dois grupos diferem nos valores de grelina acilada aos 60 minutos, período em que o grupo GDM mostrou valores de grelina acilada mais baixos que o grupo GES ( $p < 0,006$ ). As análises das três curvas mostram uma diferença significativa entre GDM e GES por Two Way ANOVA Repeated Measures ( $p < 0,016$ ).

#### **4.5 Discussão**

A grelina acilada tem um importante papel no metabolismo energético e no metabolismo da glicose como um hormônio orexígeno forte e possível inibidor tônico da insulina, entre outras ações<sup>21-23, 24</sup>. Por outro lado, a gravidez é uma condição associada a um aumento na ingestão de alimentos que está associada a um aumento progressivo na resistência à insulina<sup>25-26</sup>. Nossos dados mostraram que a grelina acilada apresenta valores basais similares entre os grupos de gestantes e mulheres não grávidas. A análise dos dados dinâmicos durante o TTOG mostrou que a grelina acilada apresenta valores mais baixos em pacientes com diabetes gestacional quando comparado à gestação sem DMG e às mulheres não grávidas (controles) – especialmente aos 60 minutos –, sugerindo um papel para este peptídeo na gravidez. Nenhum

dos grupos avaliados mostrou supressão após a sobrecarga de glicose na grelina acilada. Não obstante, dados conflitantes vêm sendo relatados sobre as alterações na grelina durante a gestação<sup>25, 27-29</sup>. O presente estudo mostra, pela primeira vez na literatura, a avaliação dinâmica da grelina acilada durante o TTOG em gestações complicadas pelo diabetes gestacional.

Os estudos recentes têm mostrado valores de grelina total (dosagem que representa a soma da grelina acilada e des-acilada) na gravidez. A grelina total se apresenta mais baixa na gravidez quando comparado às mulheres não grávidas<sup>28-29</sup>. Riedl *et al.* mostraram uma diminuição de aproximadamente 65% dos valores da grelina total tanto basal quanto aos 60 minutos após o TTOG no terceiro trimestre de gestação, quando comparado ao período do puerpério<sup>28</sup>. Certamente, o período de gestação é muito importante para valores da grelina, porque seus níveis podem mudar entre os trimestres. Fuglsang *et al.* mostram, em um estudo prospectivo, que os níveis de grelina total alcançam seus maiores valores na 18ª semana de gestação e os níveis mais baixos são observados durante o terceiro trimestre, com uma diminuição média de 27,7%. Resultados similares foram apresentados sobre a grelina acilada durante a gravidez por Palik *et al.*, que mostraram um aumento significativo nos níveis da grelina acilada no segundo trimestre, com os valores que eram até mesmo mais elevados do que os observados nas pacientes-controle não grávidas, seguido por uma diminuição significativa no terceiro trimestre<sup>27</sup>. Similarmente, Tham *et al.* (2009) mostraram recentemente valores baixos de grelina acilada na gravidez quando comparado aos valores do pós-parto<sup>29</sup>.

Surpreendentemente, foi observado em nosso estudo que a grelina acilada da linha de base em jejum não diferiu significativamente entre os grupos de gestantes e o grupo controle. Entretanto, nosso estudo compara a grelina acilada entre grupos de grávidas e mulheres não grávidas, pareadas pela idade e pelo índice de massa corporal, o que pode explicar a diferença observada em relação aos outros estudos que não levaram isto em conta.

Não houve mudança significativa nos valores da grelina acilada após a sobrecarga de glicose em todos os grupos, mostrando que o peptídeo acilado não tem seus valores alterados durante uma sobrecarga de glicose. Assim, embora na grelina total seja descrito geralmente uma supressão em estado pós-prandial, seja na gestação ou não<sup>28, 31-32</sup>, nossos dados da sobrecarga de glicose sobre grelina acilada não corroboram com a mesma conclusão, sugerindo que a grelina acilada está regulada diferentemente. Entretanto, no grupo de pacientes com diabetes gestacional houve uma redução mais significativa nos valores de grelina acilada aos 60

minutos no TTOG quando comparado aos outros grupos, possivelmente devido à resistência à insulina aumentada observada neste grupo de mulheres.

Os estudos sobre grelina acilada no período pós-prandial são escassos e inconclusivos, e geralmente foram realizados após um teste de refeição. Sadowski *et al.* demonstraram, com um teste pós-refeição mista, uma supressão significativa na grelina acilada entre mulheres grávidas obesas e magras, mas não entre grávidas com obesidade mórbida <sup>33</sup>. Zwirska-Korczala *et al.* não mostraram também supressão significativa da grelina após teste de refeição em mulheres obesas <sup>34</sup>. Tham *et al.* descreveram uma diminuição significativa da grelina acilada durante a gravidez e no período pós-parto após uma refeição mista <sup>29</sup>. Em nosso estudo, é possível que 75 g de glicose não tenham sido suficientes para suprimir a grelina acilada.

Durante a gestação, a resistência à insulina é uma adaptação fisiológica normal, e poderíamos propor que valores baixos de grelina acilada podem ser outra adaptação fisiológica à gestação. É bem estabelecido que cortisol, leptina e a sensibilidade à insulina são importantes fatores na regulação da dinâmica da grelina acilada <sup>35-37</sup>. Nossos dados são comparáveis aos dados de altos valores de insulina e baixos valores de grelina encontrados na obesidade, diabetes e outros estados de resistência à insulina <sup>27, 38</sup>. Nosso grupo de pacientes com DMG apresenta valores mais elevados de glicose plasmática que o grupo de gestantes sem DMG, mas com valores de insulina plasmática semelhantes, com conseqüente sensibilidade a insulina mais baixa demonstrada ao HOMA-IR. A baixa sensibilidade à insulina pode explicar os valores significativamente mais baixos de grelina acilada neste grupo de pacientes.

Concluindo, nós mostramos que a grelina acilada tem valores similares em mulheres saudáveis, na gestação saudável e em gestantes portadoras de DMG, quando pareado pela idade e IMC. Nossos dados mostram também valores mais baixos de grelina acilada em pacientes com DMG quando comparados ao grupo de GES durante a sobrecarga oral de glicose. Nós podemos propor que a elevada resistência à insulina em pacientes portadores de DMG poderia explicar os níveis mais baixos observados da grelina acilada neste grupo. Outros estudos, envolvendo um número maior de pacientes e incluindo concomitantemente também a dosagem de grelina des-acilada poderiam clarear melhor o assunto.

#### 4.6 Legendas

**Figura 1:** Curva glicêmica durante o TTOG nos três grupos avaliados: grupo diabetes gestacionais (GDM), grupo gestantes saudáveis (GES) e grupo de mulheres não grávidas (NOR). \* $p < 0,05$  entre GDM x GES/NOR. \*\* $p < 0,01$  entre GDM x GES/NOR

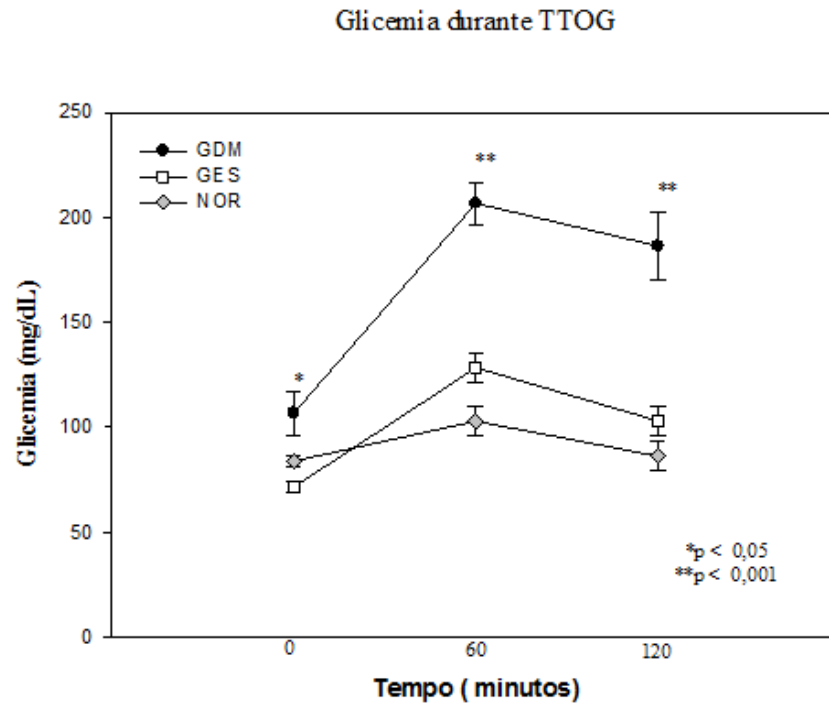
**Figura 2:** Curva de insulina plasmática durante o TTOG nos três grupos avaliados: grupo diabetes gestacionais (GDM), grupo gestantes saudáveis (GES) e grupo de mulheres não grávidas (NOR). \* $p < 0,05$  entre NOR x GDM. \*\* $p < 0,01$  entre NOR x GES/GDM.

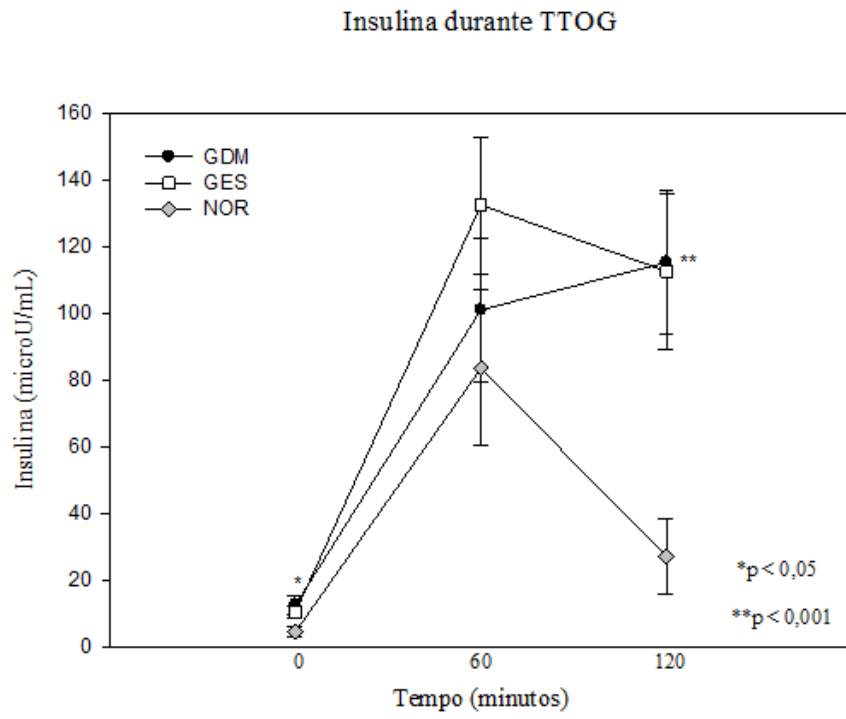
**Figura 3:** Comparação entre os valores de HOMA-IR (MATTHEWS *et al*, 1985) no tempo 0 nos três grupos avaliados: grupo diabetes gestacionais (GDM), grupo gestantes saudáveis (GES) e grupo de mulheres não grávidas (NOR). \* $p < 0,05$  entre GDM x NOR.

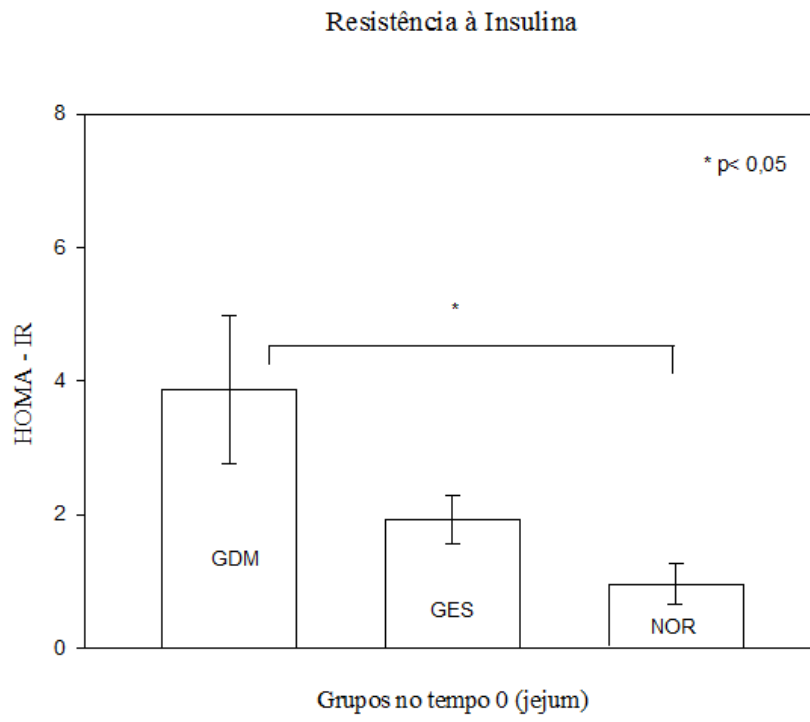
**Figura 4:** Curva de grelina acilada plasmática durante o TTOG nos três grupos avaliados: grupo diabetes gestacionais (GDM), grupo gestantes saudáveis (GES) e grupo de mulheres não grávidas (NOR). \* $p < 0,05$  entre GDM x GES.

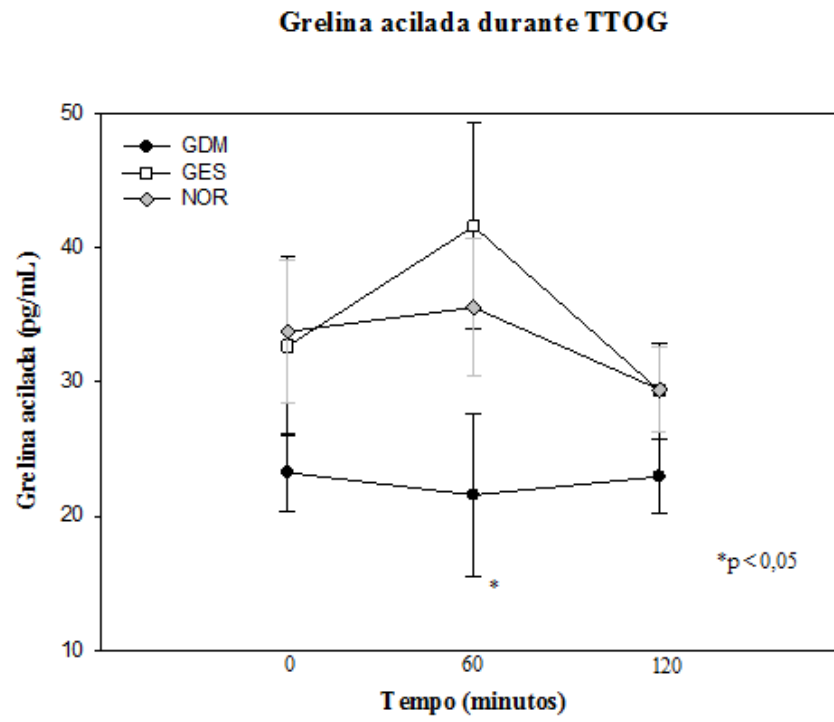
## 4.7 Figuras

**Figura 1:** Glicemia durante o TTOG



**Figura 2:** Insulina durante TTOG

**Figura 3:** Resistência à insulina

**Figura 4:** Grelina acilada durante TTOG

## 4.8 Referências

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec;402(6762):656-60.
2. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2988.
3. Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol*. 2002;440(2-3):235-54.
4. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Dec;279(3):909-13.
5. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2001 Jun;24(6):RC19-21.
6. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan;87(1):240-4.
7. Le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):1068-71.
8. Cappiello V, Ronchi C, Morpurgo PS, Epaminonda P, Arosio M, Beck-Peccoz P, Spada A. Circulating ghrelin levels in basal conditions and during glucose tolerance test in acromegalic patients. *Eur J Endocrinol*. 2002 Apr;147(2):189-94.
9. Barber TM, Casanueva FF, Karpe F, Lage M, Franks S, McCarthy MI, Wass JA. Ghrelin levels are suppressed and show a blunted response to oral glucose in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2008 Apr;158(4):511-6.
10. Anderwald C, Brabant G, Bernroider E, Horn R, Brehm A, Waldhäusl W, Roden M. Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1792-8.

11. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Oct;89(4):1630-5.
12. Kuhl C, Hornnes PJ, Andersen O. Etiology and pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Diabetes.* 1985;34 Suppl 2:66-70.
13. Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Feb;284(2):E313-6.
14. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi EK, Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Aug;87(8):3997-4000.
15. Caixás A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrère B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Apr;87(4):1902.
16. Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJD, Abribat T, van Koetsveld PM, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Oct;89(10):5035-42.
17. Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Feb;90(2):1055-60.
18. Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA, van de Zande B, Delhanty PJD, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen APN, and van der Lely AJ. Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Jun;293(3):E697-704.
19. Proceedings of the 4th International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Chicago, Illinois, USA. 1997 March 14-16. *Diabetes Care.* 1998;21 Suppl 2:B1-167.
20. Brasil. Ministério Nacional da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. [cited 2011 Oct 20]. Available from: <<http://vsites.unb.br/fs/clm/labcor/etic196.htm>>.
21. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985 Jul;28(7):412-9.
22. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec 2001;86(12):5992.

23. Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, Nakata M, Kakei M. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev.* 2008;4(1):18-23.
24. Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes.* 2006 Dec;55(12):3486-93.
25. Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002;440(2-3):235-54.
26. Homko CJ, Sivan E, Reece EA, Boden G. Fuel metabolism during pregnancy. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999;17(2):119-25.
27. Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, Nakata M, Kakei M. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev.* 2008;4(1):18-23.
28. Palik E, Baranyi E, Melczer Z, Audikovszky M, Szöcs A, Winkler G, Cseh K. Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76(3):351-7.
29. Riedl M, Maier C, Handisurya A, Luger A, Kautzky-Willer A. Insulin resistance has no impact on ghrelin suppression in pregnancy. *J Intern Med.* 2007 Oct;262(4):458-65.
30. Tham E, Liu J, Innis S, Thompson D, Gaylinn BD, Bogarin R, Haim A, Thorner MO, Chanoine J-P. Acylated ghrelin concentrations are markedly decreased during pregnancy in mothers with and without gestational diabetes: relationship with cholinesterase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 May;296(5):E1093-100.
31. Fuglsang J, Skjaerbaek C, Espelund U, Frystyk J, Fisker S, Flyvbjerg A, Ovesen P. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 May;62(5):554-9.
32. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest.* 2001 Jun;24(6):RC19-21.
33. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jan;87(1):240-4.
34. Sadowski K, Zwirska-Korczala K, Kuka D, Kukla M, Budziszewska P, Czuba B, Włoch A, Cnota W, Bielański W, Brzozowski T, Rehfeld JF, Zdun R, Konturek PC. Basal and postprandial gut peptides affecting food intake in lean and obese pregnant women. *J Physiol Pharmacol.* 2007 Mar;58 Suppl 1:37-52.

35. Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Sodowski M, Wylezol M, Kuka D, Sowa P, Adamczyk-Sowa M, Kukla M, Berdowska A, Rehfeld JF, Bielanski W, Brzozowski T. Basal and postprandial plasma levels of PYY, ghrelin, cholecystokinin, gastrin and insulin in women with moderate and morbid obesity and metabolic syndrome. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Mar;58 Suppl 1:13-35.
36. Kempa A, Krzyzanowska-Swiniarska B, Miazgowski T, Pilarska K. Not insulin but insulin sensitivity, leptin, and cortisol are major factors regulating serum acylated ghrelin level in healthy women. *J Endocrinol Invest*. 2007 Sept;30(8):659-65.
37. Paik KH, Choe YH, Park WH, Oh YJ, Kim AH, Chu SH, Kim SW, Kwon EK, Han SJ, Shon WY, Jin D-K. Suppression of acylated ghrelin during oral glucose tolerance test is correlated with whole-body insulin sensitivity in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Feb;91(5):1876-81.
38. Damjanovic SS, Stojic RV, Lalic NM, Audikovsky M, Szöcs A, Winkler G, Cseh K. Relationship between basal metabolic rate and cortisol secretion throughout pregnancy. *Endocrine*. 2009 Apr;35(2):262-8.
39. St-Pierre DH, Bastard JP, Coderre L, Brochu M, Karelis AD, Lavoie ME, Malita F, Fontaine J, Mignault D, Cianflone K, Imbeault P, Doucet E, Rabasa-Lhoret R. Association of acylated ghrelin profiles with chronic inflammatory markers in overweight and obese postmenopausal women: a MONET study. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(4):419-26.

## 5 ARTIGO 2: OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES ESTÃO AUMENTADOS NO DIABETES GESTACIONAL DURANTE O TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (TTOG)

*Ricardo Barsaglini Leite\**, *Guilherme Fagundes Nascimento*, *Paulo Augusto C. Miranda\**, *Anelise Impelizeri Nogueira\**, *Rodrigo Bastos Foscolo\**, *Lucas José de Campos Machado \**, *Cândido Celso Coimbra\*\** e *Antonio Ribeiro de Oliveira Junior\**

### 5.1 Resumo

O diabetes gestacional (DMG) é um estado de resistência à insulina muito comum, com os ácidos graxos livres (AGL) relacionados na fisiopatologia. Sabe-se que os níveis de AGL elevam-se no terceiro trimestre da gravidez, embora pouco seja relatado sobre o metabolismo desses níveis nas gestações complicadas pelo DMG. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis dos AGL durante o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em gestações complicadas pelo DMG. Vinte mulheres grávidas – quatorze com diabetes gestacional (GDM) – e seis gestantes saudáveis (NOR) foram recrutadas no ambulatório de obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e avaliadas durante um TTOG a 100 g de dextrosol (3h-100g-TTOG). Observamos o declínio significativo dos AGL em ambos os grupos. Entretanto, valores mais elevados de AGL foram observados durante todos os tempos do TTOG no grupo de pacientes com DMG (GDM), quando comparados a gestantes sem DMG (NOR) ( $p < 0,01$ ). Os níveis de AGL declinam durante o TTOG nas pacientes com DMG (GDM), mas os valores são mais elevados, ao longo de todo teste, do que no grupo de gestante sem DMG (NOR). Estes valores provavelmente se relacionam à resistência à insulina, notadamente aumentada em pacientes com DMG.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos livres. Diabetes gestacional. Diabetes mellitus. Gravidez. Metabolismo da glicose. Período pós-prandial. Teste de tolerância oral à glicose.

**Conflito de interesse:** Não há nenhum conflito de interesse.

---

\* Laboratório de Endocrinologia e \*\*Laboratório de Fisiologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

## 5.2 Introdução

O diabetes gestacional (DMG) é uma anormalidade metabólica comum que ocorre durante a segunda metade da gestação <sup>1</sup>. O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) é uma ferramenta comumente empregada para diagnosticar o DMG <sup>2</sup>. O metabolismo dos carboidratos e o metabolismo dos lípidos é afetado em grau variável no DMG. A sensibilidade materna à insulina diminuída, acoplada a uma resposta inadequada da insulina, são os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao desenvolvimento do diabetes gestacional <sup>3</sup>.

O desenvolvimento da resistência à insulina durante a segunda metade da gravidez é uma adaptação fisiológica normal que desvia o metabolismo energético materno do carboidrato para a oxidação dos lípidos e poupa, assim, a glicose para o feto em crescimento <sup>4</sup>. As gestantes com o DMG demonstram um aumento na resistência à insulina além do observado na gestação normal <sup>5-6</sup>. A razão para a deterioração na sensibilidade à insulina não é bem compreendida, embora se acredite que seja o resultado da elevação nos níveis de hormônios diabetogênicos, como o hormônio lactogênico placentário humano, hormônio do crescimento placentário, cortisol, progesterona e estrogênios <sup>7-8</sup>. Entretanto, acredita-se que os ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos também podem exercer uma ação no desenvolvimento da resistência à insulina neste momento da gestação.

Os estudos em seres humanos demonstraram que a elevação dos AGL plasmáticos inibem de forma dose-dependente a captação de glicose mediada pela insulina em pessoas diabéticas ou não, resultando em valores glicêmicos pós prandiais aumentados <sup>9</sup>. O aumento nos níveis plasmáticos de AGL na gestação pode ser devido à ação lipolítica dos hormônios placentários, especialmente do hormônio lactogênico placentário humano (hPL), que alcança níveis muito elevados no sangue a partir da segunda metade da gestação <sup>10</sup>. Interessantemente, as gestantes com DMG apresentam níveis de AGL mais elevados que mulheres sem DMG <sup>11</sup>, o que dá suporte à ideia de que os AGL podem desempenhar um papel na patogênese da resistência à insulina no DMG <sup>12</sup>. Embora muito seja conhecido sobre mudanças no metabolismo da glicose durante a gestação, pouco foi publicado sobre o metabolismo dos AGL no DMG. Tem sido demonstrado que os AGL plasmáticos em jejum encontram-se elevados ao final da gestação de pacientes com DMG <sup>13-14</sup>, mas nenhum dos estudos explorou as mudanças nos valores dos AGL plasmáticos durante o TTOG.

O objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres durante o TTOG em pacientes com DMG, em comparação à gestação normal.

### 5.3 Métodos

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, onde um grupo de quatorze gestantes com DMG (GDM) e um grupo de seis gestantes sem DMG (NOR) foram recrutadas a partir de uma amostragem dos ambulatórios de obstetrícia. Todas as mulheres realizaram o teste laboratorial para diabetes gestacional entre a 28ª e a 35ª semana de gestação, realizando o TTOG com 100 g de dextrosol após jejum de oito horas durante a noite.

Nenhuma das pacientes era hipertensa ou utilizava nenhuma medicação de uso crônico, salvo vitaminas. Nenhuma alteração clínica foi detectada pelo exame clínico e pelas medidas laboratoriais de rotina, à exceção do TTOG.

O protocolo do estudo recebeu a aprovação do Comitê de Ética Local em Experimentação Humana. Cada paciente assinou um termo de consentimento, elaborado em conformidade com a regulamentação brasileira em experimentação humana (resolução 196/96)<sup>15</sup>.

O grupo de pacientes com DMG foi determinado de acordo com os critérios de John B. O'Sullivan e Claire M. Mahan e das recomendações da Associação Americana de Diabetes<sup>16</sup>. As amostras foram colhidas para glicose plasmática e ácidos graxos livres em jejum no basal e em 1 h, 2 h e 3 h após a sobrecarga oral de dextrosol. Os AGL e a glicose plasmática foram determinados em duplicata por ELISA (LINCO, St. Charles, Missouri, EUA) e quimiluminescência (BIOCLIN/QUIBASA, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), respectivamente. O coeficiente de variação intraensaio foi menor que 10% para ambos os exames.

Os dados foram expressos como média  $\pm$  o erro padrão das médias (SEM). Todas as análises estatísticas foram executadas usando o *software* Sigma Stat (*software* 2008, de Systat, SigmaPlot, para Windows 11.0.0.77, Alemanha). As diferenças entre grupos foram determinadas pelo teste de análise de variância bi caudada, seguidas pelo método de Holm-Sidak. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado como significativo.

## 5.4 Resultados

A idade média das gestantes e o tempo de gestação médios foram respectivamente  $33,56 \pm 2,21$  anos e  $32,46 \pm 0,78$  semanas no grupo gestante com DMG (GDM), e  $32,00 \pm 1,37$  anos e  $31,17 \pm 0,98$  semanas no grupo de gestantes, sem diferença estatística. Durante o TTOG, os valores médios plasmáticos da glicemia foram significativamente diferentes no grupo de gestantes com DMG (GDM) em relação ao grupo controle (NOR) ( $p = 0,003$ ), como observado na Figura 5.

O grupo de gestantes com DMG (GDM) apresentou níveis plasmáticos mais elevados de AGL no basal quando comparado ao grupo de gestantes sem DMG (NOR) ( $p < 0,05$ ) conforme se observa na Figura 6. Os níveis de AGL plasmáticos foram suprimidos durante o TTOG em ambos os grupos, com uma diminuição significativa do basal aos 60 minutos ( $p < 0,001$ ). A análise estatística das curvas de AGL durante o TTOG mostram diferenças significativas entre o grupo de gestantes com DMG (GDM) e o das gestantes sem DMG (NOR) ( $p < 0,001$ ).

## 5.5 Discussão

O DMG é descrito como uma condição de defeitos múltiplos na ação da insulina associado com compensação inadequada à resistência à insulina. Estes defeitos variam desde a regulação inadequada da produção e captação da glicose aos defeitos na função pancreática da célula beta <sup>17</sup>. A exposição aumentada aos AGL é envolvida na patogênese da resistência à insulina e na redução da secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS) <sup>18</sup>. Este estudo mostra que gestantes com DMG apresentam níveis de AGL plasmáticos no terceiro trimestre da gestação que excedem aqueles da gestação normal, na linha de base e em todos os tempos do TTOG.

Foi também demonstrado que a curva de AGL plasmáticos após o TTOG no diabetes gestacional é diferente, significativamente, da curva na gestação normal. Isto pode ser explicado pela supressão reduzida da lipólise à sobrecarga glicêmica, potencialmente relacionada a níveis mais elevados do hPL humano que excede o observado na gestação

normal neste grupo de pacientes. Além disso, outros hormônios placentários encontram-se com valor mais elevado no terceiro trimestre de gestações complicadas pelo DMG <sup>19</sup>, tais como o hormônio do crescimento placentário humano <sup>20</sup>; poderiam, assim, também estar envolvidos nos níveis elevados de AGL plasmáticos nestas pacientes.

Mclachlan *et al.* demonstraram, avaliando mulheres não grávidas com história pregressa de DMG, uma susceptibilidade à redução lípide induzida da secreção de insulina induzida pela glicose (GSIS) nas mulheres que necessitaram de insulina para o tratamento do diabetes gestacional <sup>21</sup>. Chan *et al.* encontraram valores mais elevados de glicerol e 3-OH-butirato – mas não ácidos graxos não esterificados – durante o TTOG em mulheres com história pregressa de DMG <sup>22</sup>. Estes dados apontam que possíveis predisposições a alterações no metabolismo lipídico podem ter um papel na fisiopatologia do DMG.

Constata-se, pois, que os níveis de AGL plasmáticos são mais elevados em gestantes com DMG tanto na linha de base em jejum como durante todos os tempos do TTOG. Acreditamos que estes níveis mais elevados de AGL durante o TTOG no grupo de gestante com DMG possivelmente colaboram para a resistência insulínica aumentada observada neste grupo de pacientes.

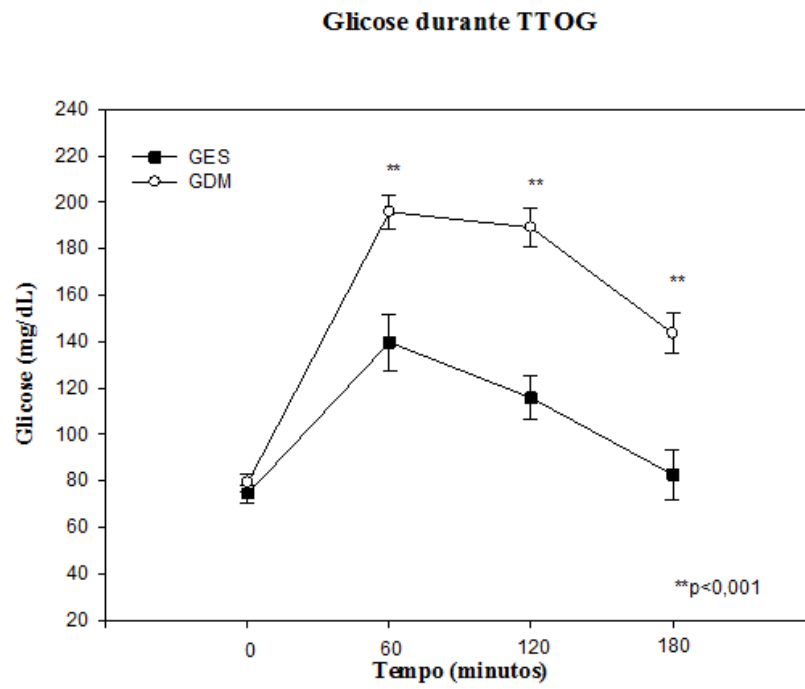
## 5.6 Legendas

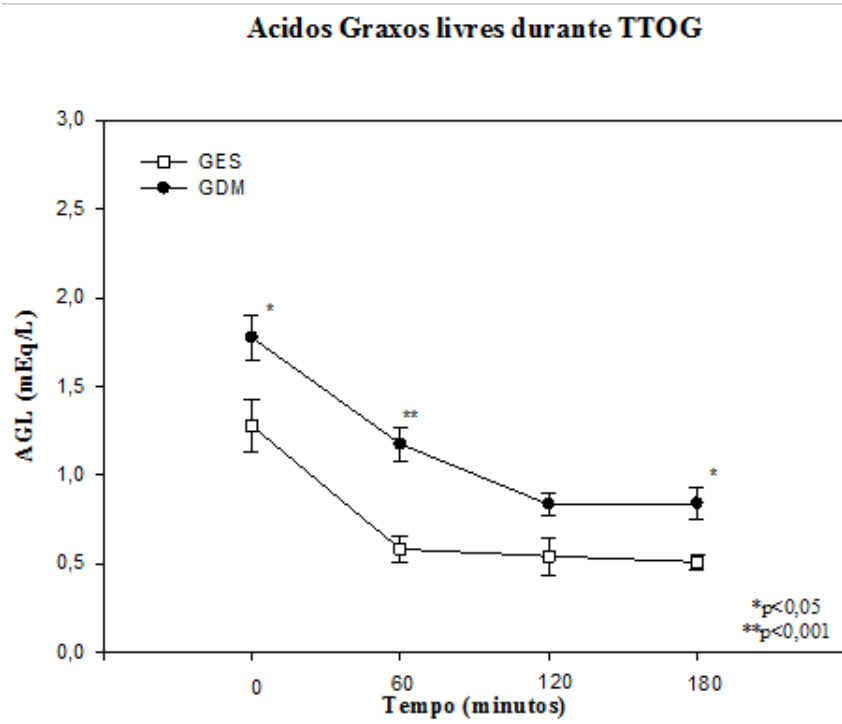
**Figura 5:** Curva glicêmica durante o TTOG nos dois grupos avaliados: grupo diabetes gestacionais (GDM), grupo gestantes saudáveis (GES). \*\*p < 0,01 entre GDM x GES.

**Figura 6:** Curva dos níveis de AGL durante o TTOG nos dois grupos avaliados: grupo diabetes gestacionais (GDM), grupo gestantes saudáveis (GES). \*p < 0,05 entre GDM x GDM. \*\*p < 0,01 entre GDM x GES.

## 5.7 Figuras

**Figura 5:** Glicose durante TTOG



**Figura 6:** Ácidos graxos livres durante TTOG

## 5.8 Referências

1. Hod M, Merlob P, Friedman S, Schoenfeld A, Ovadia J. Gestational diabetes mellitus. A survey of perinatal complications in the 1980s. *Diabetes*. 1991 Dec;40 Suppl 2:74-8.
2. Reaven G, Miller R. Study of the relationship between glucose and insulin responses to an oral glucose load in man. *Diabetes*. 1968 Sept;17(9):560-9.
3. Kuhl C, Hornnes PJ, Andersen O. Etiology and pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 1985 Jun;34 Suppl 2:66-70.
4. Homko CJ, Sivan E, Reece EA, Boden G. Fuel metabolism during pregnancy. *Semin Reprod Endocrinol*. 1999;17(2):119-25.
5. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Quiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Mar;282(3):E522-33.
6. Sivan E, Homko CJ, Chen X, Reece EA, Boden G. Effect of insulin on fat metabolism during and after normal pregnancy. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):834-8.
7. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30 Suppl 2:S112-9.
8. Damjanovic SS, Stojic RV, Lalic NM, Audikovsky M, Szöcs A, Winkler G, Cseh K. Relationship between basal metabolic rate and cortisol secretion throughout pregnancy. *Endocrine*. 2009 Apr;35(2):262-8.
9. Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003 May;111(3):121-4.
10. Cao X, Qin W, He Z. [Changes of carbohydrate metabolism in normal pregnancy and its relationship with placental lactogen concentrations]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1998 Feb;33(2):80-2.
11. Chen X, Scholl TO. Association of elevated free fatty acids during late pregnancy with preterm delivery. *Obstet Gynecol*. 2008 Aug;112(2 Pt 1):297-303.
12. Bomba-Opon D, Wielgos M, Szymanska M, Bablok L. Effects of free fatty acids on the course of gestational diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006 Feb-Apr;27(1-2):277-80.

13. Couch SC, Philipson EH, Bendel RB, Pujda LM, Milvae RA, Lammi-Keefe CJ. Elevated lipoprotein lipids and gestational hormones in women with diet-treated gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *J Diabetes Complications*. 1998 Jan-Feb;12(1):1-9.
14. Meyer B, Calvert D, Moses R. Free fatty acids and gestational diabetes mellitus. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1996 Aug;36(3):255-7.
15. Brasil. Ministério Nacional da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. [cited 2011 Oct 20]. Available from: <<http://vsites.unb.br/fs/clm/labcor/etic196.htm>>.
16. Proceedings of the 4th International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus; 1997 14-16 March; Chicago, Illinois, USA. *Diabetes Care*. 1998;21 Suppl 2:B1-167.
17. Xiang AH, Peters RK, Trigo E, Kjos SL, Lee WP, Buchanan TA. Multiple metabolic defects during late pregnancy in women at high risk for type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):848-54.
18. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*. 1995 Aug;44(8):863-70.
19. Montelongo A, Lasuncion MA, Pallardo LF, Herrera E. Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes*. 1992 Dec;41(12):1651-9.
20. Eriksson L, Frankenne F, Eden S, Hennen G, Von SB. Growth hormone 24-h serum profiles during pregnancy--lack of pulsatility for the secretion of the placental variant. *Br J Obstet Gynaecol*. 1989 Aug;96(8):949-53.
21. McLachlan KA, Boston R, Alford FP. Impaired non-esterified fatty acid suppression to intravenous glucose during late pregnancy persists postpartum in gestational diabetes: a dominant role for decreased insulin secretion rather than insulin resistance. *Diabetologia*. 2005 Jul;48(7):1373-9.
22. Chan SP, Gelding SV, McManus RJ, Nicholls JS, Anyaoku V, Niththyananthan R, Johnston DG, Dornhorst A. Abnormalities of intermediary metabolism following a gestational diabetic pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992 Apr;36(4):417-20.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A gestação é associada a um aumento da ingesta energética e também a um aumento gradual da resistência à insulina.<sup>xxviii</sup> No diabetes gestacional (DMG), ocorre indubitavelmente um aumento exacerbado desta resistência, o que o torna um bom modelo de estudo para vários integrantes do metabolismo energético, assim como do metabolismo dos carboidratos e lípidos, os quais se alteram nesta condição. Avaliamos nos estudos apresentados duas variáveis importantes: os ácidos graxos livres (AGL) e a grelina acilada ou ativa, não apenas em jejum, mas de forma dinâmica após a sobrecarga de glicose.

Nossa hipótese era de que as gestantes com DMG apresentariam alterações significativas nos valores de grelina acilada e nos AGL durante o teste de tolerância oral à glicose (TTOG), diante da resistência à insulina aumentada nestas gestantes. Esta hipótese mostrou-se verdadeira diante dos dados apresentados nos dois artigos. Avaliamos também o comportamento da grelina acilada e dos AGL neste grupo de gestantes, o que ao nosso conhecimento é inédito.

Os valores de AGL foram significativamente mais elevados nas gestantes com DMG durante a sobrecarga oral de glicose, em comparação com a gestante normal no artigo apresentado. As gestantes com e sem DMG apresentaram supressão dos AGL aos 60 minutos, após a sobrecarga de dextrosol, de forma significativa, mas mantendo a diferença entre os grupos. Os AGL plasmáticos têm, conhecidamente, relação direta com a patogênese da resistência à insulina. Seus valores elevados no terceiro trimestre podem ser relacionados ao aumento da lipólise,<sup>xxix</sup> desencadeada pelo aumento dos hormônios placentários.

Ao avaliarmos a grelina acilada, não encontramos diferenças entre gestantes com ou sem DMG ou em mulheres não gestantes pareadas na idade e IMC no basal em jejum, mas ao avaliarmos durante a sobrecarga de glicose notamos uma diminuição significativa nos seus valores no grupo de gestantes com DMG aos 60 minutos, em comparação às gestantes sem DMG.

---

<sup>xxviii</sup> Homko CJ, Sivan E, Reece EA, Boden G. Fuel metabolism during pregnancy. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999;17(2):119-25.

<sup>xxix</sup> Cao X, Qin W, He Z. [Changes of carbohydrate metabolism in normal pregnancy and its relationship with placental lactogen concentrations]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1998 Feb;33(2):80-2.

Os dados sobre grelina e gestação na literatura ainda são inconclusivos e, assim como os dados sobre grelina acilada após sobrecarga oral de glicose em gestantes com DMG, ainda não foram apresentados. Estudos sobre a grelina total durante a gestação sem DMG apresentam variação nos valores plasmáticos em jejum durante os trimestres, com um aumento nos valores no segundo trimestre, coincidindo com o maior ganho de peso da gestante neste período e um valor mais baixo no último trimestre, fato relacionado possivelmente à maior resistência à insulina.<sup>xxx</sup> Quanto à grelina acilada, estudo recente em gestantes descreve valores mais baixos na gestação em jejum tanto nas gestantes sem DMG quanto nas gestantes com DMG. Porém, ao medir a grelina acilada no puerpério das mesmas pacientes, estas apresentaram valores bem mais elevados de grelina acilada.<sup>xxxi</sup> Nossos dados não corroboram com este dado; devemos ressaltar que nosso grupo de mulheres não gestantes foi pareado em IMC e idade, fatores sabidamente importantes na determinação dos valores plasmáticos, e não encontrava-se em período puerperal, o que poderia explicar a diferença de resultados comparados aos outros estudos.

Outro dado relevante apresentado é a não supressão pela sobrecarga oral de glicose da grelina acilada em nenhum grupo, diferentemente do descrito para grelina total na gestação e nas mulheres não gestantes em testes pós-refeição.<sup>xxxii</sup> Sabemos que a grelina total apresenta supressão variável dependendo do tipo de alimentação; assim, a sobrecarga com 75 g de dextrosol pode ter sido insuficiente para a adequada supressão.

Os valores de grelina acilada obtidos no TTOG entre os grupos de gestantes com DMG e sem DMG apresentaram diferença significativa aos 60 minutos após o dextrosol. Os estudos prévios em gestantes com diabetes gestacional<sup>xxxiii</sup> não demonstraram diferenças tanto em

---

<sup>xxx</sup> Fuglsang J, Skjaerbaek C, Espelund U, Frystyk J, Fisker S, Flyvbjerg A, Ovesen P. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 May;62(5):554-9.

<sup>xxxi</sup> Palik E, Baranyi E, Melczer Z, Audikovszky M, Szöcs A, Winkler G, Cseh K. Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76(3):351-7.

<sup>xxxii</sup> Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan;87(1):240-4.

<sup>xxxiii</sup> Riedl M, Maier C, Handisurya A, Luger A, Kautzky-Willer A. Insulin resistance has no impact on ghrelin suppression in pregnancy. *J Intern Med*. 2007 Oct;262(4):458-65.

Tham E, Liu J, Innis S, Thompson D, Gaylinn BD, Bogarin R, Haim A, Thorner MO, Chanoine J-P. Acylated ghrelin concentrations are markedly decreased during pregnancy in mothers with and without

jejum quanto após teste de refeições mistas nos níveis de grelina total ou acilada. Em nosso grupo de gestantes com DMG a resistência à insulina é bem significativa, o que é demonstrado pelo HOMA-IR, enquanto os estudos citados apresentam grupos de diabetes gestacionais com quadros mais brandos, o que talvez explique a diferença nos resultados. A regulação da grelina acilada tem uma correlação negativa com a sensibilidade à insulina e cortisol e positiva para leptina, o que corrobora com nossa explicação.<sup>xxxiv</sup>

A grelina acilada apresenta papel importante no controle energético e possivelmente tem um papel no metabolismo glicêmico. Os valores de grelina acilada significativamente inferiores no TTOG do grupo DMG, em relação à gestação sem DMG apresentados no primeiro trabalho, nos direciona para a possível participação deste hormônio na fisiopatologia do diabetes gestacional. Estudos com um maior número de pacientes e avaliação concomitante de grelina des-acilada podem clarear esta possibilidade.

Os dois trabalhos apresentados contribuem um pouco mais para a melhor compreensão do estado pós-prandial e regulação do metabolismo glicêmico, lipídico e energético durante a gestação normal e de portadoras de DMG. Também acrescentam dados na avaliação da resistência à insulina fisiológica da gestação e de sua exacerbação patológica, como ocorre no diabetes gestacional.

---

gestational diabetes: relationship with cholinesterase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 May;296(5):E1093-100.

<sup>xxxiv</sup> Kempa A, Krzyzanowska-Swiniarska B, Miazgowski T, Pilarska K. Not insulin but insulin sensitivity, leptin, and cortisol are major factors regulating serum acylated ghrelin level in healthy women. *J Endocrinol Invest.* 2007 Sept;30(8):659-65.

## **ANEXO 1: CIRCULATING ACYLATED GHRELIN LEVELS DURING OGTT TEST IN GESTATIONAL DIABETES**

*Ricardo Barsaglini Leite, Guilherme Fagundes Nascimento, Mariana Ferreira Bizzi, Paulo Augusto C. Miranda, Anelise Impelizeri Nogueira, Rodrigo Bastos Foscolo and Antonio Ribeiro de Oliveira Junior\**

### **Abstract**

The Ghrelin is a 28-amino acid peptide predominantly produced by the stomach, but it's also detectable in many tissues with a multiplicity of physiological functions affecting food intake, energy, glucose homeostasis, and others. The ghrelin levels usually rise in pre-prandial time and lower after meals. However, this post-prandial suppression may be blunted in pathological conditions like obesity, diabetes and other insulin resistant conditions. Insulin sensitivity decreases during late pregnancy, and gestational diabetes represents a state of increased insulin resistance in pregnancy. Ghrelin seems to exert a tonic inhibitory regulation on insulin secretion through its acylated form. A total of 28 pregnant women underwent an oral glucose tolerance test (75g-2h-OGTT) after the 24<sup>th</sup> week of pregnancy – 15 with gestational diabetes (GDM) and 13 with healthy pregnancy (GES) –, and another 13 nonpregnant healthy women were recruited to undergo an OGTT as controls (NOR). Samples were withdrawn at baseline, 60 and 120 minutes, and glucose, insulin and active ghrelin were determined. There were no significant baseline differences among groups. Active ghrelin in GDM was lower during OGTT when compared to GES and NOR, especially at 60 minutes ( $p < 0.01$ ). We have showed for the first time that acylated ghrelin has similar values in healthy nonpregnant and pregnant women, although acylated ghrelin may be even more decreased in GDM during OGTT.

**Keywords:** Gestational diabetes. Active ghrelin. Glucose metabolism. Pregnancy. Diabetes.

**Running title:** Acylated ghrelin levels in gestational diabetes.

---

\* Laboratory of Endocrinology, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

## Introduction

The Ghrelin is a 28-amino acid peptide predominantly produced by the stomach, first characterized as a natural ligand of GH secretagogue receptor type 1a (GHS-R1a), which displays strong GH-releasing activity <sup>1</sup>. GHS-R1a was predominantly expressed in the pituitary and at much lower levels in the thyroid gland, pancreas, spleen, myocardium, and adrenal gland. In contrast, ghrelin was found in the stomach, but it was also shown to be highly expressed in several other organs and tissues <sup>2</sup>. The ghrelin shows a multiplicity of physiological functions affecting food intake, energy and glucose homeostasis, gastrointestinal, cardiovascular, pulmonary and immune function, cell proliferation and differentiation, and bone physiology <sup>3</sup>. The ghrelin is the first known natural hormone in which the hydroxyl group of one of its serine residues is acylated by n-octanoic acid. This acylation is essential for binding to the GHS-R1a, for GH releasing, and also likely for its other endocrine actions <sup>4</sup>.

Fasting plasma ghrelin concentrations are negatively correlated with body mass, and they rise in pre-prandial time and lower after meals <sup>5</sup>, reaching a nadir of 69% of the baseline levels after a meal <sup>6</sup>. Ghrelin levels are up-regulated under conditions of negative energy balance and down-regulated in the setting of positive energy balance, suggesting the involvement of ghrelin on regulation of meal initiation and energy balance. This post-prandial suppression has been described to be blunted in many pathological conditions such as obesity, diabetes and other insulin resistant conditions, including acromegaly and polycystic ovary syndrome <sup>7-10</sup>. Indeed, ghrelin correlates inversely with both insulin resistance and fasting insulin concentration <sup>11</sup>. On the other hand, insulin sensitivity decreases progressively during late pregnancy, and gestational diabetes supervene, in those who cannot overcome this insulin resistance by increasing insulin secretion <sup>12</sup>.

Many authors suggest that insulin acts as negative feedback on ghrelin secretion <sup>13-14</sup>, while others disagree <sup>15</sup>. Notably, ghrelin seems to exert a permissive action upon glucose-induced insulin secretion as a tonic inhibitory regulation through its active peptide <sup>16</sup>. It has also been imputed to acyl ghrelin an increase in human glucose levels by rising hepatic glucose output <sup>17</sup>. Nevertheless, this action is prevented by des-acyl ghrelin <sup>18</sup>, that is why it is so important to analyze ghrelin action pattern and regulation by its acylated form in glucose metabolism. Although much has been studied on acyl ghrelin, little is known about its secretion in

pregnancy, especially in gestational diabetes. The aim of this study was analyze the dynamic pattern of acyl ghrelin during oral glucose tolerance test (OGTT) in pregnant women with gestational diabetes, a frequent well known condition of insulin resistance.

## **Methods**

### ***Subjects***

A total of 43 women were recruited from the gestational diabetes outpatients' clinic and from gynecology and obstetrics outpatient ward when they underwent an oral glucose tolerance test (75g-2h-OGTT) after the 24<sup>th</sup> week of pregnancy. Women with any chronic disease, in use of any medication including hormonal contraceptives or smoking habitus were promptly excluded from the study.

A total of 30 pregnant women were included in the study. Pregnant subjects were assigned based on the American Diabetes Association (ADA) Fourth Workshop Conference Criteria for Gestational Diabetes <sup>19</sup> to two groups according to results from OGTT: gestational diabetes (GDM: two or more abnormal glucose values in OGTT) or normal glucose tolerance (GES: no abnormal glucose values on OGTT). Another 13 nonpregnant healthy women, matched to age and BMI to the two other groups, were recruited as controls (NOR).

The study protocol was approved by the local Ethics Committee on Human Experimentation. Each patient signed a term of informed consent in compliance with the Brazilian Regulation on Human Experimentation (Resolution 196/96) <sup>20</sup>.

Laboratory procedures: All OGTTs were performed between 7:00 and 8:00 in the morning following an overnight fast. A blood sample was withdrawn for baseline glucose, insulin and acylated ghrelin followed by ingestion of 75 g dextrosol. Blood samples were drawn at 60 and 120 minutes for the same measures. Plasma samples were collected in chilled EDTA tubes, immediately centrifuged and stored at -70 °C until analysis. Acylated Ghrelin was measured by using commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (Millipore, EZGRA-88K, St. Charles, Missouri, U.S.A). Insulin was also measured utilizing an ELISA

kit, and glucose levels were determined by glucose oxidase method (BIOCLIN/QUIBASA, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). All samples were measured in duplicate.

### ***Statistical analysis***

Data are given as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Glucose, insulin, HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment – Insuline Resistance) index <sup>21</sup>, and acyl ghrelin were compared among groups by repeated measures two way ANOVA followed by Holm-Sidak method. A p value  $< 0.05$  was taken as significant. All statistical analyses were performed by using Sigma Stat software (Systat software 2008, SigmaPlot for Windows 11.0.0.77, Germany).

### **Results**

The GDM and GES groups exhibited similar gestational weeks (GDM  $29.29 \pm 2.58$ ; GES  $30.00 \pm 3.68$ ).

As displayed in Figure 1, the three groups (GDM, GES, NOR) showed significant different glucose levels curves during OGTT among groups ( $p < 0.05$ ). The baseline levels were already different among groups, and GDM showed the highest values while GES showed the lowest of the values ( $p < 0.05$ ). Moreover, GDM exhibited higher values than GES and NOR in all experimental time points ( $p < 0.001$ ). GES and NOR groups did not show otherwise significant differences in glucose levels after glucose overload.

As shown in Figure 2, the baseline insulin levels in GDM and GES groups showed higher values when compared to the NOR group, reaching significance for comparisons with GDM ( $p < 0.05$ ). At 60 min, there were no significant differences among groups. However, at 120 min, both GDM and GES showed higher significant values when compared to NOR group. The HOMA-IR index analysis in Figure 3 shows, as expected, that the groups of pregnant women exhibit higher HOMA-IR, although significance could be detected only when GDM was compared to the NOR group ( $p < 0.05$ ).

As displayed in Figure 4, acylated ghrelin showed a tendency towards lower baseline values in GDM when compared with GES and NOR groups. Interestingly, either normal gestation or gestation complicated by gestational diabetes did not change significantly the acylated ghrelin levels during OGTT. However, the two gestational groups differs at 60 min. when the GDM group showed lower acylated ghrelin levels ( $p < 0.006$ ). The analyses of the three curves show a significant difference between GDM and GES by the two way ANOVA repeated measures ( $p < 0.01$ ).

## Discussion

Acylated ghrelin has an important role in fuel metabolism and glucose metabolism as a strong orexigenic hormone and tonic insulin inhibitor among other actions<sup>22, 24-25</sup>. Pregnancy is likewise a condition associated with an increase in food intake which is coupled to a progressive increase in insulin resistance<sup>26-27</sup>. Our data revealed that acylated ghrelin showed similar baseline values among groups of gestation and nonpregnant. The analysis of the OGTT dynamic data shows that acylated ghrelin is lower in gestational diabetes when compared to normal gestation or nonpregnant controls, especially at 60 min, suggesting a role for this peptide in pregnancy. None of the groups showed suppression after glucose overload in acylated ghrelin. Nevertheless, inconclusive data have been reported on changes in ghrelin during gestation<sup>26, 28-30</sup> and, to the best of our knowledge, this is the first report on a dynamic acylated ghrelin study during OGTT in pregnancies complicated by gestational diabetes.

Studies have recently reported on total ghrelin levels in pregnancy, and total ghrelin has currently been described to be lower in pregnancy when compared to nonpregnant women<sup>29-30</sup>. Riedl *et al.* showed an approximately 65% decrease in both baseline and 60 minutes total ghrelin after OGTT in the third trimester of pregnancy when compared to postpartum period<sup>29</sup>. Indeed, the week of gestation is very important to ghrelin values, as ghrelin levels may change among the trimesters<sup>31</sup>. Fuglsang *et al.* showed in a prospective study that total ghrelin levels peaked in week 18 and the lowest levels were observed in late third trimester, with a mean decrease of 27,7%<sup>31</sup>. Similar results were shown to acylated ghrelin during pregnancy by Palik *et al.*, who showed a significant increase in acylated ghrelin levels in the second trimester, with values that were even higher than observed in nonpregnant controls,

followed by a significant decrease in third trimester<sup>28</sup>. Similarly, Tham *et al.* have recently shown lower acylated ghrelin values in pregnancy when compared to postpartum values<sup>30</sup>.

Unexpectedly, we observed in our study that baseline fasting acylated ghrelin did not differ significantly between gestation groups and controls. However, our study compares acylated ghrelin among pregnant groups and nonpregnant women matched by age and body mass index, which might explain the observed differences to other studies which did not take it into consideration.

We could not observe significant changes in acylated ghrelin values after glucose overload in all groups, showing that the acylated peptide does not change during a glucose overload. Thus, although total ghrelin is usually described as suppressed in postprandial states either in gestation or not<sup>29, 32-33</sup>, our data on acylated ghrelin following glucose overload do not support the same conclusion, suggesting that acylated ghrelin is differently regulated. However, the gestational diabetic group shows a further decrease in acylated ghrelin levels after 60 min in OGTT when compared to the other groups, possibly due to the increased insulin resistance observed in this group of women.

Studies on postprandial acylated ghrelin are scarce and inconclusive, and they generally use a meal test. Sadowski *et al.* showed, after a mixed meal test, a significant suppression in acylated ghrelin in obese and lean pregnant women but not in morbidly obese pregnant<sup>34</sup>. Zwirska-Korczala *et al.* did not show otherwise acylated ghrelin suppression after a meal test in obese women<sup>35</sup>. Tham *et al.* described a significant decrease in acylated ghrelin during pregnancy and postpartum period by using a mix meal<sup>30</sup>. In our study, it is possible that 75 g glucose may not be sufficient to suppress acylated ghrelin.

During pregnancy, insulin resistance is a normal physiological adaptation, and we could though argue that lower acylated ghrelin levels might be another adaptation to pregnancy. It is well known that insulin sensitivity, cortisol and leptin are major important factors regulating acylated ghrelin regulation<sup>36-38</sup>. Our data are then comparable to the higher insulin values and lower ghrelin levels observed in obesity, diabetes and other insulin resistant states<sup>28, 39</sup>. Indeed, our GDM group showed higher plasma glucose than GES group with similar plasma insulin values, and lower insulin sensitivity as assessed by HOMA, which may explain the significant lower acylated ghrelin levels in this group of patients.

In conclusion we show that acylated ghrelin has similar values in healthy women, healthy pregnant, and gestational diabetes when matched for age and BMI. Our data also show lower acylated ghrelin values in GDM when compared to GES group during a glucose challenge. We could hypothesize that higher insulin resistance in gestational diabetes group might explain the observed lower ghrelin levels. Future studies enrolling a larger number of patients and with determinations of des-acyl ghrelin in the same samples would better clarify the issue.

### Legends

**Figure 1.** Chart shows glycemc curve during OGTT in the tree groups: gestational diabetes mellitus (GDM), healthy pregnancy (GES) and no pregnant women (NOR). \* $p < 0.05$  GDM x GES/NOR. \*\* $p < 0,01$  GDM x GES/NOR.

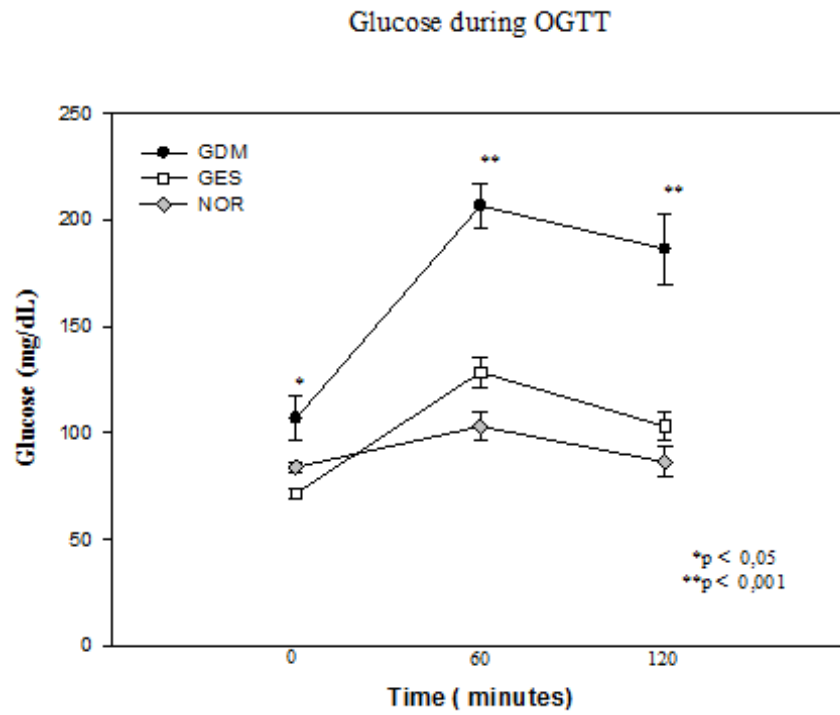
**Figure 2.** Chart shows plasmatic insulin curve during OGTT in the three groups: gestational diabetes (GDM), healthy pregnancy (GES) and no pregnant women (NOR). \* $p < 0.05$  NOR x GDM. \*\* $p < 0.01$  NOR x GES/GDM.

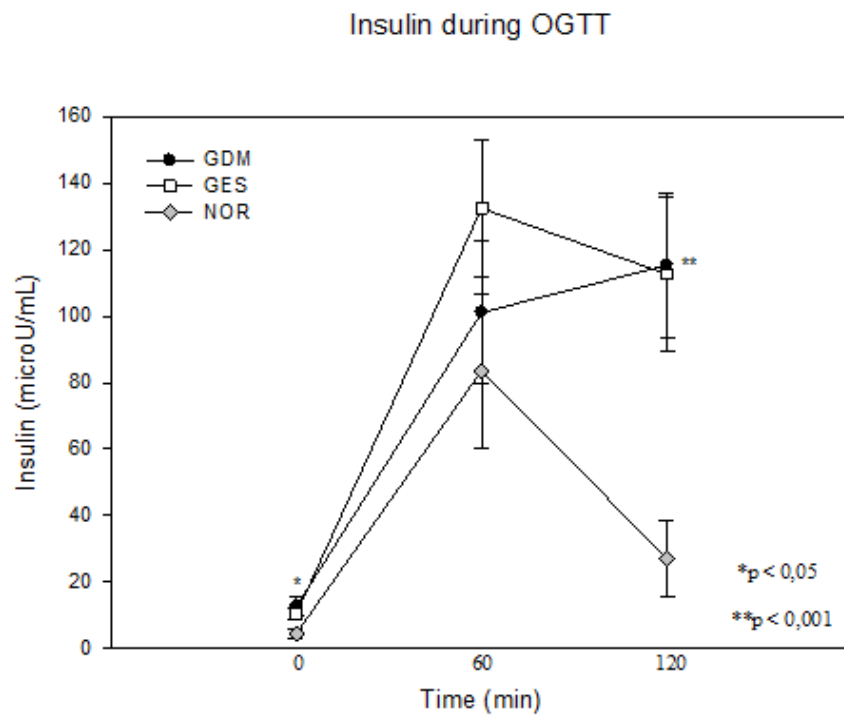
**Figure 3.** Comparison of HOMA-IR (MATTHEWS *et al*, ) values at time point 0, in the three groups: gestational diabetes (GDM), healthy pregnancy (GES) and no pregnant women (NOR). \* $p < 0,05$  GDM x NOR.

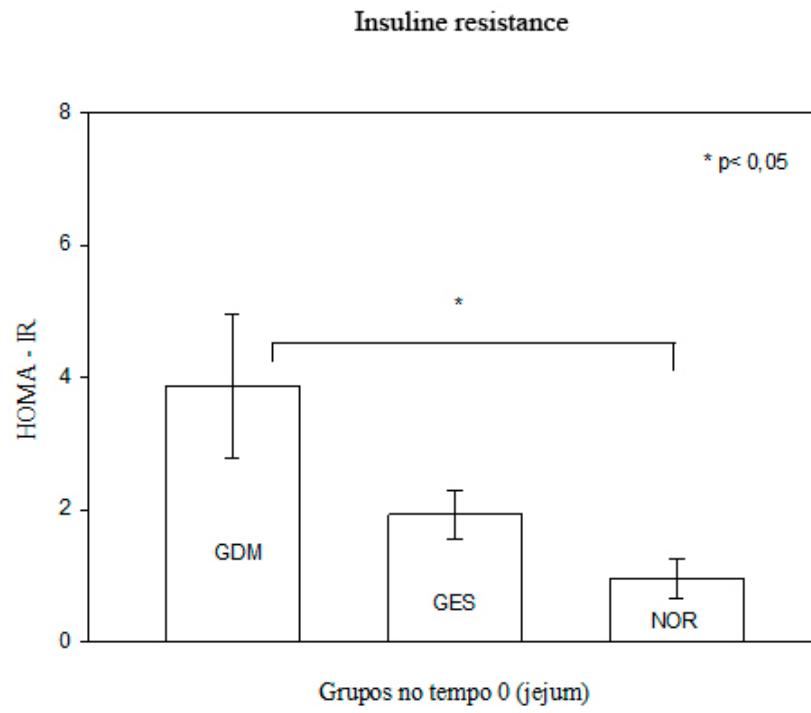
**Figure 4.** Chart shows plasmatic acylated ghrelin curve during OGTT in the three groups: gestational diabetes (GDM), healthy pregnancy (GES) and no pregnant women (NOR). \* $p < 0.05$  GDM x GES.

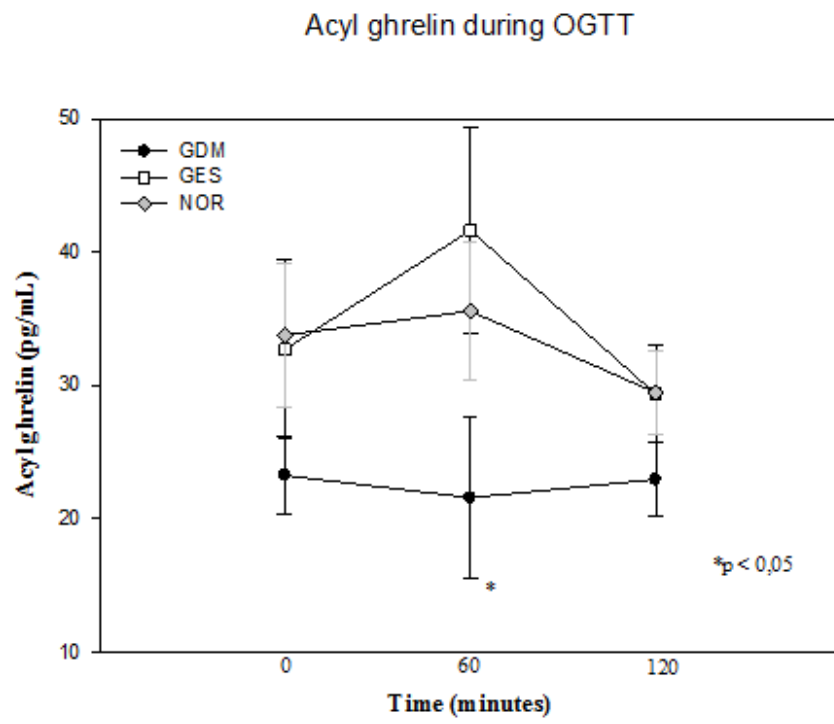
## Figures

**Figure 1:** Glucose during OGTT



**Figure 2:** Insulin during OGTT

**Figure 3:** Insuline resistance

**Figure 4:** Acyl ghrelin during OGTT

## References

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec;402(6762):656-60.
2. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2988.
3. Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol*. 2002;440(2-3):235-54.
4. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Dec;279(3):909-13.
5. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2001 Jun;24(6):RC19-21.
6. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan;87(1):240-4.
7. Le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):1068-71.
8. Cappiello V, Ronchi C, Morpurgo PS, Epaminonda P, Arosio M, Beck-Peccoz P, Spada A. Circulating ghrelin levels in basal conditions and during glucose tolerance test in acromegalic patients. *Eur J Endocrinol*. 2002 Apr;147(2):189-94.
9. Barber TM, Casanueva FF, Karpe F, Lage M, Franks S, McCarthy MI, Wass JA. Ghrelin levels are suppressed and show a blunted response to oral glucose in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2008 Apr;158(4):511-6.
10. Anderwald C, Brabant G, Bernroider E, Horn R, Brehm A, Waldhäusl W, Roden M. Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1792-8.
11. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Oct;89(4):1630-5.

12. Kuhl C, Hornnes PJ, Andersen O. Etiology and pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 1985;34 Suppl 2:66-70.
13. Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Feb;284(2):E313-6.
14. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi EK, Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Aug;87(8):3997-4000.
15. Caixás A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrère B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Apr;87(4):1902.
16. Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJD, Abribat T, van Koetsveld PM, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Oct;89(10):5035-42.
17. Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):1055-60.
18. Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA, van de Zande B, Delhanty PJD, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen APN, and van der Lely AJ. Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Jun;293(3):E697-704.
19. Proceedings of the 4th International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Chicago, Illinois, USA. 1997 March 14-16. *Diabetes Care*. 1998;21 Suppl 2:B1-167.
20. Brasil. Ministério Nacional da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. [cited 2011 Oct 20]. Available from: <<http://vsites.unb.br/fs/clm/labcor/etic196.htm>>.
21. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
22. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatti MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. Dec 2001;86(12):5992.
23. Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, Nakata M, Kakei M. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev*. 2008;4(1):18-23.

24. Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes*. 2006 Dec;55(12):3486-93.
25. Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol*. 2002;440(2-3):235-54.
26. Homko CJ, Sivan E, Reece EA, Boden G. Fuel metabolism during pregnancy. *Semin Reprod Endocrinol*. 1999;17(2):119-25.
27. Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, Nakata M, Kakei M. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev*. 2008;4(1):18-23.
28. Palik E, Baranyi E, Melczer Z, Audikovszky M, Szöcs A, Winkler G, Cseh K. Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76(3):351-7.
29. Riedl M, Maier C, Handisurya A, Luger A, Kautzky-Willer A. Insulin resistance has no impact on ghrelin suppression in pregnancy. *J Intern Med*. 2007 Oct;262(4):458-65.
30. Tham E, Liu J, Innis S, Thompson D, Gaylinn BD, Bogarin R, Haim A, Thorner MO, Chanoine J-P. Acylated ghrelin concentrations are markedly decreased during pregnancy in mothers with and without gestational diabetes: relationship with cholinesterase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 May;296(5):E1093-100.
31. Fuglsang J, Skjaerbaek C, Espelund U, Frystyk J, Fisker S, Flyvbjerg A, Ovesen P. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 May;62(5):554-9.
32. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2001 Jun;24(6):RC19-21.
33. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan;87(1):240-4.
34. Sadowski K, Zwirska-Korczala K, Kuka D, Kukla M, Budziszewska P, Czuba B, Włoch A, Cnota W, Bielański W, Brzozowski T, Rehfeld JF, Zdun R, Konturek PC. Basal and postprandial gut peptides affecting food intake in lean and obese pregnant women. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Mar;58 Suppl 1:37-52.
35. Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Sadowski M, Wylezol M, Kuka D, Sowa P, Adamczyk-Sowa M, Kukla M, Berdowska A, Rehfeld JF, Bielanski W, Brzozowski T. Basal and postprandial plasma levels of PYY, ghrelin, cholecystokinin, gastrin and insulin in women with moderate and morbid obesity and metabolic syndrome. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Mar;58 Suppl 1:13-35.

36. Kempa A, Krzyzanowska-Swiniarska B, Miazgowski T, Pilarska K. Not insulin but insulin sensitivity, leptin, and cortisol are major factors regulating serum acylated ghrelin level in healthy women. *J Endocrinol Invest.* 2007 Sept;30(8):659-65.
37. Paik KH, Choe YH, Park WH, Oh YJ, Kim AH, Chu SH, Kim SW, Kwon EK, Han SJ, Shon WY, Jin D-K. Suppression of acylated ghrelin during oral glucose tolerance test is correlated with whole-body insulin sensitivity in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Feb;91(5):1876-81.
38. Damjanovic SS, Stojic RV, Lalic NM, Audikovsky M, Szöcs A, Winkler G, Cseh K. Relationship between basal metabolic rate and cortisol secretion throughout pregnancy. *Endocrine.* 2009 Apr;35(2):262-8.
39. St-Pierre DH, Bastard JP, Coderre L, Brochu M, Karelis AD, Lavoie ME, Malita F, Fontaine J, Mignault D, Cianflone K, Imbeault P, Doucet E, Rabasa-Lhoret R. Association of acylated ghrelin profiles with chronic inflammatory markers in overweight and obese postmenopausal women: a MONET study. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(4):419-26.

## **ANEXO 2: FREE FATTY ACIDS (FFA) ARE INCREASED IN GESTATIONAL DIABETES DURING ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST (OGTT)**

*Ricardo Barsaglini Leite\**, *Guilherme Fagundes Nascimento*, *Paulo Augusto C Miranda\**, *Anelise Impelizeri Nogueira\**, *Rodrigo Bastos Foscolo\**, *Lucas José Campos Machado\**, *Cândido Celso Coimbra\*\** and *Antonio Ribeiro de Oliveira Junior\**

### **Abstract**

Gestational diabetes is a common insulin resistant state, and high free fat acids (FFA) levels are involved in pathophysiology of insulin resistance. It is known that FFA levels are elevated on the third trimester of pregnancy, although little has been reported on FFA metabolism in pregnancies complicated by gestational diabetes. The aim of this study was to evaluate plasma FFA in OGTT tests of pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. Twenty women, 14 gestational diabetics (GDM) and 6 healthy pregnant (NOR), were recruited from the obstetric ward and evaluated by a 3h 100g-OGTT. We observed significant decline in FFAs in both groups. However, higher FFA values could be observed during all time points in OGTT test in GDM group when compared to healthy pregnant ( $P < 0.01$ ). Therefore, although FFA levels decline during OGTT in GDM group, levels are still higher than in healthy pregnant group. These higher values might collaborate with major insulin resistance in GDM patients.

**Keywords:** Diabetes mellitus. Free fatty acids. Gestational diabetes mellitus. Glucose metabolism. Insulin resistance. Postprandial period. Pregnancy. Oral glucose tolerance test.

**Conflict of interest:** There is no conflict of interest.

### **Introduction**

Gestational diabetes is one of the most common metabolic abnormalities occurring during late pregnancy <sup>1</sup>. The oral glucose tolerance test (OGTT) is a common utilized tool employed either to diagnose gestational diabetes in pregnancy or to monitor the kinetics of glucose and

---

\*Laboratory of Endocrinology and \*\*Laboratory of Physiology, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

insulin for scientific purposes <sup>2</sup>. Insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism are all affected to a variable degree in gestational diabetes. Decreased maternal insulin sensitivity coupled to an inadequate insulin response is the pathophysiological mechanisms underlying the development of gestational diabetes <sup>3</sup>.

The development of insulin resistance during late pregnancy is a normal physiological adaptation that shifts maternal energy metabolism from carbohydrate to lipid oxidation and thus spares glucose for the growing fetus <sup>4</sup>. Women with gestational diabetes mellitus demonstrate an increase in insulin resistance beyond the observed in the normal pregnant state <sup>5-6</sup>. The reason for deterioration in insulin sensitivity is not well understood, although it has been generally assumed to be the result of rising blood levels of diabetogenic hormones, including human placental lactogen, human placental growth hormone, cortisol, progesterone and estrogens <sup>7-8</sup>. However, there are reasons to believe that plasma free fatty acids (FFA) may play a role in the development of insulin resistance in late pregnancy.

Studies in humans have demonstrated that physiological elevation of plasma FFA inhibit dose dependently insulin-stimulated glucose uptake in both normal men and type 2 diabetes patients <sup>9</sup>. Increases in plasma FFA levels may be due to the lipolytic action of placental hormones, notably human placental lactogen (hPL) which reach very high blood levels during late gestation <sup>10</sup>. Interestingly, women with gestational diabetes have levels of FFA that exceed those of healthy pregnant controls <sup>11</sup>, supporting the idea that FFA may play a role in the pathogenesis of insulin resistance in gestational diabetes <sup>12</sup>. Although much is known on the changes in glucose metabolism during gestation, little has been published on free fatty acids (FFA) metabolism in gestational diabetes. It has been shown that fasting FFA levels are elevated in late diabetic pregnancy <sup>13-14</sup>, but none of the studies have explored the changes in FFA levels in oral glucose tolerance tests (OGTTs).

The aim of this study was to evaluate plasma FFA concentrations during OGTT in gestational diabetic patients as compared to normal gestation in order to get new insights into the pathophysiology of gestational diabetes.

## Methods

The study was performed in Clinic's Hospital of Federal University of Minas Gerais where GDM (n = 14) and healthy pregnant (n = 6) women were recruited from a convenient sample of obstetric outpatients. All women underwent a test for GDM between 28 and 35 weeks gestation, which involved a 3h-100g-OGTT following an overnight 8h fasting.

The study protocol received approval from the local Ethics Committee on Human Experimentation. Each patient signed a term of informed consent in compliance with the Brazilian Regulation on Human Experimentation (Resolution 196/96)<sup>15</sup>.

GDM were diagnosed according to the OGTT criteria of John B. O'Sullivan and Claire M. Mahan and American Diabetes Association recommendations<sup>16</sup>. Samples were withdrawn for plasma glucose and FFA determinations at baseline, 1, 2 and 3h hour after glucose overload. Plasma glucose and FFA were measured in duplicate by ELISA (Millipore, EZGRA-88K, St. Charles, Missouri, U.S.A) and glucose oxidase (BIOCLIN/QUIBASA, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) respectively. The intra-assay coefficient of variation was less than 10% for both assays.

None of the patients were hypertensive and they were not in use of any medicines but vitamins. No clinical alterations could be detected in any pregnant patient through a careful physical examination and routine laboratory measurements other than OGTT.

Data were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). All statistical analyses were performed by using Sigma Plot software (Sigma Plot for Windows 11.0.077, copyright 2008 Systat Software, Inc.). The differences between groups were determined by repeated measures two-way ANOVA, followed by Holm-Sidak method. A p value  $< 0.05$  was taken as significant.

## Results

The mean age and gestation week were respectively  $33.56 \pm 2.21$  years and  $32.46 \pm 0.78$  weeks gestation in GDM group, and  $32.00 \pm 1.37$  years and  $31.17 \pm 0.98$  weeks gestation in

the healthy pregnant groups ( $p > 0.05$  for both comparisons). During OGTT, the glucose curves were significantly different as expected to the diagnosis of gestational diabetes relative to controls ( $p = 0.003$ ) (Figure 5).

GDM showed significant higher plasma FFA in basal state when compared to controls ( $p < 0.05$ ) (Figure 6). FFA levels were suppressed during OGTT with a significant decrease in both groups from basal to 60 min ( $p < 0.001$ ). The analysis of the FFA curves during OGTT shows that were different between GDM groups and healthy pregnancy, controls group ( $p < 0.001$ ).

## Discussion

Gestational diabetes has been described as a condition of multiple defects in insulin action together with impaired compensation for insulin resistance. These defects range from deregulation of glucose production, glucose clearance, to defects in pancreatic beta-cell function<sup>17</sup>. Excess exposure to fatty acids is also involved in the pathogenesis of insulin resistance and impaired glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)<sup>18</sup>. We show here that women with gestational diabetes have levels of FFAs in late pregnancy that exceed those of normal gestation, both at baseline and all time OGTT points.

We have showed here that the FFA curve during TTOG in GDM group is significantly different from the curve of normal gestation. This may be explained by impaired lipolysis suppression after glucose overload, potentially related to higher levels of human placental lactogen hormone exceeding the observed in normal pregnancy in these group of patients. Furthermore, other higher placental hormones in the third trimester of GDM pregnancies<sup>19</sup>, such as human placental growth hormone<sup>20</sup>, could also be involved in the higher FFA levels in these patients and major insulin resistance and impaired glucose stimulated insulin release (GSIS) compared to normal pregnancy.

Mclachlan *et al.* reported that susceptibility to lipid-induced reduction in GSIS are found in women with previous gestational diabetes whose required insulin<sup>21</sup>. Chan *et al.* found higher levels of glycerol and 3-OH butyrate but not non-esterified fatty acids (NEFA) were found during OGTT in women with previous gestational diabetes<sup>22</sup>. These data already show that

previous abnormalities of lipid metabolism might have a role in pathophysiologic of gestational diabetes.

In conclusion, FFA levels are higher in gestational diabetes both at fasting baseline as well as during all OGTT time points. We though argue that these higher FFA levels during OGTT in GDM group accounts for the major insulin resistance observed in this group of patients.

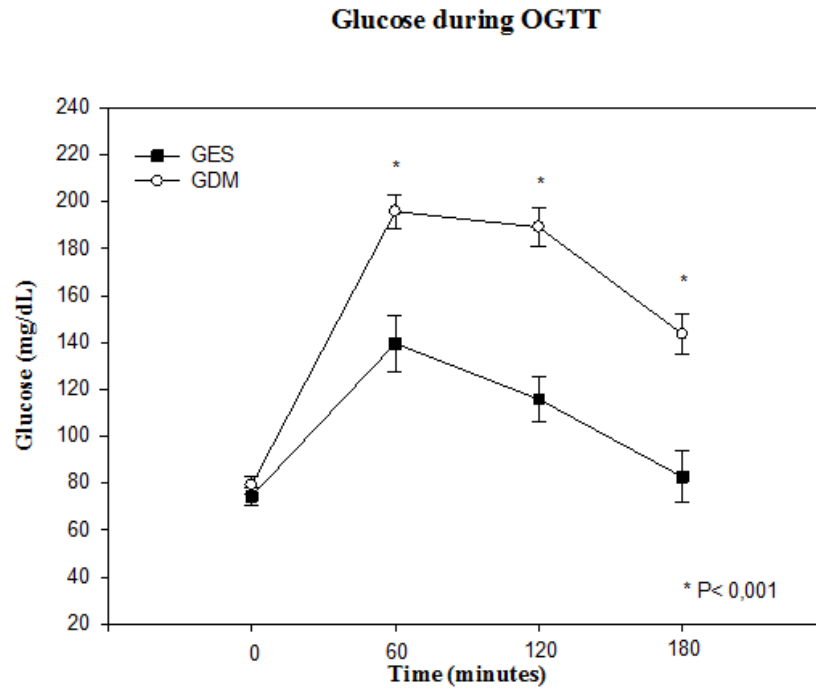
### **Legends**

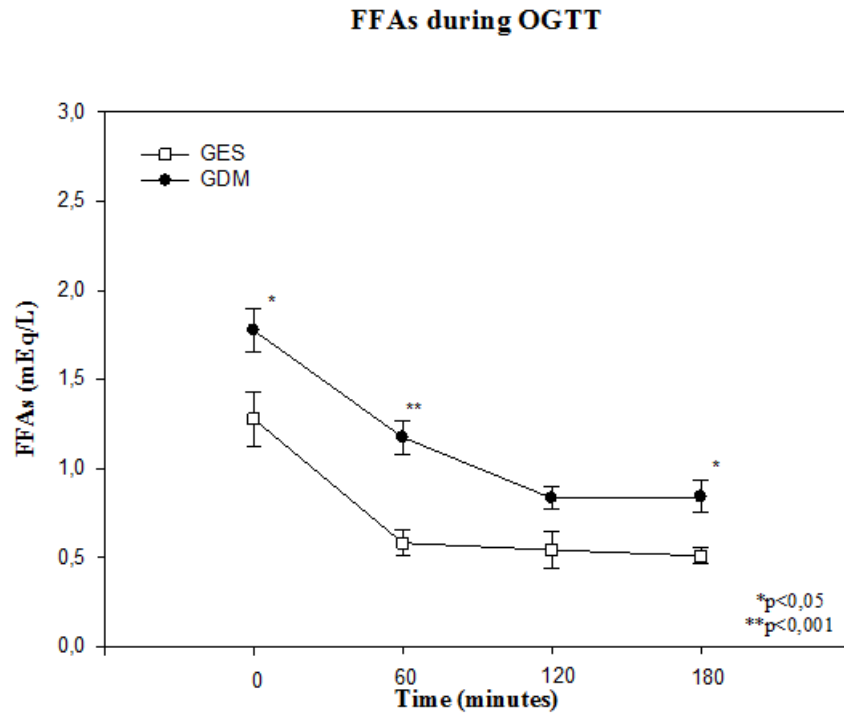
**Figure 5:** Glycemic curve during OGTT in the two groups: group gestational diabetes (GDM), healthy pregnancy (GES). \*\* $p < 0.01$  GDM x GES.

**Figure 6:** Plasmatic free fat acids (FFA) curve during OGTT in the two groups: group gestational diabetes (GDM), healthy pregnancy (GES). \* $p < 0,05$  GDM x GDM. \*\* $p < 0.01$  GDM x GES

## Figures

**Figure 5:** Glucose during OGTT



**Figure 6:** Free fat acids (FFA) during OGTT

## References

1. Hod M, Merlob P, Friedman S, Schoenfeld A, Ovadia J. Gestational diabetes mellitus. A survey of perinatal complications in the 1980s. *Diabetes*. 1991 Dec;40 Suppl 2:74-78.
2. Reaven G, Miller R. Study of the relationship between glucose and insulin responses to an oral glucose load in man. *Diabetes*. 1968 Sept;17(9):560-569.
3. Kuhl C, Hornnes PJ, Andersen O. Etiology and pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 1985 Jun;34 Suppl 2:66-70.
4. Homko CJ, Sivan E, Reece EA, Boden G. Fuel metabolism during pregnancy. *Semin Reprod Endocrinol*. 1999;17(2):119-125.
5. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Quiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Mar;282(3):E522-33.
6. Sivan E, Homko CJ, Chen X, Reece EA, Boden G. Effect of insulin on fat metabolism during and after normal pregnancy. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):834-838.
7. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30 Suppl 2:S112-9.
8. Damjanovic SS, Stojic RV, Lalic NM, Audikovsky M, Szöcs A, Winkler G, Cseh K. Relationship between basal metabolic rate and cortisol secretion throughout pregnancy. *Endocrine*. 2009 Apr;35(2):262-268.
9. Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003 May;111(3):121-124.
10. Cao X, Qin W, He Z. [Changes of carbohydrate metabolism in normal pregnancy and its relationship with placental lactogen concentrations]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1998 Feb;33(2):80-82.
11. Chen X, Scholl TO. Association of elevated free fatty acids during late pregnancy with preterm delivery. *Obstet Gynecol*. 2008 Aug;112(2 Pt 1):297-303.
12. Bomba-Opon D, Wielgos M, Szymanska M, Bablok L. Effects of free fatty acids on the course of gestational diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006 Feb-Apr;27(1-2):277-280.

13. Couch SC, Philipson EH, Bendel RB, Pujda LM, Milvae RA, Lammi-Keefe CJ. Elevated lipoprotein lipids and gestational hormones in women with diet-treated gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *J Diabetes Complications*. 1998 Jan-Feb;12(1):1-9.
14. Meyer B, Calvert D, Moses R. Free fatty acids and gestational diabetes mellitus. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1996 Aug;36(3):255-257.
15. Brasil. Ministério Nacional da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. [cited 2011 Oct 20]. Available from: <<http://vsites.unb.br/fs/clm/labcor/etic196.htm>>.
16. Proceedings of the 4th International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus; 1997 14-16 March; Chicago, Illinois, USA. *Diabetes Care*. 1998;21 Suppl 2:B1-167.
17. Xiang AH, Peters RK, Trigo E, Kjos SL, Lee WP, Buchanan TA. Multiple metabolic defects during late pregnancy in women at high risk for type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):848-854.
18. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*. 1995 Aug;44(8):863-870.
19. Montelongo A, Lasuncion MA, Pallardo LF, Herrera E. Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes*. 1992 Dec;41(12):1651-1659.
20. Eriksson L, Frankenne F, Eden S, Hennen G, Von SB. Growth hormone 24-h serum profiles during pregnancy--lack of pulsatility for the secretion of the placental variant. *Br J Obstet Gynaecol*. 1989 Aug;96(8):949-953.
21. McLachlan KA, Boston R, Alford FP. Impaired non-esterified fatty acid suppression to intravenous glucose during late pregnancy persists postpartum in gestational diabetes: a dominant role for decreased insulin secretion rather than insulin resistance. *Diabetologia*. 2005 Jul;48(7):1373-1379.
22. Chan SP, Gelding SV, McManus RJ, Nicholls JS, Anyaoku V, Niththyananthan R, Johnston DG, Dornhorst A. Abnormalities of intermediary metabolism following a gestational diabetic pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992 Apr;36(4):417-420.

## ANEXO 3: FOLHA DE APROVAÇÃO


**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **RICARDO BARSAGLINI SILVA LEITE**, nº de registro 2007653669. Às nove horas do dia quatro mês de novembro de dois mil e nove, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação aprovada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DA GRELINA ACILADA E DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DURANTE TESTE DE TOLERANCIA ORAL À GLICOSE NA GESTAÇÃO NORMAL E NA GESTAÇÃO COMPLICADA POR DIABETES GESTACIONAL”**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Clínicas, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior da, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado definitivo. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior/Orientador  
Prof. Maria de Fátima Hausen Sander Diniz  
Prof. Ana Cristina Simões e Silva

Instituição: UFMG  
Instituição: UFMG  
Instituição: UFMG

Indicação: Aprovado  
Indicação: Aprovado  
Indicação: Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 04 de novembro de 2009.

Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior/Orientador Antonio R. O. Jr.

Prof. Maria de Fátima Hausen Sander Diniz M. F. Hausen Sander Diniz

Prof. Ana Cristina Simões e Silva Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Carlos Faria Santos Amaral/Coordenador Carlos F. Santos Amaral

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

**PROF. CARLOS FARIA SANTOS AMARAL**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto  
Faculdade de Medicina/UFMG

CONFERE COM O ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
*Antonio Ribeiro de Oliveira Junior*



**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
cpg@medicina.ufmg.br



**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Antonio Ribeiro de Oliveira Junior, Maria de Fátima Hausen Sander Diniz, Ana Cristina Simões e Silva, aprovou a defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DA GRELINA ACILADA E DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DURANTE TESTE DE TOLERANCIA ORAL À GLICOSE NA GESTAÇÃO NORMAL E NA GESTAÇÃO COMPLICADA POR DIABETES GESTACIONAL”**, apresentada pelo mestrando **RICARDO BARSAGLINI DA SILVA LEITE** para obtenção do título de Mestre em Ciências Clínicas, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 04 de novembro de 2009.

Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior  
Orientador

Profa. Maria de Fátima Hausen Sander Diniz

Profa. Ana Cristina Simões e Silva