

DANIELA MIGUEL MARIN

**RESISTÊNCIA À INSULINA E FUNÇÃO DA CÉLULA β :
efeito da perda de peso após bypass gástrico**

CAMPINAS

Unicamp

2007

DANIELA MIGUEL MARIN

**RESISTÊNCIA À INSULINA E FUNÇÃO DA CÉLULA β :
efeito da perda de peso após bypass gástrico**

Tese de Doutorado apresentada à Pós Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de concentração em
Ciências Básicas.

ORIENTADORA: PROFa. Dra. SARAH MONTE ALEGRE

CO-ORIENTADORA: PROFa. Dra. ELZA OLGA ANA MUSCELLI BERARDI

CAMPINAS

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M338r Marin, Daniela Miguel
Resistência à insulina e função da célula β : efeito da perda de peso após bypass gástrico / Daniela Miguel Marin. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores : Sarah Monte Alegre, Elza Olga Ana Muscelli Berardi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Emagrecimento. 2. Resistência a insulina. 3. Obesidade. 4. Insulina - secreção. 5. Cirurgia bariátrica. I. Alegre, Sarah Monte. II. Berardi, Elza Olga Ana Muscelli. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Insulin resistance and β -cell function in severe obesity: Effect of weight loss after gastric bypass

Keywords: • Weight loss
• Insulin resistance
• Obesity
• Insulin secretion
• Gastric bypass

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sarah Monte Alegre
Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis
Profa. Dra. Walkyria de Paula Pimenta
Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad
Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Data da defesa: 31 - 07 - 2007



Fls. n.º 28
Proc. n.º 20978-02
Rub. Jus

ATA Nº. 166/07

Cópia autêntica da Ata da Comissão Examinadora da Tese de Doutorado a que se submeteu **DANIELA MIGUEL MARIN (RA-994090)**, aluno regularmente matriculado no Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, nível de Doutorado.

Ata da Comissão Examinadora da Tese de Doutorado a que se submeteu a aluna **DANIELA MIGUEL MARIN (RA994090)**, aluna regularmente matriculado no Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, nível de Doutorado. Aos **trinta e um dia do mês de julho dois mil e sete**, com início às 14:00hs, no Anfiteatro da Farmacologia/FCM da Universidade Estadual de Campinas, reuniu-se a Comissão Examinadora para a prova em epígrafe, formada pelos Professores Doutores: Sarah Monte Alegre (matricula-91375), Presidente e Orientadora Maria Grassi Kassis, Walkyria Pimenta, Mário José Abdalla Saad e José Barreto Campello Carvalheira, membros. Os trabalhos foram considerados abertos pela Profa. Dra. Sarah Monte Alegre, que agradeceu a presença de todos e passou a palavra a candidata para que expusesse seu trabalho de Tese, o qual teria a duração de "trinta minutos" e versou sobre o tema "**Resistência à insulina e função da célula B: efeito da perda de peso após bypass gástrico**". A seguir deu-se início às arguições na seguinte ordem: Professora Doutora Maria Grassi Kassis, Professora Doutora Walkyria Pimenta, Professor Doutor Mário José Abdalla Saad, Professor Doutor José Barreto Campello Carvalheira e Professora Doutora Sarah Monte Alegre que colocaram suas dúvidas, as quais foram sendo esclarecidas pela candidata. Logo após foi dado um intervalo de dez minutos para que os examinadores proferissem um parecer final. Considerando a candidata aprovada por unanimidade e levando em conta a relevância do trabalho apresentado, a Banca Examinadora houve por bem concluir pela aprovação. Portanto, a candidata foi considerada "Aprovada", fazendo jus ao Título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas. Para que o respectivo título possa ser concedido, com as prerrogativas legais dele advindas, é necessário que ocorra a entrega dos volumes definitivos no prazo de máximo de **60 dias**, a constar da data da defesa. Nada mais havendo a constar, eu, Cristiane Patrícia de Freitas, secretária da Subcomissão de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, lavrei a presente ata.

Campinas, 31 de julho de 2007

Professora Doutora Maria Grassi Kassis

Professora Doutora Walkyria Pimenta

Professor Doutor Mário José Abdalla Saad

Professora Doutora José Barreto Campello Carvalheira

Professora Doutora Sarah Monte Alegre

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Mario e Maria Teresa,
aos meus irmão Rodrigo e Talita, aos
“agregados” Rodolfo e Fernanda e à
minha sobrinha Maria Lívia.*

AGRADECIMENTOS

As minhas orientadoras Dra. Elza e à Dra. Sarah pela competência, apoio, dedicação, incentivo, cumplicidade que me serviram de exemplo à minha vida profissional e acadêmica. Meu muito obrigado!

Ao Dr. José Carlos Pareja pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pelo incentivo, pelas idéias e ao Dr. Elinton Adami Chaim pela disposição no decorrer do trabalho.

Aos Residentes e aos funcionários Leni, Noberval e Neusa da Enfermeria Geral de Adultos pela colaboração e disposição nos momentos de apuro.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica Ademir, Sandra, Anastácia, Ester, Beatriz e do Ambulatório de medicina interna Irene, Paula e Paulinho.

À equipe do ambulatório de cirurgia pelas sugestões e ajuda.

Aos voluntários que colaboraram para a realização deste trabalho .

Aos meus amigos do Laboratório de Unidade Metabólica: Conceição, Aglécio, Brenno, pela amizade, pelo trabalho em equipe e incentivo.

Aos meus outros amigos que sempre me incentivaram e apoiaram: Audrey, Fernanda, Roseneide, Elaine, Márcia, Cristiane, Paula, Ana Maria, Arlete, Gláucia, Alessandra, Beatriz, Anali, Joseane, Salete, Josiane, Camila, Erica, Raquel, Luis e Katsumi.

Pelos meus amigos que sempre me incentivaram e apoiaram: Audrey, Fernanda, Roseneide, Elaine, Márcia, Cristiane, Paula, Ana Maria, Arlete, Gláucia, Alessandra, Beatriz, Anali, Josiane, Salete.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e aos meus irmão pelo apoio e paciência.

	Pág.
RESUMO.....	<i>xxvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxi</i>
1- INTRODUÇÃO.....	35
1.1- Regulação da Secreção de Insulina.....	37
1.2- Secreção de Insulina e Resistência à Insulina.....	39
1.3- Secreção de Insulina na Intolerância à Glicose e Diabetes Mellitus.....	40
1.4- Papel da Primeira Fase de secreção e da Sensibilidade da célula β à glicose.....	41
1.5- Fatores que influenciam a sensibilidade à insulina e secreção de insulina.....	41
1.5.1- Ácidos Graxos Livres e Lipotoxicidade.....	42
1.5.2- Glicotoxicidade.....	43
1.5.3- Citocinas Inflamatórias e adipocinas.....	43
1.6- Métodos de Avaliação da sensibilidade à insulina e secreção de insulina.....	44
1.7- Emagrecimento, sensibilidade à insulina e secreção de insulina.....	45
2- OBJETIVOS.....	47
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1- Tipo, população e local de estudo.....	53
3.2- Métodos de Convocação.....	53
3.3- Critérios de Inclusão e Exclusão.....	53

3.4- Aspectos Éticos.....	53
3.5- Variáveis.....	54
3.6- Protocolo Experimental.....	54
3.6.1- Medidas Antropométricas.....	55
3.6.2- Avaliação da Composição Corporal.....	55
3.6.3- Avaliação da Pressão arterial.....	56
3.6.4- Avaliação do Gasto Calórico e Utilização de Substratos Energéticos.....	56
3.7- Estudos Metabólicos.....	57
3.7.1- Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG).....	57
3.7.2- Teste Endovenoso de Tolerância à Glicose (TETG) ou IVGTT (intravenous glucose tolerance test).....	58
3.7.3- <i>Clamp</i> Euglicêmico Hiperinsulinêmico.....	58
3.8- Acondicionamento de amostras.....	60
3.9- Métodos Analíticos.....	60
3.10- Cálculos e fórmulas.....	62
3.11- Análise dos Dados.....	64
4- RESULTADOS.....	67
4.1- Fase pré-operatória.....	69
4.1.1- Antropometria e Composição corporal.....	69
4.1.2- Teste de tolerância oral à glicose.....	70
4.1.3- Teste Endovenoso de tolerância à glicose.....	71
4.1.4- Sensibilidade da célula β à glicose.....	74

4.1.5- Índices de adaptação da Secreção de Insulina ao grau de resistência à insulina.....	75
4.1.6- <i>Clamp</i> euglicêmico hiperinsulinemico.....	77
4.1.7- Calorimetria.....	79
4.1.8- Ácidos graxos livres (AGL).....	83
4.1.9- Adiponectina.....	83
4.1.10- Correlação entre as variáveis no período pré-operatório.....	84
4.2- Fase pós-emagrecimento.....	87
4.2.1- Antropometria e Composição corporal.....	87
4.2.2- Teste Endovenoso de tolerância à glicose e Sensibilidade da célula β à glicose.....	88
4.2.3- Índices de adaptação da Secreção de Insulina ao grau de resistência à insulina.....	90
4.2.4- <i>Clamp</i> euglicêmico hiperinsulinemico.....	91
4.2.5- Calorimetria.....	92
4.2.6- Ácidos graxos livres e Adiponectina.....	96
4.2.7- Correlações entre as variáveis após emagrecimento.....	97
5- DISCUSSÃO.....	99
6- CONCLUSÃO.....	107
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8- ANEXOS.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil CoA	Acetil coenzima A
AGL	Ácido graxo livre
Asc	Ares sob a curva
ASC	área sob a curva
BIA	Bioimpedância elétrica
Clamp	Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico
CO ₂	Gás carbônico
CRP	Proteína C reativa
CT	Grupo Controle: indivíduos eutróficos
DI	Do inglês: disposition index
DM	Grupo de Diabéticos
DPP	Do inglês: Diabetes Prevention Programm
ELISA	Do ingles: enzyme linked immunosorbent assay
FC	Frequência Cardíaca
f-IS	Do ingles: fasting insulin secretion
FSIVGTT	Do inglês: frequent sample intravenous glucose tolerance test
GE	Gasto energético
GIP	Do inglês: glucose-dependent insulintropic polypeptide
GIR	Do inglês: glucose infusion rate
GLP-1	Do inglês: glucagon like peptide-1
GOX	Do inglês: glucose oxidation
HDL	Do inglês: high density lipoprotein

IDR	Do inglês: insulin delivery rate
Ikk B	Do inglês: Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corpora
IR	Do ingles: insulin resistance
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
IS	Do inglês: insulin sensitivi
ISR	Do inglês: insulin secretion rate
IT	Grupo com intolerância à glicose
JNC VI	Joint Committee on Hypertension
LDL	Do inglês: low density lipoprotein
LPL	lipase lipoprotéica
M	M: captação total de glicose
MM	Massa Magra
N	Nitrogênio urinário
NADH	nucleotídeo adenina
NOGD	Do inglês: non oxidative glucose disposal
NT	Grupo com tolerância normal à glicose
O ₂	Gás oxigênio
°C	Graus Celsius
OB	Grupo de voluntários com obesidade
OGTT	Do inglês: oral glucose tolerance test
PAD	Pressão Arterial Diastólica

PAS	Pressão Arterial Sistólica
Pep C	Peptídeo C
PI3 K	fosfatidil inositol 3 quinase
QR	Coeficiente respiratório
RAI	Resposta Aguda de Insulina
SC	Superfície corporal
SF	Soro fisiológico
Slope	Inclinação da curva dose- resposta
Steady State - SS	Estado de equilíbrio - clamp
TETG	Teste endovenoso de tolerância à glicose
T-IS	Do inglês: total insulin secretion
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UI	unidade internacional
UKPDS	Do inglês: United Kingdom
uU	micro unidade
VCO ₂	Volume de gás carbônico
VLDL	Do inglês: very low density lipoprotein
VO ₂	Volume de gás oxigênio
WHO	Do inglês: World Health Organization

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1- Características gerais dos grupos CT e subgrupos de OB na fase pré-operatória.....	70
Tabela 2 - Características Metabólicas dos grupos CT e subgrupos de OB na fase pré-operatória.....	72
Tabela 3- Resultados do <i>Clamp</i> euglicêmico hiperinsulinêmico.....	79
Tabela 4- Utilização de substratos energéticos no período basal e durante a infusão de insulina.....	81
Tabela 5- Resultados da calorimetria no período basal e durante infusão de insulina.....	82
Tabela 6- Correlações entre as variáveis.....	85
Tabela 7- Características Antropométricas e Metabólicas após emagrecimento.....	87
Tabela 8- TETG – teste endovenoso de tolerância à glicose após emagrecimento.....	88
Tabela 9- Resultados do <i>Clamp</i> euglicêmico hiperinsulinêmico após emagrecimento.....	92
Tabela 10- Utilização de substratos energéticos no período basal e durante a infusão de insulina após emagrecimento.....	94
Tabela 11- Resultados da calorimetria no período basal e durante infusão de insulina após emagrecimento.....	95

	Pág.
Figura 1- IVGTT no período pré-operatório.....	73
Figura 2- IVGTT - Sensibilidade da célula β à glicose, no período pré-operatório.....	74
Figura 3- Índices de adaptação da IS à resistência à insulina no pré-operatório.....	76
Figura 4- <i>Clamp</i> euglicêmico hiperinsulinêmico.....	78
Figura 5- <i>Clamp</i> - M_{value} , oxidação e utilização não oxidativa de glicose no período pré-operatório.....	80
Figura 6- Ácidos graxos livres durante o <i>clamp</i> no período pré-operatório.....	83
Figura 7- Adiponectinemia no período pré-operatório.....	84
Figura 8- Correlação entre a glicemia 2h e a sensibilidade da célula β (A) e a sensibilidade à insulina (B) no período pré-operatório.....	86
Figura 9- IVGTT no período pós-operatório.....	89
Figura 10- IVGTT - Sensibilidade da célula β à glicose, no período pré-operatório.....	90
Figura 11- Índices de adaptação da IS à resistência à insulina durante o IVGTT (disposition index)	91
Figura 12- <i>Clamp</i> - M_{value} , oxidação e utilização não oxidativa de glicose no período pré-operatório.....	93
Figura 13- Adiponectina plasmática no <i>clamp</i> – período pós-operatório.....	96
Figura 14- Ácidos graxos livres durante o <i>clamp</i> após emagrecimento.....	97



RESUMO

A obesidade é caracterizada pela presença de resistência à insulina e hiperinsulinemia e constitui em fator de risco para outras doenças, tais como hipertensão arterial, diabetes mellitus, hiperlipidemia (Ashley 1974; Mokdad 2003). Na obesidade, a resistência à insulina induz uma resposta secretória aumentada para um determinado estímulo tanto em condição basal de jejum como após sobrecarga de glicose. A progressão da tolerância normal à glicose ao Diabetes Mellitus tipo 2 em sujeitos eutróficos e com obesidade, é caracterizada por reduções na função da célula β e diminuição na sensibilidade à insulina e ambas desempenham importante papel fisiopatológico (Unwin *et al* 2002; Buchana *et al* 2002; Ferrannini *et al* 2004; Kitabchi *et al* 2005). A perda de peso parece melhorar a sensibilidade à insulina, o controle glicêmico (UKPDS 1990; Sjöström 1997; Dixon 2002) e retardar a progressão da intolerância à glicose ao diabetes mellitus (DPP, 2002). Após bypass gástrico essas alterações têm sido demonstradas (Pereira 2003b; Korner 2005, Shah 2006), porém não são bem conhecidas quais mudanças ocorrem na função da célula β e na relação entre secreção de insulina e resistência à insulina após o emagrecimento maciço induzido por bypass gástrico. Este estudo tem como objetivo avaliar a contribuição da resistência à insulina e da disfunção da célula β sobre a tolerância a glicose, avaliar a adaptação da secreção de insulina pelo grau de resistência à insulina e avaliar o efeito da perda de peso induzida por *bypass* gástrico sobre os parâmetros de secreção de insulina, resistência à insulina e a adaptação da secreção de insulina à resistência à insulina. Trinta e dois voluntários com obesidade grau III (15 NT, 11 IT e 6 DM) e 10 controles (CT) foram submetidos a 3 estudos metabólicos: *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (3h a 240pmol de insulina/min.m⁻²) com calorimetria indireta, teste intravenoso e teste oral de tolerância à glicose. A sensibilidade à insulina (M) foi calculada a partir da taxa de infusão de glicose durante o *clamp*. As taxas de secreção total (T-ISR) e de jejum (f-ISR) foram avaliadas pela deconvolução do peptídeo C e a sensibilidade da célula β à glicose (β -SG) foi calculada como a inclinação da curva dose resposta de secreção de insulina pela concentração de glicose. O índice adaptation foi calculado como a taxa de secreção de insulina total e de 1ª fase multiplicada pelo M *value*. 14 voluntários (11 NT e 3 IT) foram reavaliados após a estabilização da perda de peso (~18 meses) induzida por bypass gástrico.

Os voluntários obesos eram resistentes à insulina para o consumo total de glicose assim como para o consumo oxidativo e não oxidativo de glicose. A fase rápida de secreção de insulina (RAI: 0-10 min-TETG) foi maior nos obesos normotolerantes comparado aos intolerantes, diabéticos e ao grupo controle (CT 5378 ± 590 ; OB-NT 9363 ± 895 ; OB-IT 6544 ± 558 e OB-DM 3893 ± 622 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \times 10 \text{min}$). A T-ISR esteve aumentada em todos os subgrupos de obesos (CT $20,2 \pm 1,9$; OB-NT $39,2 \pm 3,6$; OB-IT $39,2 \pm 2,5$ e OB-DM $37,1 \pm 4,5$ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \times 60 \text{min}$) enquanto a sensibilidade da célula β à glicose e o índice *adaptation* foram menores nos intolerantes e diabéticos mas não nos obesos normotolerantes quando comparado aos controles (OB-DM -4 ± 3 ; OB-IT 31 ± 4 ; OB-NT 56 ± 6 e CT 43 ± 6 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{mM}^{-1}$). Após a perda de peso, os voluntários ainda permaneceram na faixa de obesidade (IMC $30,2 \pm 1,2 \text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$), porém a secreção basal de insulina (f-ISR de 148 ± 12 para 83 ± 12 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, $p < 0,05$) e a sensibilidade à insulina (M de 30 ± 4 para $50 \pm 5 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0,05$) foram normalizados. Houve diminuição da secreção total de insulina e aumento da sensibilidade da célula β à glicose a valores maiores daqueles observados no grupo controle (de 43 ± 7 para 75 ± 10 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{mM}^{-1}$). O índice *adaptation* aumentou a valores maiores que os observados no grupo controle. Em conclusão, este estudo nos permitiu confirmar que mesmo em pacientes portadores de obesidade grave, a intolerância à glicose se manifesta quando a célula β não consegue manter uma hipersecreção capaz de compensar a importante resistência à insulina, entre outros fatores, por reduzida sensibilidade à glicose. A resistência à insulina é dependente do grau de obesidade e de menores concentrações de adiponectina. O emagrecimento induzido por bypass gástrico em pessoas não diabéticas é capaz de restaurar a sensibilidade à insulina e a sensibilidade à glicose, melhorando o metabolismo dos carboidratos. A extensão deste estudo a pacientes diabéticos emagrecidos por bypass gástrico é importante para melhor compreender os mecanismos envolvidos.



ABSTRACT

The objectives are to evaluate the contribution of insulin resistance and impaired β -cell function to glucose tolerance in severely obese subjects and the effect of massive weight loss by Roux-en-Y Gastric bypass, RGB-Y, on the adaptation of insulin secretion to insulin resistance (IR). Euglycemic hyperinsulinemic clamp (3h at $240\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) with indirect calorimetry, IV glucose tolerance test and an OGTT were performed in 32 severe obese subjects (17NGT, 11IGT and 6type 2 diabetic – OB-T2D) and in 10 controls. Insulin sensitivity, Mvalue, was calculated from the glucose infusion rate of the clamp. Total (T-ISR) and fasting insulin secretion rate (f-ISR) were evaluated by C-peptide deconvolution and β -cell glucose sensitivity (β -GS) as dose-response curve ISR-to-glucose. Disposition index was calculated as $\text{ISR}\times\text{Mvalue}$. 14 patients (11OB-NGT and 3OB-IGT) were re-evaluated post-surgery after weight stabilization (~ 18 months). Obese subjects were insulin resistant for oxidative, nonoxidative and whole body glucose disposal (OB-T2D, OB-IGT and OB-NGT were $\sim 30\%$, 60% and 43% of CT). The acute insulin response (AIR: 0-10min-IVGTT) was higher in OB-NGT than in CT and in other obese groups (CT 5378 ± 590 ; OB-NGT 9363 ± 895 ; OB-IGT 6544 ± 558 and OB-T2D 3893 ± 622 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\times 10\text{min}$), T-ISR was elevated in all obese groups (CT 20.2 ± 1.9 ; OB-NGT 39.2 ± 3.6 ; OB-IGT 39.2 ± 2.5 and OB-T2D 37.1 ± 4.5 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\times 60\text{min}$) while β -GS was decreased in OB-IGT and -T2DM but not in -NGT as compared to CT (OB-T2D -4 ± 3 ; OB-IGT 31 ± 4 ; OB-NGT 56 ± 6 and CT 43 ± 6 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$). The disposition index was reduced in OB-IGT and -T2DM but not in -NGT. After weight loss (BMI $30.2\pm 1.2\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$), f-ISR (from 148 ± 12 to 83 ± 12 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, $p<0.05$) and insulin sensitivity (from 30 ± 4 to $50\pm 5\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, $p<0.05$) changed to normal values. The time-course evidenced a significant decrease in T-ISR, and an unchanged AIR. β -GS increased to levels higher than CT (from 43 ± 7 to 75 ± 10 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$). The disposition index, similar to the CT group, after weight loss increased to values higher than in CT. T2D and IGT severe obese subjects show a progressive deterioration of glucose homeostasis, despite increased insulin secretion. This can be explained as an impairment of β -cell function for the prevailing IR. RGB-Y weight loss normalized IR and improved β -cell function in IGT and NGT obese to levels higher than in lean CT.



1- INTRODUÇÃO

A obesidade é hoje caracterizada como doença, pois diversas alterações patológicas a ela associadas foram reconhecidas e várias outras se encontram em avaliação em diferentes populações. Acredita-se que a obesidade seja uma doença multifatorial relacionada a fatores ambientais e genéticos, que são motivos de intensa pesquisa. Paralelamente, a obesidade implica em diversas complicações para a saúde ou se constitui em fator de risco para outras doenças, tais como hipertensão arterial, diabetes mellitus, hiperlipidemia (Ashley 1974; Mokdad 2003).

A resistência à insulina e a hiperinsulinemia são características da obesidade (Perley 1954; Bonora 1985, De Fronzo 1992; Lilloja & Bogardus, 1988) características estas presentes, inclusive, na obesidade precoce (Caprio *et al*, 1996) e que são extremas em obesos mórbidos (Muscelli, 2001; Greco, 2002). A resistência à insulina está presente em todas as vias metabólicas de oxidação e armazenamento de substratos energéticos como glicose, proteína e lipídeos (Pereira, 2001).

Recentemente, várias substâncias secretadas pelo tecido adiposo têm sido identificadas e parecem exercer funções locais e ou sistêmicas, inclusive influenciando a sensibilidade à insulina. Dentre essas substâncias, os ácidos graxos livres, interleucina-6, fator de necrose tumoral α , adiponectina, resistina e leptina têm tido grande destaque na literatura por relacionar-se à resistência a insulina e poder ser um elo de ligação entre obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus.

1.1- Regulação da Secreção de Insulina

Em condições fisiológicas, a secreção de insulina é regulada principalmente pela concentração de glicose sérica, mas também pela velocidade em que ocorrem as mudanças destas concentrações (Cerasi, 1972).

O aumento lento e progressivo das concentrações de glicose é acompanhado de um aumento correspondente da secreção de insulina, porém quando a concentração de glicose é elevada abruptamente pode-se observar um perfil bifásico de secreção de insulina. Esse perfil bifásico da secreção de insulina não é observado quando a concentração de

glicose aumenta progressivamente como ocorre após refeições ou sobrecarga oral de glicose, mas pode ser observado *in vivo* após infusão intravenosa de glicose (Cerasi, 1972) e de outros secretagogos como, por exemplo, a arginina. A primeira fase de secreção ou fase rápida tem duração de 10 minutos e se caracteriza por um pico rápido e transitório, de 3 a 5 minutos após o estímulo seguido de diminuição das concentrações insulinêmicas para valores ainda acima do basal e de aumento progressivo, ou seja, de uma segunda fase de secreção ou fase lenta (Cerasi, 1967). Esta, além de aumentar mais gradualmente é proporcional ao estímulo glicídico. A amplitude da primeira fase também aumenta com doses progressivas de glicose (Caumo, 2004). As duas fases de secreção não se distinguem em condições fisiológicas como após a alimentação, onde a glicemia aumenta gradualmente. A secreção de insulina nos primeiros 30 minutos após ingestão de glicose (fase rápida do teste oral de tolerância à glicose – TOTG) seria correspondente à primeira fase acima descrita e, observada em testes intravenosos com mudanças abruptas e intensas das concentrações glicêmicas (Hanson, 2000).

A habilidade da célula β em responder prontamente ao estímulo parecer ser essencial para a homeostase da glicose e a perda dessa capacidade tem sido considerada um sinal de disfunção da célula β característico ou preditivo de diabetes mellitus (Bruzell, 1976).

Outra característica do padrão de secreção da insulina é a sua dependência da concentração de glicose que segue *in vitro*, uma relação sigmóide. O aumento da resposta insulínica inicia-se com concentrações séricas de glicose a partir de valores de jejum, em torno de 90 mg/dl. Uma resposta máxima é observada para concentrações entre 162 e 360 mg/dl, valores semelhantes aos encontrados no período pós prandial, acima dos quais não há alteração da velocidade de secreção de insulina (Malaisse, 1979). A sensibilidade da célula β à glicose tem sido quantificada através do *slope* ou angulação da curva que descreve a resposta secretória de insulina em função de concentrações progressivas de glicose. Esta importante medida define a rapidez e a intensidade da resposta insulínica (Toffolo 1995, Kahn 1993, Mari 2002).

Para concentrações plasmáticas similares de glicose, a resposta secretória de insulina é maior após a administração oral de glicose comparada à intravenosa. Esta diferença, denominada efeito incretínico, é dependente de estímulo gastrointestinal desencadeado pela absorção de glicose (Nauck, 1986 b). Entre outros mecanismos que o explicam, são liberados hormônios gastro-intestinais tais como o *glucagon-like peptide-1*, GLP-1, e o *glucose-dependent insulintropic polypeptide*, GIP, os quais aumentam a secreção de insulina através do aumento da sensibilidade da célula β à glicose (Kjems 2003). Outros autores (Gromada 1997; Gromada 1998) sugerem efeito inibitório dos canais de potássio e efeito excitatório dos canais de cálcio dependentes de voltagem, contribuindo para o aumento da secreção de insulina.

1.2- Secreção de Insulina e Resistência à Insulina

É aceito que uma progressiva diminuição da sensibilidade à insulina é acompanhada por respectivo aumento na secreção de insulina resultando numa constante e apropriada captação de glicose. Esta resposta é denominada relação hiperbólica da insulina (Kahn *et al* 1993; Ahrén *et al* 2004). Na obesidade, a resistência à insulina induz uma resposta secretória aumentada para um determinado estímulo tanto em condição basal de jejum como após sobrecarga de glicose. Assim, a importante hiperinsulinemia, freqüente em sujeitos com obesidade grau III e tolerância normal à glicose, refletiria uma adequada resposta adaptativa da célula β à resistência à insulina presente (Jones, 2000).

Nesse sentido, para avaliar se a secreção de insulina, ou melhor, se a função da célula β é adequada ao grau de resistência à insulina, deve-se avaliar concomitantemente a sensibilidade à insulina e a relação entre elas (Bergman 2002; Mari 2005).

A progressão da tolerância normal à glicose ao Diabetes Mellitus tipo 2 em sujeitos eutróficos ou com obesidade, é caracterizada por reduções na função da célula β e diminuição na sensibilidade das células à insulina e ambas desempenham importante papel fisiopatológico (Unwin *et al* 2002; Buchana *et al* 2002; Ferrannini *et al* 2004; Kitabchi *et al* 2005).

1.3- Secreção de Insulina na Intolerância à Glicose e Diabetes Mellitus

A ausência ou redução da amplitude da primeira fase de secreção de insulina em resposta a uma carga de glicose intravenosa é freqüente no diabetes tipo 2, e foi observada também em indivíduos com intolerância à glicose (Abdul-Ghani 2006). A sensibilidade da célula β à glicose e a sensibilidade à insulina parecem contribuir de maneira independente para a deterioração da tolerância à glicose. Recentemente, Gastaldelli *et al* mostraram que a deterioração da tolerância à glicose não somente aparece em paralelo a uma progressiva disfunção da célula β , mas também que este defeito está presente em sujeitos com glicemia 2 horas após sobrecarga de glicose maiores, mas ainda dentro dos limites da tolerância normal à glicose (Gastaldelli 2004). Estes resultados têm sido confirmados usando-se modelos matemáticos de análise da secreção de insulina (Ferrannini 2005) demonstrando que, entre os fatores que contribuem para a deterioração da tolerância à glicose, a diminuição da sensibilidade da célula β precede a diminuição da sensibilidade à insulina. Deficiência de secreção de insulina na primeira e segunda fase em teste intravenoso e após sobrecarga oral de glicose foi observada em pessoas com intolerância à glicose (Efendic 1974; Noyoa 2005; Abdul-Ghani 2006). Portanto, a habilidade da célula β em compensar a importante resistência à insulina está prejudicada nos estados de intolerância à glicose, antes mesmo do diagnóstico de diabetes tipo 2.

Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 frequentemente apresentam hiperinsulinemia, porém em concentrações inapropriados para a respectiva concentração de glicose. Alterações na função da célula β parecem ter maior importância para desencadear o diabetes que a resistência à insulina (Ferrannini 2005). Clinicamente, apresentam ausência da primeira fase de secreção de insulina, redução da segunda fase e um achatamento da curva dose-resposta entre glicose e taxa de secreção de insulina, ou seja, redução da sensibilidade da célula β à glicose (Pfeifer, 1981; Ward, 1984; Byrne, 1996).

1.4- Papel da Primeira Fase de secreção e da Sensibilidade da célula β à glicose

A redução ou ausência da primeira fase de secreção da insulina tem sido proposta como a principal evidência da disfunção da célula β . De maneira geral, a primeira fase de secreção de insulina está associada à supressão da produção hepática de glicose e à manutenção da homeostase da glicose pós prandial. De fato, uma maior amplitude da primeira fase acarreta maiores e mais rápidas excursões intersticiais de insulina nos tecidos periféricos, mas principalmente nos sinusóides hepáticos (Caumo, 2004). A supressão da produção hepática de glicose por sua vez parece ser diretamente dependente das concentrações de insulina nos sinusóides hepáticos e, indiretamente dos efeitos periféricos deste hormônio, inibindo a lipólise e diminuindo a oferta de ácidos graxos livres ao fígado (Cherrington, 1998).

Ambas as fases de secreção de insulina parecem importantes para contraregular os efeitos do glucagon. De fato, em cães a inibição da primeira fase induziu aumento da produção hepática de glicose e hiperglicemia (Steiner, 1982). O mecanismo envolvido seria uma redução da gliconeogênese (Steiner, 1986). É importante ressaltar que disfunções da secreção na primeira fase após estímulo intravenoso afetam igualmente a secreção rápida após refeição ou TOTG. Outra observação é que a secreção de insulina segue padrões oscilatórios. Isto favorece altas concentrações no sistema portal, melhorando a sua ação no fígado.

1.5- Fatores que influenciam a sensibilidade à insulina e secreção de insulina

O aumento da insulinemia e da resistência à insulina é proporcional ao aumento da massa adiposa, portanto o tecido adiposo pode de alguma forma, estar implicado no desenvolvimento da resistência à insulina. O tecido adiposo deixou de ser visto somente como um órgão de reserva energética e essa nova visão começou a existir após a descoberta da leptina em 1994 (ZHANG et al, 1994). Várias substâncias secretadas pelo tecido adiposo têm sido identificadas e parecem exercer funções locais e ou sistêmicas, influenciando inclusive a sensibilidade à insulina (Havel, 2002; Rajala, 2003).

1.5.1- Ácidos Graxos Livres e Lipotoxicidade

O aumento de ácidos graxos livres, especialmente os de cadeia longa não esterificados, promove alterações em diversos tecidos, fato que tem sido denominado lipotoxicidade. Na obesidade e no diabetes tipo2 observam-se aumentos dos ácidos graxos circulantes e uma menor supressão sob efeito da insulina. Podem se relacionar à resistência a insulina e podem ser um elo de ligação entre obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus, inclusive por ação deletéria na célula β (Nolan, 2006). A relação entre ácidos graxos livres e secreção de insulina é bastante complexa e não é completamente conhecida. Desta forma, sabe-se que são importantes para a secreção de insulina, mas em determinadas situações têm papel inibitório (Zhou,1995).

Uma explicação possível para o efeito prejudicial sobre a ação da insulina envolve uma oferta elevada de ácidos graxos livres que resultaria em aumento da relação Acetil CoA/CoA e NADH/NAD⁺ com subsequente aumento da concentração intracelular de glicose e diminuição da sua captação muscular (Randle, 1963). De fato, a infusão aguda de lipídeos em pessoas normais diminuiu a captação de glicose pelo músculo (Ferrannini, 1983). E, neste caso, tanto a oxidação como a síntese de glicogênio foram afetadas, à semelhança do que se verifica em obesos. No entanto, é importante observar que os mecanismos principais de resistência à insulina envolvem os receptores da insulina e, também as diversas etapas da via de sinalização da insulina (Garvey WT e Birnbaum M, 1993) e neste sentido outro mecanismo proposto envolve a fosforilação em serina dos substratos do receptor 1 de insulina reduzindo a habilidade deste substrato em ativar a PI-3 quinase e o conseqüente transporte de glicose (Dresner 1999). O aumento de ácidos graxos livres pode promover um processo inflamatório através da fosforilação da IKK- β e dessa maneira induzir à resistência à insulina (White, 2003).

1.5.2- Glicotoxicidade

A hiperglicemia crônica parece exercer efeito inibitório sobre a ação e secreção da insulina e esta toxicidade à glicose pode ocorrer por diversos mecanismos, desde a indução de apoptose das células β contribuindo para a redução da massa celular ativa, diminuição da expressão gênica da insulina, geração de stress oxidativo crônico, acúmulo de produtos finais de glicosilação, inibição da atividade de fatores de transcrição da insulina ou aumento da expressão de inibidores da transcrição da insulina (Poitout 2002).

1.5.3- Citocinas inflamatórias e adiponectina

As citocinas inflamatórias interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) entre outras, têm tido grande destaque na literatura por relacionar-se à resistência à insulina. Alguns pesquisadores propõem que o estado pró-inflamatório possa ser um elo de ligação entre obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus (Pickup,1997; Pickup,1998; Festa,2000; Senn, 2002). Ao contrário, a adipocina adiponectina, que é reduzida na obesidade e no diabetes mellitus, tem ações opostas, ou seja, melhora a sensibilidade à insulina e reduz a inflamação.

A adiponectina apresenta efeitos antiinflamatórios por inibir a atividade fagocitária e a produção de TNF- α pelos macrófagos (Yokota *et al*, 2000) e pode estar relacionada à sensibilidade à insulina pelos mecanismos descritos a seguir. Concentrações reduzidas de adiponectina foram observados na obesidade e diabetes mellitus tipo 2 e parecem estar mais relacionados ao grau de resistência à insulina que à adiposidade e à glicemia, sugerindo que os baixos valores encontrados na obesidade e diabetes mellitus tipo 2 seriam explicados por representarem estados de resistência à insulina (Weyer *et al*, 2001). A adiponectina é a única proteína secretada pelo tecido adiposo que tem sua expressão diminuída nos estados de obesidade e diabetes mellitus tipo 2. Estes achados em conjunto sugerem papel da adiponectina na patogênese de ambas as patologias.

Está relacionada ao balanço energético, pois a administração de adiponectina em camundongos induziu a perda de peso, apesar da manutenção da ingestão alimentar, reduziu os ácidos graxos circulantes e aumentou a oxidação lipídica muscular, melhorando, dessa forma, a sensibilidade à insulina. (Fruebis *et al*, 2001). Em ratos, aumentos agudos na concentração plasmática de adiponectina foram associados a uma supressão da liberação hepática de glicose, sem, no entanto, afetar a captação muscular de glicose (Combs *et al*, 2001). Fruebis *et al* (2001), mostrou resultados semelhantes na melhora da glicemia, relacionada à diminuição da liberação hepática de glicose e a um aumento da captação da glicose na musculatura. Esta última seria induzida pela oxidação lipídica muscular, pois nenhuma alteração nas concentrações de insulina foi observada.

1.6- Métodos de Avaliação da sensibilidade à insulina e secreção de insulina

A avaliação da sensibilidade à insulina e da secreção de insulina podem ser realizadas por diferentes métodos. Dentre os métodos para avaliar a secreção de insulina, há aqueles que utilizam medidas de jejum como o Homa-B (Mattheus, 1985), ou a razão entre as áreas sob a curva de insulinemia e glicemia no teste oral de tolerância à glicose (TOTG) bem como a razão entre as áreas incrementais de insulina e glicemia nos trinta primeiros minutos do teste oral como medida de secreção de fase rápida (Phillips, 1994). O TTOG e a avaliação da secreção de insulina após uma alimentação padrão pré-definida são os métodos mais fisiológicos. Os métodos mais aceitos como *gold standard* para investigar a secreção de insulina, em suas diferentes fases, em resposta à administração intravenosa de glicose, são o clamp hiperglicêmico e o teste intravenoso de tolerância à glicose (TITG), bem como o TITG com coletas freqüentes de sangue (FSIVGTT). Além disto, os modelos matemáticos que utilizam principalmente as concentrações de peptídeo-C e a glicemia permitem avaliar diferentes características da resposta secretória *in vivo*. O peptídeo-C caracteriza-se pela co-secreção com a insulina (Rubenstein, 1969) e a ausência de extração hepática. (Polonsky, 1983; Bratusch-Marrain, 1984)

Em nosso estudo, utilizamos o teste intravenoso de tolerância à glicose para a avaliação da primeira e segunda fases de secreção de insulina (Chen, 1976) bem como as taxas de secreção de insulina basal e total.

Quanto à avaliação da sensibilidade à insulina, utilizou-se o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado a metodologia *gold standard* (De Fronzo, 1979)

1.7- Emagrecimento, sensibilidade à insulina e secreção de insulina

Vários estudos têm mostrado que a perda de peso melhora a sensibilidade à insulina e o controle glicêmico (UKPDS 1990; Sjöström 1997; Dixon 2002), retarda a progressão da intolerância à glicose ao diabetes mellitus (DPP, 2002) e também promove a melhora da auto inibição da secreção de insulina (Pereira, 2003 a). Por outro lado, o tempo e o método utilizado para o emagrecimento podem ser importantes fatores que modulam a melhora da secreção de insulina, tal como ocorre para a sensibilidade à insulina (Muscelli 2005).

Existem controvérsias quanto ao grau de melhora de cada um destes parâmetros. Alguns estudos relatam uma diminuição da hipersecreção de insulina aquém do esperado pelo grau de perda ponderal (Guldstrand, 2003). Porém ainda são desconhecidos os mecanismos envolvidos na interação entre perda de peso, sensibilidade à insulina e secreção de insulina.

A melhora da resistência à insulina, da tolerância à glicose e a diminuição da hiperinsulinemia tem sido observadas após bypass gástrico (Pereira 2003b; Korner 2005, Shah 2006), porém as mudanças na sensibilidade da célula β à glicose e a relação entre secreção de insulina e resistência à insulina permanecem obscuras.

A habilidade da célula β em compensar a importante resistência à insulina na obesidade grave com diferentes graus de tolerância à glicose também não é completamente conhecida.



2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar a relação entre secreção de insulina e resistência à insulina em indivíduos com obesidade grau III com diferentes graus de tolerância à glicose submetidos à *bypass* gástrico

Objetivos Específicos

- Avaliar a contribuição da resistência à insulina e da disfunção da célula β sobre a tolerância a glicose
- Avaliar a influência da adiponectina e dos ácidos graxos livres sobre a resistência à insulina e a secreção de insulina
- Avaliar a adaptação da secreção de insulina pelo grau de resistência à insulina
- Avaliar o efeito da perda de peso induzida por *bypass* gástrico sobre os parâmetros de secreção de insulina, resistência à insulina e a adaptação da secreção de insulina à resistência à insulina



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Tipo, população e local de estudo.

O estudo, do tipo longitudinal foi realizado em adultos com idade entre 22 e 54 anos portadores de obesidade mórbida (n=32), atendidos no ambulatório de cirurgia da obesidade do HC-UNICAMP, antes de serem submetidos à cirurgia bariátrica (Fobi, 2001) no período de outubro de 2002 a agosto de 2004 e em indivíduos eutróficos (n=9) pareados aos pacientes obesos quanto a sexo e idade.

3.2- Métodos de Convocação

Os pacientes que constavam da lista de chamada para a cirurgia bariátrica foram convidados a participar do estudo. Os indivíduos eutróficos foram selecionados entre a comunidade universitária, e entre as pessoas que procuram os ambulatórios da medicina interna. Os pacientes que fizeram a cirurgia foram convocados para a reavaliação pós-emagrecimento após um período mínimo de 18 meses após a cirurgia (n=14).

3.3- Critérios de Inclusão e Exclusão

O estudo foi realizado com os indivíduos que aceitaram participar e que tivessem entre 18 e 60 anos idade, e IMC entre 40 e 50kg/m² para os indivíduos obesos e entre 20 e 25kg/m² para os participantes do grupo controle(WHO, 2000). Os critérios de exclusão utilizados foram: hipertensão arterial, uso de reposição hormonal, insuficiência renal e hepática, uso de corticóides ou outros fármacos que interfiram na sensibilidade e na secreção de insulina.

3.4- Aspectos Éticos

Todos os voluntários incluídos foram informados e esclarecidos previamente sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas sob o nº....

3.5- Variáveis

Os pacientes foram avaliados quanto às medidas antropométricas, de composição corporal, gasto calórico, utilização de substratos energéticos, sensibilidade e secreção de insulina, tolerância à glicose, pressão arterial, frequência cardíaca e foram efetuadas dosagens bioquímicas em sangue e urina, coletados nos diferentes exames. Demais informações coletadas foram: idade, sexo, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, antecedentes de doenças pessoais e familiares.

Tabagismo, alcoolismo e atividade física.

O tabagismo foi avaliado pelo hábito de fumar e pelo consumo diário de cigarros. O consumo de bebida alcoólica, por sua vez, foi avaliado em gramas de álcool/semana, considerando-se o teor alcoólico médio do tipo de bebida referida, independente da marca comercial. Os voluntários foram questionados quanto ao tipo de atividade física, duração e frequência.

3.6- Protocolo Experimental

Os voluntários do grupo controle e os obesos no período pré-operatório compareceram em três ocasiões à Unidade Metabólica para a realização dos exames. Na primeira ocasião, foram submetidos ao Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG), avaliação antropométrica e a avaliação da pressão arterial. Os critérios da American Diabetes Association foram utilizados para a classificação da tolerância à glicose a partir das glicemias obtidas no TOTG. Na segunda ocasião, ao Teste Intravenoso de Tolerância à Glicose (TITG) e finalmente, em uma terceira oportunidade, ao *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, com duração de 180 minutos, havendo um intervalo mínimo de sete dias entre cada um dos estudos.

Os pacientes obesos foram reavaliados após um período mínimo de 18 meses a partir da cirurgia, momento em que a perda de peso é estável. Nesta fase foram realizados o estudo *Clamp* e TITG mas não o TOTG devido à pequena capacidade gástrica do novo estômago.

3.6.1- Medidas Antropométricas

A mensuração de peso foi realizada através da utilização de balança mecânica da marca Welmy com precisão de 100g, sendo que o paciente encontrava-se vestindo roupas leves e sem sapatos. Para a medida da altura foi utilizado estadiômetro acoplado à balança com divisão de 0,5 cm. A medição foi realizada com o indivíduo descalço (WHO,2000).

A circunferência da cintura foi medida no ponto mais estreito entre a última costela e a crista ilíaca, com fita métrica com escala milimétrica. A circunferência do quadril foi determinada com a mesma fita métrica, na porção mais larga da região glútea (Kissebah, 1997).

3.6.2- Avaliação da Composição Corporal

A avaliação da composição corporal por Bioimpedância elétrica (BIA) foi realizada utilizando-se aparelho Biodynamics Modelo 310, após um jejum mínimo de 4 horas. Além disso, os pacientes foram orientados a não ingerir bebida alcoólica, café, coca cola, guaraná, chá mate ou preto e a não praticar exercícios físicos no dia anterior ao estudo (Mattar, 1995). No exame de bioimpedância, os valores de massa magra, peso de água e gordura corporal e porcentagem de gordura corporal foram estimados através de equações contidas no software do próprio aparelho, utilizando os valores de bio-resistência obtidos em cada paciente.

3.6.3- Avaliação da Pressão arterial

A pressão arterial foi medida através de esfigmomanômetro de mercúrio, após repouso mínimo de 15 minutos em decúbito dorsal. Quando o diâmetro do braço era maior que 30 cm, foram utilizadas braçadeira e cuff apropriados, ou seja, mais longos (Rastam, 1990). Foram obtidas três medições, com intervalo de 1 minuto entre elas e a média das duas últimas medidas foi computada.

Foram considerados o primeiro e o último sons de Korotkof para as pressões sistólica e a diastólica respectivamente. Hipertensão arterial foi definida como pressão arterial sistólica maior que 140mmHg ou pressão arterial diastólica maior que 90mmHg, em duas diferentes consultas, de acordo com critérios do JNC VI, 1997.

3.6.4- Avaliação do Gasto Calórico e Utilização de Substratos Energéticos

O gasto calórico de repouso e os substratos utilizados para a obtenção de energia foram avaliados pelo método da calorimetria indireta, realizada juntamente com o *clamp*, descrito no item 2.6.4. Para tanto, foi utilizado um aparelho da marca Vmax Sensor Medics, modelo 29N, acoplado a uma canopla de troca gasosa. As medidas foram registradas em 3 intervalos de 30 minutos cada: período basal, de 90 a 120 e de 150 a 180 minutos após o início da infusão de insulina. No decorrer da calorimetria, solicitou-se aos voluntários que permanecessem em silêncio e acordados, a fim de evitar alterações respiratórias. Neste procedimento mediram-se o consumo de oxigênio (O_2) e a eliminação de gás carbônico (CO_2) em litros por minuto, bem como o volume corrente. A partir destas medidas primárias, obtivemos os valores do gasto energético em quilocalorias por dia e o coeficiente respiratório (QR). Foram consideradas as médias dos valores obtidos em *steady state*, prefixado como variações menores que 5% no QR e 10% no CO_2 . Quando não se atingiu o *steady state*, foi considerada a média de todos os valores obtidos, após a exclusão daqueles muito discrepantes. As medidas obtidas nos primeiros 5 minutos foram sistematicamente excluídas. Para a avaliação dos substratos utilizados na via oxidativa, foi

necessário dosar o conteúdo de nitrogênio urinário, coletados no decorrer do *clamp*. Os valores foram adicionados às equações descritas em Ferrannini *et al*, 1988.

3.7- Estudos Metabólicos

3.7.1- Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Esse teste foi utilizado para avaliar a tolerância à glicose e a secreção de insulina em resposta à ingestão de glicose. Os voluntários compareceram pela manhã, em jejum de alimentos de dez a doze horas e de água por quatro horas. O exame foi realizado em ambiente tranquilo com temperatura constante ao redor de 25 °C. O teste foi precedido de um período basal de 60 minutos. Antes do estudo, os voluntários foram orientados a esvaziar a bexiga, momento este considerado como o início do período basal. A seguir foram realizados os seguintes procedimentos: preenchimento de ficha cadastral, assinatura do termo de consentimento, verificação do peso e da altura, medida de cintura e quadril e realização da BIA. Em seguida, foi puncionada uma veia na região antecubital de um dos membros superiores para a coleta das amostras de sangue. Nesta fase, foram colhidas duas amostras de sangue para dosagens basais de glicemia e insulinemia (tempos -30' e 0'). Quinze minutos após a punção venosa foram iniciadas as aferições da pressão arterial e frequência do pulso. Os voluntários permaneceram em repouso durante o experimento. Foram, então, administradas 75 gramas de glicose em solução aquosa com volume total de 300 ml, ingeridas em até 5 minutos (tempo zero – início da ingestão). Após a ingestão de glicose, seguiu-se um período experimental de 120 minutos, durante o qual foram coletadas amostras de sangue nos tempos, 30', 60', 90' e 120' seguintes à ingestão de glicose, para as análises séricas de insulina e glicose e peptídeo C.

3.7.2- Teste Intravenoso de Tolerância à Glicose (TITG) ou IVGTT (intravenous glucose tolerance test)

Este estudo foi realizado pelo menos uma semana após o primeiro teste, com o objetivo de avaliar a secreção de insulina. Consistiu na administração endovenosa de glicose a 25% (0,5 g/kg de peso), num intervalo de três minutos, seguido de coletas de alíquotas de sangue nos tempos 1', 3', 5', 7', 10', 20', 30', 40', 50' e 60', tendo o final da infusão de glicose como referência (Hansen BC, Bodkin NL, 1993). Estas alíquotas se destinavam às análises séricas de insulina, glicose e peptídeo C.

Os voluntários compareceram pela manhã, em jejum de pelo menos doze horas e com livre ingestão de água. Inicialmente verificou-se novamente o peso, para o cálculo exato da quantidade de glicose a ser administrada. Em seguida, realizou-se a punção de uma veia na região antecubital de cada um dos membros superiores, uma para infusão da solução de glicose e outra para a coleta das amostras de sangue. Antes de se iniciar a infusão de glicose, foram colhidas duas amostras de sangue (tempos -30' e 0') para dosagens de glicose, insulina, peptídeo C, além das dosagens bioquímicas de colesterol total e HDL, triglicérides, ácido úrico, creatinina, proteína C-reativa, IL-6 e TNF α .

3.7.3- Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico

O clamp foi realizado seguindo a técnica previamente proposta por DeFronzo et al, 1979. Seu objetivo é a avaliação da sensibilidade à insulina. Os participantes foram orientados a comparecer à Unidade Metabólica em jejum de alimentos por um período de 12 horas, com livre ingestão de água. O exame incluiu 120 minutos de período basal, 180 minutos de período experimental com infusão de insulina e 60 minutos para a observação do paciente após o término da infusão insulínica. Os períodos de 60' a 120' e 120' a 180' foram considerados respectivamente “Steady State 1” (SS1) e “Steady State 2” (SS2).

O estudo iniciava-se com a mensuração do peso e o voluntário esvaziava a bexiga, sendo desprezado o volume e este horário, considerado como início do período basal, era anotado. A seguir, oferecíamos 200 ml de água e puncionávamos 2 veias periféricas utilizando-se cateter de teflon agulhado do tipo abocath número 20GA ou

22GA, de preferência homolateral no membro superior, sendo a primeira punção em sentido retrógrado em veia antecubital e a segunda no antebraço, próximo ao cotovelo. Cada abocath foi fixado a um sistema de três vias. A mão onde foi puncionada a veia antecubital permanecia em caixa aquecida entre 50 e 60° C, para diminuir a diferença artério-venosa (McGuire et al, 1976). O sistema era mantido permeável através da injeção de 2ml de uma solução de heparina (2UI diluídas em 20ml de SF). Durante todo o experimento, as amostras de sangue eram coletadas desta veia, sendo desprezados 2ml iniciais, por estarem diluídos com a solução de heparina. A dose de insulina foi calculada para obter uma administração intravenosa de 40 μ UI/m² de superfície corporal por minuto. A insulina regular humana era colocada numa seringa contendo 51 ml de soro fisiológico e 4ml de sangue do próprio paciente, a fim de evitar que o hormônio aderisse à parede interna da seringa. Foram coletadas amostras de sangue para dosagens (tempo -120 e 0) de glicose, insulina além das dosagens bioquímicas de colesterol total e HDL, triglicérides, ácido úrico, creatinina, ácidos graxos livres, peptídeo C, adiponectina, proteína C-reativa, IL-6 e TNF- α .

A calorimetria indireta basal era iniciada no mínimo 15 minutos após a punção venosa. Foram realizadas três medidas da pressão arterial e da frequência cardíaca no período basal do clamp. Ao final da primeira calorimetria coletávamos toda a diurese, por micção espontânea sendo anotado o tempo decorrido desde a primeira micção, em minutos, para cálculo da eliminação urinária de nitrogênio. Foi considerado o período experimental ou “Clamp” o intervalo entre o início e o final da infusão de insulina. Do tempo 0 a 4 minutos, esta foi mantida em 45,6 ml/h, correspondente a quatro vezes a velocidade de 40 μ U/m²SC/min. Aos 4 minutos foi reduzida para 22,8 ml/h, correspondente a 2 vezes o valor calculado e por fim, a partir do sétimo minuto, para 11,4 ml/h, constante até o fim do período experimental (tempo 180 minutos).

A infusão de glicose foi iniciada simultaneamente à de insulina. De 0 a 4 min foram administrados 0,5 mg/kg/min; de 4 a 7 min 1,0 mg/kg/min e de 7 a 10 min 1,5 mg/kg/min. A partir deste tempo, a velocidade de infusão dependeu dos valores das glicemias medidas a intervalos de cinco a dez minutos, em amostras de 1 ml de sangue. O objetivo do ajuste da infusão foi manter a glicemia o mais próximo possível da média das glicemias medidas no período basal (variação $\pm$ 10%).

A solução contendo a insulina regular e a solução de glicose a 10% foram infundidas na veia antecubital. Para a glicose usou-se uma bomba de infusão (AVI 270, 3M Health Care, USA) e a insulina foi administrada através de bomba de infusão com precisão de frações decimais (AVI syringe pump, modelo 600, 3M Health Care, USA).

Foram coletadas amostras de sangue nos tempos 30, 60, 90, 120 e 180 min para dosagens bioquímicas, de insulina, ácidos graxos livres. Apenas a amostra final foi utilizada para as dosagens de creatinina, uréia, IL-6, TNF- α , proteína C-reativa e adiponectina. A calorimetria indireta foi repetida nos intervalos de 90 a 120 e 150 a 180 minutos. A diurese foi coletada novamente após o final do período experimental e o tempo, decorrido desde a micção anterior, e o volume medido foram anotados.

Foi então oferecida uma refeição geral para o voluntário, e durante a alimentação reduziu-se progressivamente a infusão de glicose sempre para a metade do valor que estivesse sendo infundido, mantendo o controle através da glicemia. Este procedimento foi mantido até que a glicemia estivesse estável, sem a necessidade de administração de glicose, e se estendeu em média por uma hora.

3.8- Acondicionamento de amostras

As amostras de sangue e urina coletadas, exceto aquelas para glicemia, foram colocadas imediatamente na geladeira e, ao término do estudo, foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Alemanha), a 3.000 rpm, por 15 minutos. Foram a seguir divididas em alíquotas e armazenadas em *freezer* a -20° C, para dosagem posterior.

3.9- Métodos Analíticos

Ácido úrico, colesterol total e frações lipídicas, uréia e creatinina: As dosagens foram realizadas em soro utilizando-se reagentes Wiener (Argentina) em equipamento automatizado Cobas Mira Plus (Roche). O controle de qualidade para essas análises foi realizado com o *kit* Standatrol SE 2 níveis, marca Wiener.

A fração de colesterol LDL foi calculada a partir da fórmula de Friedwald: $\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + (\text{Triglicérides}/5))$; e para a fração de colesterol VLDL foi utilizada a fórmula de Friedwald: $\text{colesterol VLDL} = \text{triglicérides}/5$.

Citocinas TNF- α e IL-6: Foram dosadas pelo método ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se *kits* Quantikine HS (R&D Systems, Minneapolis, MN). De acordo com o fabricante a sensibilidade dos *kits* é de 0,06-0,32 pg/ml e 0,016-0,110 pg/ml, respectivamente para TNF α e IL-6, e os valores de referência: 0,5 a 4,71 pg/ml e 0,447-9,96 pg/ml para TNF α e IL-6 respectivamente. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas da marca Bio-Rad, modelo 680.

Proteína C-reativa: Foi dosada pelo método de imunonefelometria por concentração de partículas, em nefelômetro Array 360 da marca Beckman Instruments, Inc, modelo 4480, utilizando-se o *kit N High Sensitivity CRP* (Dade Behring, Alemanha). A sensibilidade do método é de 0,175 a 1100 mg/l e valor de referência < 3 mg/l.

Insulina e peptídeo-C: Foram dosados por radioimunoensaio, em duplicata utilizando-se *kits* comerciais. A leitura foi realizada em contador gama Marca Beckman Instruments Inc. Para insulina utilizou-se *kit* Linco Research, Inc. (USA). A reação cruzada com a pró-insulina é menor que 0,2% e os valores de referência para pacientes em jejum são 5-15 $\mu\text{U/ml}$ (30-90 pmol/l). Para o peptídeo-C utilizou-se o *kit* da Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (DSL 7000, USA). Valores de referência do *kit* para pacientes em jejum: 1,1-3,2 ng/ml (0,36-1,05 nmol/l).

Ácidos graxos livres: Foram dosados por método colorimétrico-enzimático, utilizando *kit* da marca Wako Chemicals (Alemanha), e a leitura realizada em leitor de microplacas da marca Bio-Rad, modelo 680. Valores de referência para pacientes em jejum: 0,1-0,6mEq/L.

Glicose sérica: Foi dosada em duplicata por técnica de oxidação de glicose em equipamento automatizado, *glucose analyser* da marca Beckman Instruments Inc., modelo 6517.

Nitrogênio Urinário: Foi dosado pelo método de Kjeldahl, que determina a matéria orgânica nitrogenada total de uma amostra. O princípio deste método consiste na transformação do nitrogênio das substâncias nitrogenadas encontradas na urina em sulfato de amônio, através de ebulição com ácido sulfúrico e catalisadores. Posteriormente, ao sulfato de amônio é adicionado hidróxido de sódio. Esta reação libera a amônia sob a forma de hidróxido de amônio, que é destilado e recolhido em ácido bórico. Nesta solução determina-se a quantidade de nitrogênio por titulação com ácido clorídrico padronizado ao vermelho de metila. A concentração urinária de nitrogênio é altamente variável e não são encontrados valores de referência.

3.10- Cálculos e fórmulas

Cálculo de secreção de insulina: A avaliação da secreção de insulina deve levar em conta o grau de resistência à insulina, pois é conhecida a relação inversa e hiperbólica entre a secreção de insulina e a sensibilidade à insulina. A mudança na sensibilidade à insulina é acompanhada por mudanças recíprocas na secreção de insulina sendo que o produto permanece constante e a tolerância a glicose normal enquanto este mecanismo de compensação for preservado (Kahn, 1993; Ahrén, 2004; Mari, 2005).

TOTG: As áreas sob as curvas de insulina, glicose e peptídeo C foram obtidas através do cálculo da área do trapézio considerando-se a área total sob as respectivas curvas (Potteiger, 2002). A divisão das áreas sob as curvas de insulina pela área sob a curva de glicose foram usadas para a avaliação da secreção de insulina proporcional à glicemia presente (Ahrén B, 20004). Foram avaliadas também a área incremental sob a curva de insulina e de glicose nos 30 primeiros minutos do TOTG para obtenção do índice insulinogênico – $\text{insulina}_{30-0} / \text{glicose}_{30-0}$ no teste oral (Tura, 2005). Para avaliação da secreção levando-se em conta a sensibilidade à insulina (M) calculamos índices para a fase rápida (0 a 30 min) e para o tempo total do TOTG.

Disposition index TOTG: $\text{ASC insulina}_{\text{total}} \times M$; Índice insulinogênico $\times M$: $(\text{insulina}_{30-0} / \text{glicose}_{30-0}) \times M$

TITG: As áreas sob as curvas de insulina, glicose e peptídeo C foram obtidas através do cálculo da área do trapézio (Potteiger, 2002) considerando-se a área total sob as respectivas curvas e avaliam a secreção total de insulina e peptídeo C. Utilizamos a área incremental sob a curva de insulina e peptídeo C nos 10 primeiros minutos para avaliação da fase rápida de secreção de insulina (resposta aguda da insulina - RAI) e área sob a curva no intervalo de 10 – 60 minutos para a avaliação da fase lenta da secreção. A taxa de secreção de insulina (ISR), que representa a verdadeira secreção de insulina, foi avaliada através da deconvolução do peptídeo C (Polonsky et al, 1984), nos períodos basal, fase rápida, fase lenta e secreção total.

No TITG os índices de secreção de insulina corrigidos pelo grau de resistência à insulina foram:

Disposition index TITG: $ASC_{insulina_{10-0}} \times M$ ou $ASC_{insulina_{total}} \times M$

Adaptation index: $ASC_{pep\ C_{10-0}} \times M$ ou $ASC_{pep\ C_{total}} \times M$ (Kahn 1993, Ahrén 2004)

Sensibilidade da Célula β à Glicose

A sensibilidade da célula β à glicose foi calculada como a inclinação da curva dose resposta de secreção de insulina pela concentração de glicose (Toffolo 1995, Kahn 1993, Mari 2002).

Sensibilidade à insulina (valor de M): Foi calculada pela taxa de infusão exógena de glicose (GIR) durante 2 períodos *steady state* do *clamp* ou seja, SS1 - de 60 a 120min e SS2 - de 120 a 180min. O valor obtido foi corrigido pelas variações da glicemia, considerando-se o volume de distribuição corporal da glicose de 250 ml/kg de peso corporal. (De Fronzo, 1979). Os valores foram corrigidos pelo peso corporal ou pela massa magra (MM).

Clearance de insulina

Avaliado durante o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico de acordo com a fórmula:

$$\text{Clearance de Insulina} = \frac{\text{Taxa de infusão de glicose}}{\text{Insulina SS} - (\text{Insulina basal} * 0,5)}$$

(ELAHI, 1982).

Onde SS: “steady state”, foram considerados os períodos experimentais de 60 a 120min – SS1 e de 120 a 180min – SS2.

Cálculo do Gasto Calórico e Utilização de Substratos Energéticos

As fórmulas utilizadas foram baseadas na descrição de Ferrannini *et al*, 1988.

Equações da Calorimetria Indireta

Padrão	
Oxidação Protéica (g/min)	= 6,25N *
Oxidação de Glicose (g/min)	= 4,55VCO ₂ – 3,21VO ₂ – 2,87 N *
Oxidação Lipídica (g/min)	= 1,67 (VO ₂ – VCO ₂) – 1,92 N *
Gasto Calórico (Kcal/min)	= 3,91 VO ₂ + 1,10 VCO ₂ – 3,34 N *

N* = taxa de excreção de nitrogênio urinário não protéico (g/min); VO₂ e VCO₂ expressos em l/min.

3.11- Análise dos Dados

Todas as informações obtidas e os resultados laboratoriais foram digitados em banco de dados, utilizando-se o programa Excel. A análise estatística foi realizada através do programa Statview®. Inicialmente foi realizada uma análise descritiva de todas as variáveis obtidas e depois comparações intragrupo entre diversos tempos experimentais e entre os grupos. Todos os parâmetros coletados e os calculados foram comparados entre magros e obesos no período pré-operatório e pós-operatório e entre as categorias de tolerância a glicose através do teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. As comparações

intragrupo das fases pré e pós-operatória foram realizadas através do teste *Wilcoxon Signed Rank*. A relação das entre variáveis foi avaliada através de teste de Regressão Simples, Correlação de *Spearman* e regressão *Stepwise*. Para a comparação das curvas entre os grupos foi efetuada a Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.



4- RESULTADOS

Ao todo foram avaliados, na fase pré-operatória, 32 pacientes obesos graves, sendo 6 diabéticos (OB-DM), 11 intolerantes (OB-IT) e 15 normotolerantes à glicose (OB-NT). A reavaliação dos pacientes que se submeteram à cirurgia bariátrica e que mantinham peso estável no último mês, com um intervalo médio de 18 meses pós-cirurgia, foi realizada em 14 pacientes. Dos 32 voluntários obesos da fase *pré-operatória*, oito não puderam ser avaliados no pós-operatório por morte, gravidez, ou desistência da cirurgia. Os demais ainda se encontravam em fase de emagrecimento importante quando do término da pesquisa de campo.

4.1- Fase pré-operatória

4.1.1- Antropometria e Composição corporal

Os subgrupos de pacientes foram bem pareados quanto ao grau de obesidade, composição corporal (% de gordura) e distribuição de gordura, representada pela circunferência da cintura. As médias da pressão arterial para cada grupo são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1- Características gerais dos grupos CT e subgrupos de OB na fase pré-operatória
(Média $\pm$ Erro Padrão)

	CT	OB-NT	OB-IT	OB-DM	p ¹ <i>IT vs NT</i>	p ² <i>DM vs NT</i>	p ³ <i>DM vs IT</i>
Número (M/F)	10 (5/5)	17 (6/11)	11 (3/8)	6 (2/4)	ns	ns	ns
Idade (anos)	35 $\pm$ 4	35 $\pm$ 2	38 $\pm$ 2	41 $\pm$ 2	ns	0,05	ns
IMC (kg.m ⁻²)	22,3 $\pm$ 0,6	50,1 $\pm$ 1,9*	48,3 $\pm$ 2,4*	51,0 $\pm$ 3,0*	ns	ns	ns
Cintura (cm)	80 $\pm$ 3	130 $\pm$ 6*	129 $\pm$ 6*	140 $\pm$ 6*	ns	ns	ns
Gord. Corporal (%)	18,1 $\pm$ 1,6	44,4 $\pm$ 0,9*	43,8 $\pm$ 1,2*	43,4 $\pm$ 1,8*	ns	ns	ns
Massa Magra (kg)	51,2 $\pm$ 2,8	79,0 $\pm$ 5,4*	71,8 $\pm$ 5,4*	75,0 $\pm$ 6,8*	ns	ns	ns
PAS (mmHg)	117,3 $\pm$ 3,0	128,5 $\pm$ 4,9	129,0 $\pm$ 7,0	127,0 $\pm$ 4,6	ns	ns	ns
PAD (mmHg)	84,2 $\pm$ 1,6	76,7 $\pm$ 2,5*	78,0 $\pm$ 3,6	87,3 $\pm$ 4,7	ns	ns	ns
FC (bpm)	68,4 $\pm$ 3,4	77,6 $\pm$ 1,6	73,3 $\pm$ 2,0	81,3 $\pm$ 6,0	ns	ns	ns

IMC – índice de massa corporal; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – Pressão arterial diastólica; FC – frequência cardíaca; bpm – batimentos por minuto. * – $p \leq 0.01$ vs. CT – teste não paramétrico Mann-Whitney;

p¹, p² e p³ - comparação entre subgrupos de obesos – teste não paramétrico Mann-Whitney.

4.1.2- Teste oral de tolerância à glicose

A área sob a curva de glicose e a glicemia do tempo 120 minutos foram maiores nos obesos em relação aos controles e entre os subgrupos de obesos à medida que havia deterioração da tolerância à glicose. Os valores de insulinemia de jejum e a área sob a curva de insulina nos subgrupos dos obesos foram maiores comparados aos dos controles, mas sem diferença entre obesos exceto pela maior insulinemia de jejum nos OB-DM (Tabela 2). O índice insulinogênico que corresponde à razão entre a variação de insulina pela variação de glicose nos primeiros 30 min e representa a fase rápida de secreção no TOTG foi maior no subgrupo OB-NT que no grupo CT e OB-DM. A razão entre as áreas incrementais (em relação ao jejum) sob as curvas de insulina e de glicose foi maior no OB-NT comparado ao

CT e reduzida no OB-IT e OB-DM comparados ao OB-NT. Ou seja, os índices que relacionam a secreção de insulina à glicemia alcançada no TOTG tendem a demonstrar uma aumentada secreção de insulina nos pacientes obesos normotolerantes com progressiva redução à medida que a intolerância à glicose se instala.

4.1.3- Teste Intravenoso de tolerância à glicose

A avaliação da secreção de insulina durante o TITG (Tabela 2) incluiu a fase rápida que compreende o intervalo de 0 a 10 minutos após a infusão de glicose e a fase lenta de 10 a 60 minutos e foi realizada pela deconvolução do peptídeo C (IS) nos períodos basal, fase rápida (RAI), fase lenta e secreção total (T-IS). Os valores de secreção basal e total foram maiores em todos os subgrupos de obesos em relação aos controles. Houve também um aumento progressivo de secreção na fase lenta dos controles aos obesos com tolerância normal e aos diabéticos. A fase rápida diferiu entre os subgrupos de obesos, sendo reduzida no grupo com intolerância à glicose e praticamente ausente no subgrupo com DM (Fig 1).

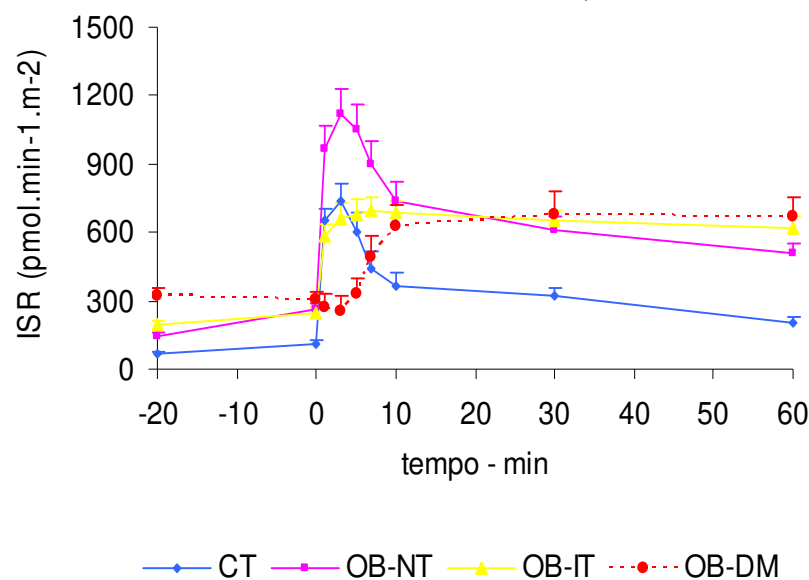
Tabela 2 – Características Metabólicas dos grupos CT e subgrupos de OB na fase pré-operatória

(Média ± Erro padrão).

	CT	OB-NT	OB-IT	OB-DM	p ¹ <i>IT vs NT</i>	p ² <i>DM vs NT</i>	p ³ <i>DM vs IT</i>
TOTG							
Glic. jejum (mmol l ⁻¹)	4,8±0,1	5,0±0,2	5,6±0,3	6,7±0,5 *	ns	0,001	0,007
Insul. jejum (pmol l ⁻¹)	61±4	221±56 *	154±19 *	357±94 *	ns	ns	0,03
Glic. 120min (mmol l ⁻¹)	5,2±0,3	6,4±0,2 *	9,2±0,4 *	13,8±0,4 *	<0,0001	0,0004	0,0009
ASCG (mmol l ⁻¹ ·2h ⁻¹)	684±42	817±29 *	1084±45 *	1500±87 *	0,0003	0,0004	0,002
ASCI (mmol l ⁻¹ ·2h ⁻¹)	45,7±5,8	130,1±27,7 *	120,5±20,1 *	128,9±35,1 *	ns	ns	ns
Ind Insulinogênico (pmol mmol ⁻¹)	295±110	459±77 #	257±42	170±68	ns	0,01	ns
Incr. ASCI/ASCG (pmol.mmol ⁻¹)	-152±774	555±121 *	237±36	152±58	(0,06)	0,02	ns
TITG							
f-ISR (pmol min ⁻¹ m ⁻²)	75,7±8,5	159,2±16,4 *	199,7±20,0 *	305,9±36,2 *	ns	0,004	0,03
RAI (pmol m ⁻²)	5378±590	9363±895 *	6544±558	3893±622	0,02	0,002	0,01
T-ISR (nmol m ⁻²)	20,2±1,95	39,2±3,6 *	39,2±2,5 *	37,1±4,5 *	ns	ns	ns

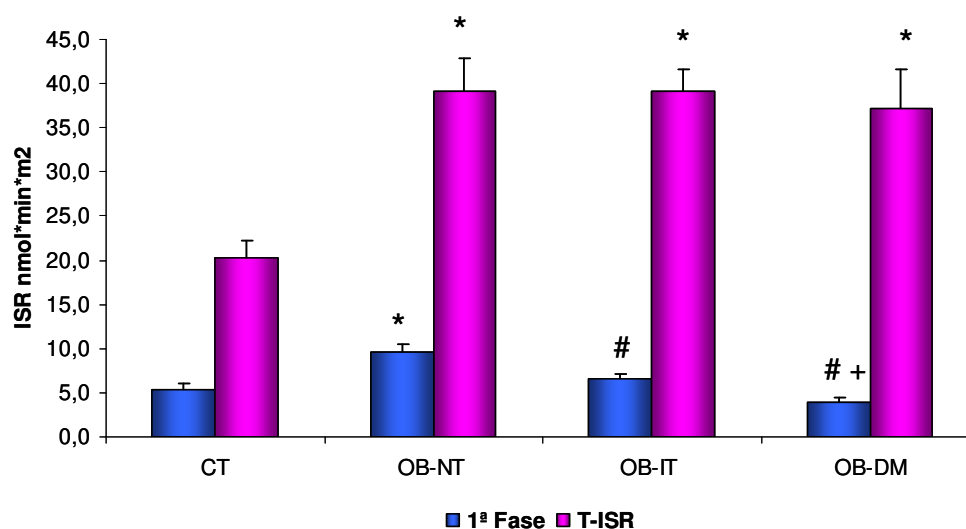
TOTG – teste oral de tolerância à glicose; **TITG** – teste intravenoso de tolerância à glicose; Incr. – incremental; ASCG and ASCI - área sob a curva de glucose e insulina; Ind Ins. – índice insulinogênico; f-ISR – fasting insulin secretion rate – IS basal; RAI – resposta aguda da insulina (fase rápida - 0 to 10 min); T-ISR – Total insulin secretion rate = área total sob a curva de secreção de insulina no TITG. * - p≤0,05 vs. CT – teste não paramétrico Mann-Whitney; # p=0.06 vs. CT p¹, p² e p³- entre subgrupos de obesos – teste não paramétrico Mann-Whitney.

1A – Curvas de secreção de insulina durante o TITG (Média±Erro-Padrão).



OB-NT, OB-IT e OB-T2D vs. CT - $p=0.04$; $p<0.0001$ e $p<0.0001$ respectivamente (interação grupo/tratamento - ANOVA para medidas repetidas).

1B – Áreas sob as curvas de IS na fase rápida (RAI) e no TITG total (T-IS) (M±EP).

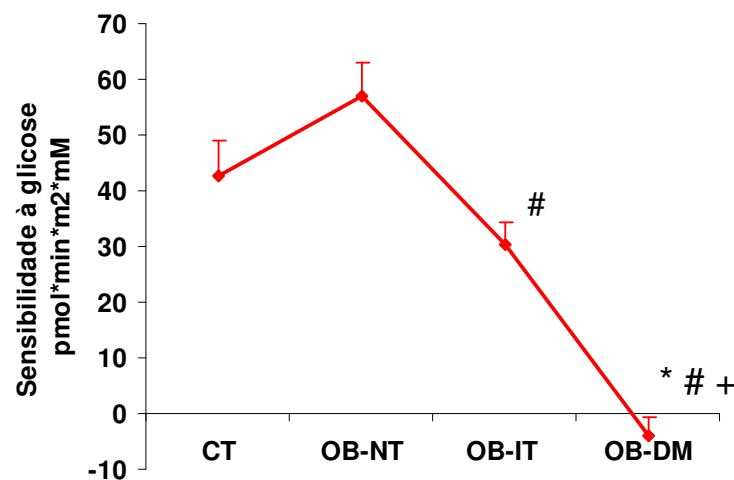


* $p<0.05$ vs. CT; + $p<0.05$ vs IT; # $p<0.05$ vs NT

Figura 1 – TITG no período pré-operatório.

4.1.4- Sensibilidade da célula β à glicose

A sensibilidade da célula β à glicose foi calculada a partir da curva dose-resposta de glicose e secreção de insulina obtida na deconvolução do peptídeo C. A angulação destas curvas (*slope*) representa a sensibilidade da célula β pancreática à glicose. Nota-se que a sensibilidade da célula β à glicose nos obesos normotolerantes foi semelhante ao grupo controle ($p=ns$), significativamente reduzida no subgrupo intolerante e próxima ao valor zero nos pacientes diabéticos (Fig 2). Portanto, estes resultados sugerem uma ineficiência da célula β , que a tornam menos responsiva às mudanças de glicemia, caracterizados por menor secreção e que são progressivamente mais marcados nos OB-IT e OB-DM.



* $p < 0.05$ vs. CT; + $p < 0.05$ vs IT; # $p < 0.05$ vs NT

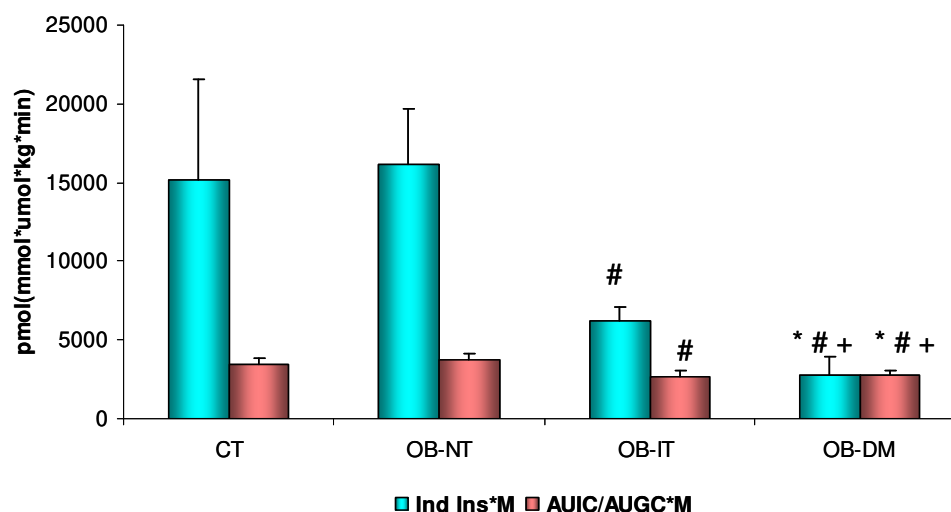
Fig 2 – TITG - Sensibilidade da célula β à glicose, no período pré-operatório ($M \pm EP$)

4.1.5- Índices de adaptação da Secreção de Insulina ao grau de resistência à insulina

Os índices derivados do TOTG para avaliar a secreção de insulina em relação ao grau de resistência à insulina (avaliada através do clamp, resultados apresentados a seguir - *M value*,) incluíram a razão entre as áreas sob a curva de insulina e glicemia e o índice insulinogênico, ambos multiplicados pelo M. Estes índices foram reduzidos nos obesos IT e DM e são representados na figura 3A. O disposition index calculado no TOTG (ASC insulina total * M) foi reduzido no grupo DM comparado ao grupo NT: CT - 2337 ± 291 ; NT - 3393 ± 630 ; IT - 2853 ± 406 e DM - 1903 ± 499 $\text{pmol l}^{-1} \cdot \text{umol kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p = 0,04$ vs. NT.

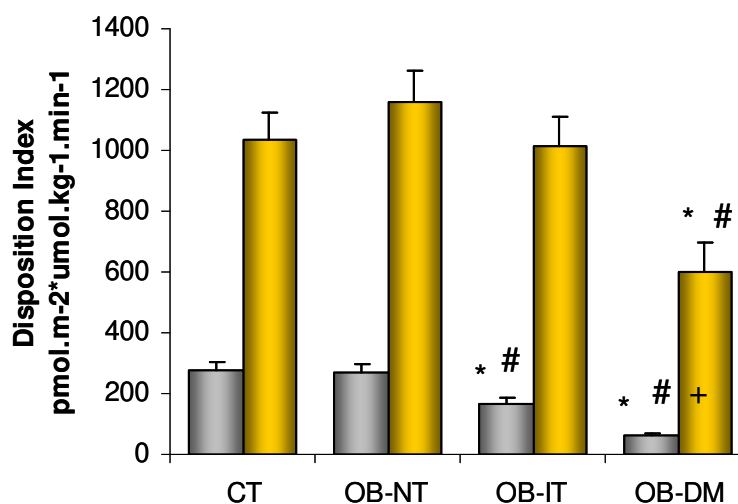
A secreção de insulina no TITG, considerando a resistência à insulina, também foi avaliada através da multiplicação da fase rápida e da total de secreção de insulina, derivadas da deconvolução do peptídeo C, pelo valor de M. Esses índices também nos sugerem uma diminuição da adaptação da célula β à resistência à insulina nos OB-IT e nos diabéticos, principalmente ao se analisar a fase rápida (Fig 3B).

3A – Índices de adaptação da IS à resistência à insulina (*M value* do clamp) durante o TOTG ($M \pm EP$)



* $p < 0.05$ vs. CT; + $p < 0.05$ vs IT; # $p < 0.05$ vs NT

3B – Índices de adaptação da IS à resistência à insulina durante o TITG (disposition index) ($M \pm EP$)



* $p < 0.05$ vs. CT; + $p < 0.05$ vs IT; # $p < 0.05$ vs NT

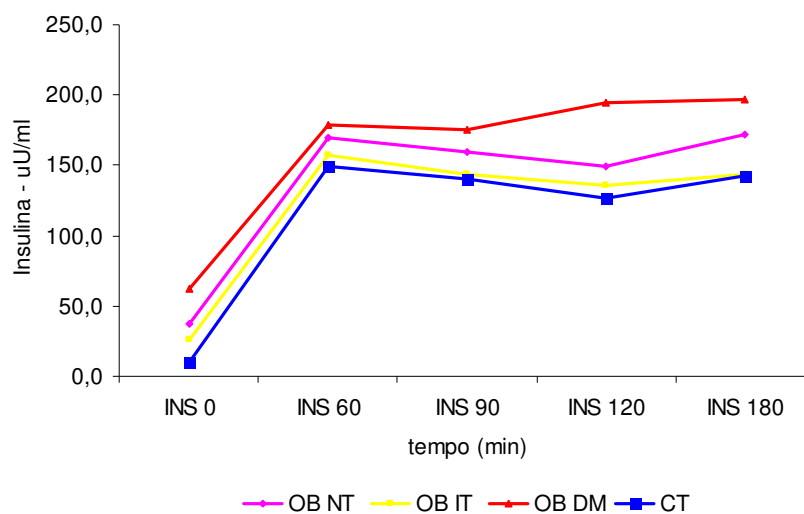
Figura 3 – Índices de adaptação da IS à resistência à insulina no pré-operatório

4.1.6- *Clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico

O *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico teve duração de 3 h e infusão constante de insulina em velocidade de $40\mu\text{U}/\text{m}^2$ de superfície corporal. A insulinemia alcançada nos diversos subgrupos foi semelhante entre os obesos e grupo controle (Fig 4), apesar de menor clearance de insulina observado nos diabéticos (Tab 3). A taxa basal de liberação de insulina, considerando o clearance de insulina medido no *clamp* ($\text{IDR} = \text{Clearance de insulina} * \text{insulinemia basal}$), também demonstra uma aumentada IS nos obesos comparados aos CT. Embora os valores de IDR no grupo OB-DM correspondam quase ao dobro daqueles dos OB-NT e OB-IT, a diferença não foi estatisticamente significativa.

A sensibilidade à insulina foi calculada a partir da taxa de infusão da glicose, considerando que nas concentrações de insulinemia alcançados durante o *clamp*, a produção endógena de glicose tenha sido suprimida, conforme previamente demonstrado (Bonadonna, 1990). O total de glicose infundido (*M value*) foi normalizado por kg de massa magra (M_{mm}) e calculado para diferentes intervalos de tempo do estudo *clamp*: 60 a 120, 80 a 120, 120 a 180 e 150 a 180 min. Cada uma destas variáveis leva às mesmas conclusões quando se realiza a comparação entre os diferentes grupos. Portanto, apresentamos apenas os resultados obtidos de 60 a 120 min (*Steady state 1 – SS1*) e de 120 a 180 min (*SS2*). A sensibilidade à insulina nos obesos foi menor que no grupo controle e dentre os obesos, os diabéticos são os que apresentaram os menores valores. (Fig 5).

A - Insulinemia durante o *Clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico no período pré-operatório (M±EP)



B - Glicemia durante o *Clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico no período pré-operatório (M±EP)

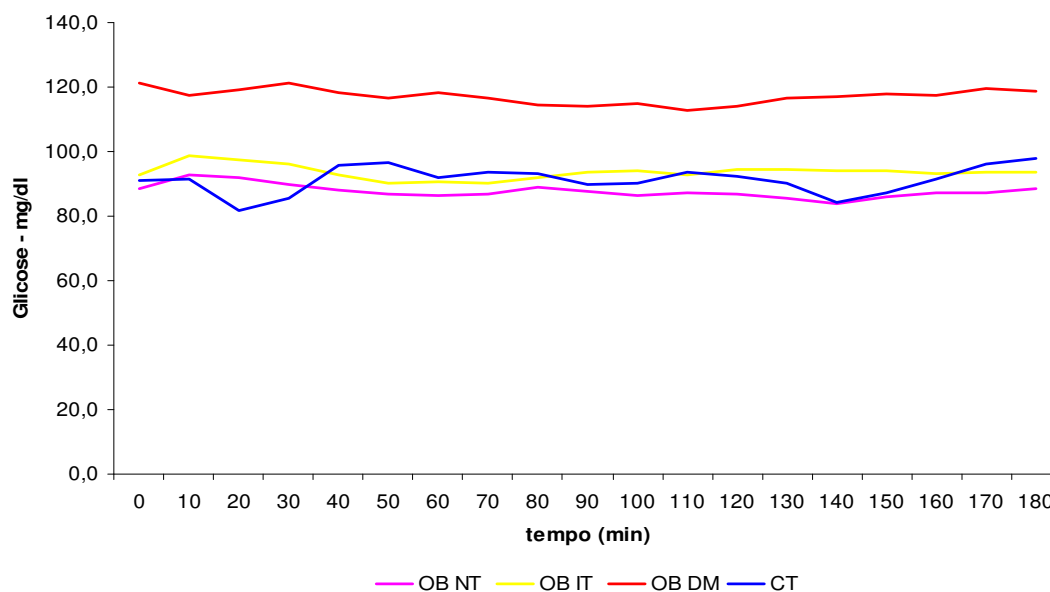


Fig 4 – *Clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico

Tabela 3- Resultados do *Clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (M±EP).

	CT	OB-NT	OB-IT	OB-DM	p^1 <i>IT vs NT</i>	p^2 <i>DM vs NT</i>	p^3 <i>DT vs NT</i>
Glicemia _{jejum} (mmol l ⁻¹)	5,1±0,1	4,9±0,1	5,1±0,2	6,7±0,5*	<i>ns</i>	0,001	0,007
Glicemia _{SS2} (mmol l ⁻¹)	4,9±0,2	4,8±0,1	5,2±0,2	6,5±0,6*	<i>ns</i>	0,002	0,02
Insulinemia _{jejum} (pmol l ⁻¹)	59±3	221±56*	154±19*	357±94*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,03
Insulinemia _{SS2} (pmol l ⁻¹)	853±53	1033±77	858±79	1176±148	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
IDR _{basal} (pmol min ⁻¹)	33±3	142±28*	120±21*	210±51*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Clear. Ins _{0-180min} (pmol min ⁻¹)	509±38	649±23*	751±82*	570±58	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Clear. Ins _{0-180min} (pmol min ⁻¹ m ⁻²)	302±22	274±16	330±28	252±24	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,05
M _{value SS1} (μmol kg min ⁻¹)	49±3	25±3*	21±2*	16±3*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
M _{value SS2} (μmol kg min ⁻¹)	56±2	32±4*	26±2*	18±4*	<i>ns</i>	0,04	<i>ns</i>
p^4	0,01	0,001	0,005	<i>ns</i>			

SS1 e SS2: *Steady State*- 1: 60 a 120 min e 2: 120 a 180 min de infusão de insulina; IDR basal: *insulin delivery rate* (taxa liberação de insulina=Clearance de insulina*insulina basal), Clear. Ins – clearance de insulina; M: captação de glicose por kg de massa magra.

* - $p \leq 0,05$ vs. CT - Mann Whitney.; p^1 p^2 p^3 comparação intergrupo - Mann Whitney.;

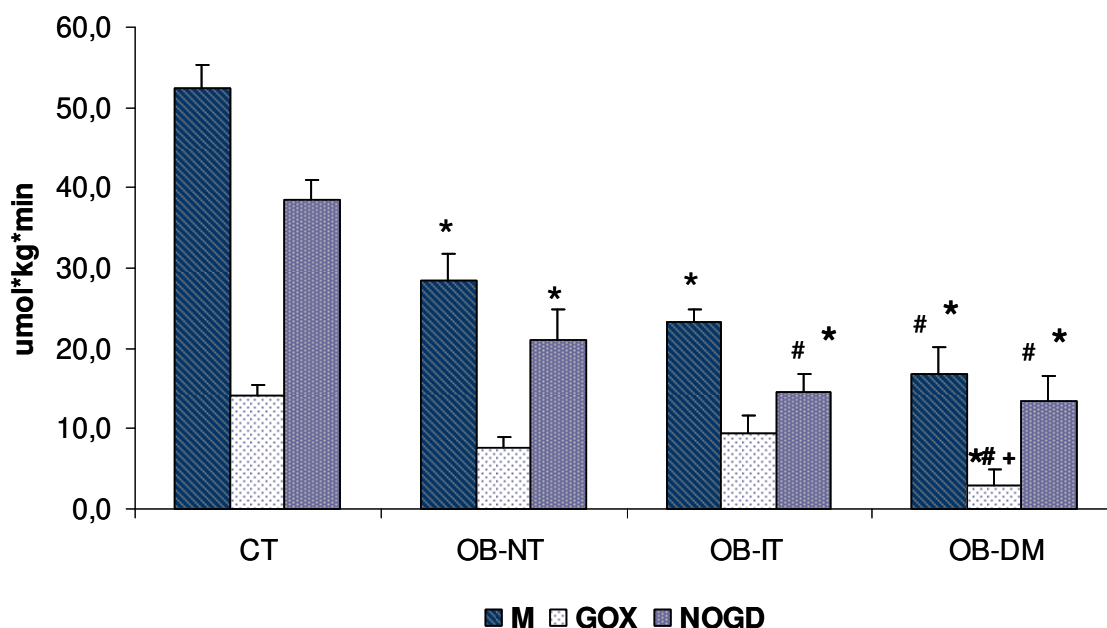
p^4 - comparação intragrupo clamp vs basal (Wilcoxon signed rank test).

4.1.7- Calorimetria

Os resultados da calorimetria realizada no período basal e durante o clamp são mostrados nas tabelas 4 e 5. Pode-se observar no período basal que a oxidação de glicose foi semelhante entre os subgrupos de obesos e o grupo controle, assim como a oxidação

protéica enquanto que a oxidação lipídica foi maior nos diabéticos, tanto no período basal como pós insulinização. A infusão de insulina reduziu as taxas de oxidação protéica em todos os grupos porém não teve influência sobre as taxas de oxidação de lipídios. Quanto ao metabolismo dos carboidratos, observou-se nos obesos comparados ao grupo controle, redução da oxidação e da utilização de glicose via não oxidativa (NOGD) induzidas pela insulina. A NOGD não pode ser medida no período basal com os métodos usados neste estudo (Fig 5).

A infusão de insulina aumentou significativamente o quociente respiratório e o gasto energético somente no grupo controle ($p < 0,05$ – ANOVA para medidas repetidas). O gasto energético basal diferiu entre obesos e voluntários eutróficos pois era maior se medido como total, reduzido se normalizado por kg de peso corpóreo e similar se normalizado por massa magra, demonstrando a diversa composição corporal. (Tabela 6)



$p < 0,05$ vs. CT; + $p < 0,05$ vs IT; # $p < 0,05$ vs NT

Fig 5 – *Clamp* - M_{value} , oxidação e utilização não oxidativa de glicose no período pré-operatório ($M \pm EP$)

Tabela 4- Utilização de substratos energéticos no período basal e durante a infusão de insulina (M±EP).

	CT	OB-NT	OB-IT	OB-DM	<i>P</i> ¹ <i>NT vs CT</i>	<i>P</i> ² <i>IT vs CT</i>	<i>P</i> ³ <i>DM vs CT</i>
Ox. glicose _{basal} (μmol.kg min ⁻¹)	5,8±0,7	5,0±1,0	5,4±2,2	3,3±1,4	<i>grupo</i> 0,0005	<i>grupo</i> 0,002	<i>grupo</i> 0,001
Ox. glicose _{SS1} (μmol.kg min ⁻¹)	13,4±1,9	5,0±2,0	5,2±2,8	3,4±1,9	<i>Ef tempo</i> 0,003	<i>Ef tempo</i> 0,002	<i>Ef tempo</i> 0,03
Ox. glicose _{SS2} (μmol.kg min ⁻¹)	14,6±1,7	10,2±1,9	10,8±2,8	1,3±2,4	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> 0,08	<i>Interação</i> 0,01
NOGD _{SS1} (μmol.kg min ⁻¹)	35,7±3,8	20,1±4,5	14,2±2,2	12,4±3,1	<i>grupo</i> 0,01	<i>grupo</i> <0,0001	<i>grupo</i> <0,0001
NOGD _{SS2} (μmol.kg min ⁻¹)	41,2±2,2	21,8±3,8	15,6±2,5	13,3±4,0			
Ox. protéica _{basal} (μmol.kg min ⁻¹)	6,8±1,1	8,7±0,9	6,5±0,7	4,3±1,2	<i>grupo ns</i>	<i>grupo ns</i>	<i>grupo</i> 0,07
Ox. protéica _{clamp} (μmol.kg min ⁻¹)	4,1±1,8	3,7±1,5	3,8±1,2	-0,3±0,9	<i>Ef tempo</i> <0,0001	<i>Ef tempo</i> 0,01	<i>Ef tempo</i> 0,0008
					<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>
Ox. lipídica _{basal} (μmol.kg min ⁻¹)	5,6±0,6	5,9±0,4	6,0±1,4	7,8±0,3	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> 0,0007
Ox. lipídica _{SS1} (μmol.kg min ⁻¹)	4,9±0,6	7,4±0,9	6,0±0,9	8,9±0,5	<i>Ef tempo</i> <i>ns</i>	<i>Ef tempo</i> <i>ns</i>	<i>Ef tempo</i> <i>ns</i>
Ox. lipídica _{SS2} (μmol.kg min ⁻¹)	5,2±0,6	5,0±0,7	6,4±1,1	9,7±0,7	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> 0,03

Ox. – oxidação; NOGD – utilização não oxidativa de glicose (*nonoxidative glucose disposal*); SS1 e SS2 – *steady state* 1 e 2.

*p*¹ *p*² *p*³ comparação intergrupo – ANOVA para medidas repetidas – 2 vias: são apresentados os valores de *p* para a comparação entre os grupos, para o efeito tempo (ou tratamento = infusão de insulina) e para a interação destes.

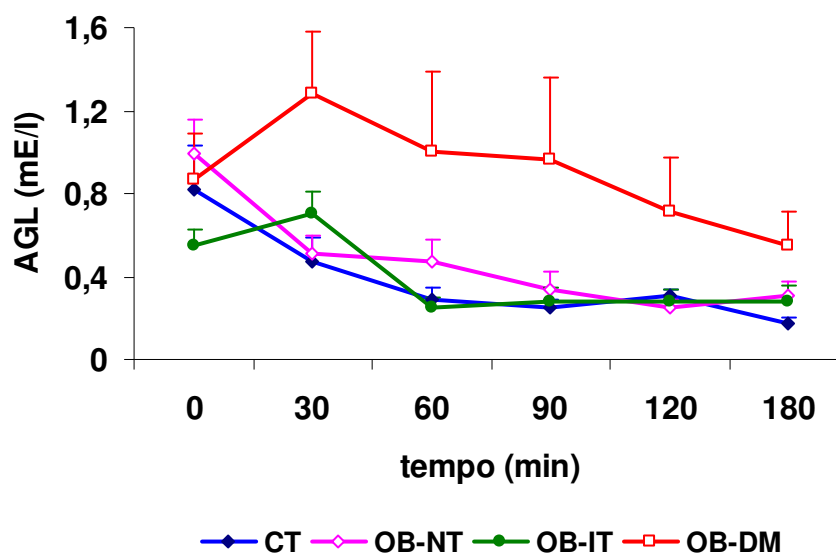
Tabela 5- Resultados da calorimetria no período basal e durante infusão de insulina (M±EP).

	CT	OB-NT	OB-IT	OB-DM	p^1 NT vs CT	p^2 IT vs CT	p^3 DM vs CT
QR _{basal}	0,78±0,02	0,77±0,01	0,76±0,01	0,74±0,01	grupo ns	grupo ns	grupo 0,002
QR _{SS1}	0,83±0,02	0,78±0,01	0,78±0,02	0,73±0,02	Ef tempo 0,002	Ef tempo 0,0007	Ef tempo ns
QR _{SS2}	0,83±0,02	0,81±0,02	0,80±0,03	0,71±0,02	Interação ns	Interação ns	Interação 0,03
G E _{basal} (kcal/d)	1514±63	2541±176	2427±190	2498±141	grupo 0,0005	grupo 0,001	grupo <0,0001
G E _{SS1} (kcal/d)	1633±53	2609±169	2340±163	2553±152	Ef tempo 0,002	Ef tempo 0,003	Ef tempo 0,0007
G E _{SS2} (kcal/d)	1748±60	2639±197	2492±190	2644±196	Interação ns	Interação 0,03	Interação ns
G E _{basal/MM} (kcal/kg mm.d)	29,9±1,2	31,9±0,8	34,9±1,6	34,0±1,9	grupo ns	grupo ns	grupo ns
G E _{SS1/MM} (kcal/kg mm.d)	32,5±1,7	32,8±0,8	34,4±1,5	34,7±1,8	Ef tempo 0,0004	Ef tempo 0,0007	Ef tempo 0,001
G E _{SS2/MM} (kcal/kg mm.d)	34,7±1,7	32,7±0,8	35,5±1,9	34,7±1,8	Interação 0,01	Interação 0,01	Interação ns
G E _{basal/kgPC} (kcal/kg mm.d)	24,6±1,0	17,8±0,6	19,1±1,1	18,8±1,1	grupo <0,0001	grupo 0,0003	grupo 0,0009
G E _{SS1/kgPC} (kcal/kg mm.d)	26,8±1,4	18,2±0,6	19,3±1,0	19,4±1,2	Ef tempo <0,0001	Ef tempo 0,0005	Ef tempo 0,02
G E _{SS2/kgPC} (kcal/kg mm.d)	28,6±1,3	18,2±0,5	19,5±1,2	19,6±0,8	Interação 0,0008	Interação 0,005	Interação 0,06

QR: quociente respiratório; G E: gasto energético; SS: *steady state*; PC: peso corporal; MM: massa magra; p^1 p^2 p^3 comparação intergrupo – ANOVA para medidas repetidas – 2 vias: são apresentados os valores de p para a diferença entre os grupos, para o efeito tempo (tratamento – infusão de insulina) e para a interação destes.

4.1.8- Ácidos graxos livres (AGL)

Os AGL foram dosados no dia do estudo clamp, em jejum e durante a infusão de insulina. Os valores basais foram semelhantes entre os grupos: CT = $0,74 \pm 0,17$; NT = $0,99 \pm 0,17$; IT = $0,76 \pm 0,09$ e DM = $0,87 \pm 0,22 \text{ mE} \cdot \text{l}^{-1}$ ($p = \text{ns}$). A infusão de insulina diminuiu a concentração plasmática em todos os grupos ($p < 0,0001$ – efeito tratamento - ANOVA para medidas repetidas) exceto no pacientes diabéticos. (Fig 6).



valores de $p = \text{ns}$; ns e $0,08$ para a comparação de NT, IT e DM vs. CT – (interação grupo / tratamento – ANOVA para medidas repetidas)

$p < 0,01$ para CT; NT e IT; $p = \text{ns}$ no subgrupo DM (ANOVA para medidas repetidas em cada grupo isolado)

Fig 6 – Ácidos graxos livres durante o clamp no período pré-operatório ($M \pm EP$)

4.1.9- Adiponectina

Na Fig 7 podemos observar que a concentração sérica de adiponectina foi menor (* $p < 0,05$) nos obesos NT, IT e DM ($7,5 \pm 1,3$; $5,5 \pm 0,9$ e $3,3 \pm 0,7 \text{ ug/ml}$, respectivamente) comparados ao grupo controle ($11,6 \pm 1,4 \text{ ug/ml}$) e com as menores concentrações presentes nos diabéticos (# $p = 0,04$ vs. NT).

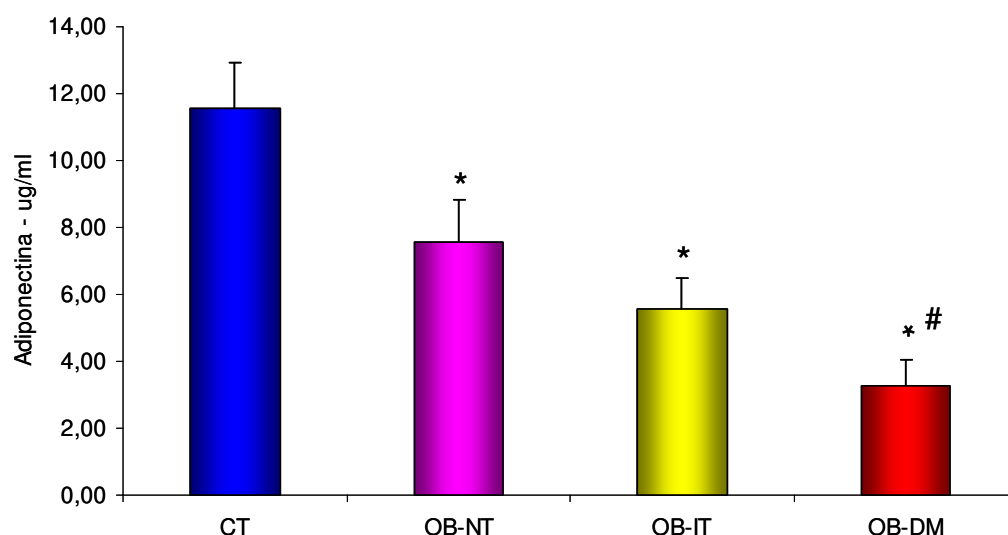


Figura 7 - Adiponectinemia no período pré operatório (M±EP)

4.1.10- Correlação entre as variáveis no período pré-operatório

Muitas das variáveis metabólicas e antropométricas são correlacionadas entre si em cada grupo de estudo ou no conjunto de sujeitos do grupo controle e todos os obesos, como se pode observar na tabela 8. De maneira geral, a sensibilidade à insulina foi prevalentemente e inversamente relacionada aos parâmetros que medem a obesidade e aos fatores inflamatórios e diretamente à adiponectina. A IS foi mais relacionada à sensibilidade da célula β à glicose. É interessante observar que as variáveis que medem a secreção na fase rápida do TOTG se correlacionaram com as da primeira fase do TITG. O mesmo se verificou para a segunda fase do TITG e a fase lenta de secreção do TOTG e ainda para os índices de adaptação da IS à resistência à insulina. A glicemia após 2h da ingestão de glicose no TOTG foi utilizada como medida da tolerância à glicose (Fig 8).

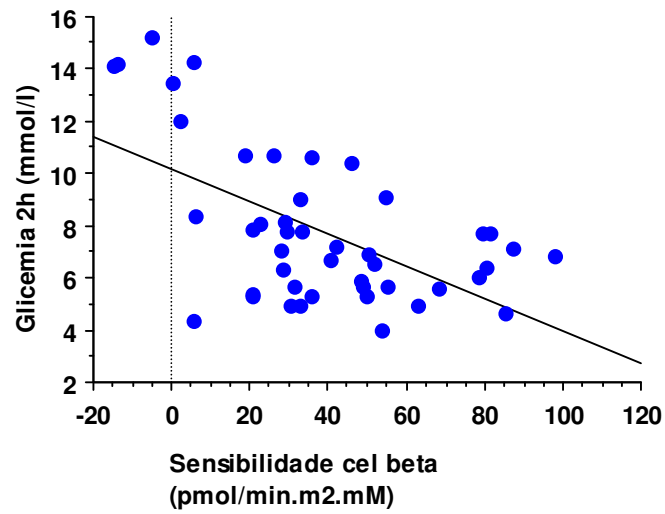
Para se determinar as variáveis independentemente relacionadas entre si foram realizadas correlações múltiplas. **M value** foi testado vs. o seguinte modelo: IMC (ou alternativamente a cintura), adiponectina, IL-6 e TNF- α , sendo independentes o IMC e a adiponectina ($r = 0,77$; $r^2 = 0,55$; $p = 0,0009$). O modelo para a **glicemia 2h** foi o IMC (ou alternativamente a cintura), a adiponectina, M value e a sensibilidade da célula β à glicose, permanecendo como independentes as 3 últimas ($r = 0,87$; $r^2 = 0,73$; $p = 0,0001$).

Tab 6- Correlações entre as variáveis

IMC	Cintura	M value	Sensib. Cel β	f-ISR	AIR increm.	T-ISR	Glicose 2h	DI _{IVGTT 0-10}	DI _{IVGTT}	I insulinog	ASCI/ASCG	I. Insulinog.*M	ASCI/ASCG.*M	Adiponectina	
1.0	0,89	-0,61	ns	0,55	ns	0,62	0,39	ns	ns	0,30	0,44	ns	ns	-0,43	IMC
	1.0	-0,66	ns	0,63	ns	0,62	0,57	-0,40	ns	ns	0,38	ns	ns	-0,56	Cintura
		1.0	ns	-0,77	ns	-0,63	-0,66	X	X	ns	-0,57	X	X	0,63	M value
			1.0	ns	0,95	0,31	-0,47	0,75	0,51	0,57	0,38	0,59	0,59	ns	Sensib Cel β
				1.0	ns	0,68	0,76	-0,56	ns	ns	0,34	-0,37	ns	-0,71	f-ISR
					1.0	0,46	-0,38	X	0,49	0,61	0,43	0,54	0,51	ns	AIR increm
						1.0	0,68	ns	X	0,39	0,52	ns	ns	-0,55	T-ISR
							1.0	-0,70	-0,41	ns	ns	-0,63	-0,49	-0,66	Glicose 2h
								1.0	0,80	0,38	ns	0,64	0,54	0,34	DI_{IVGTT 0-10}
									1,0	ns	ns	0,46	0,40	ns	DI_{IVGTT}
										1,0	0,83	X	0,79	ns	I. Insulinog.
											1,0	0,54	X	-0,32	ASCI/ASCG
												1,0	0,89	ns	I. Insulinog.*M
													1,0	ns	ASCI/ASCG* M
														1,0	Adiponectina

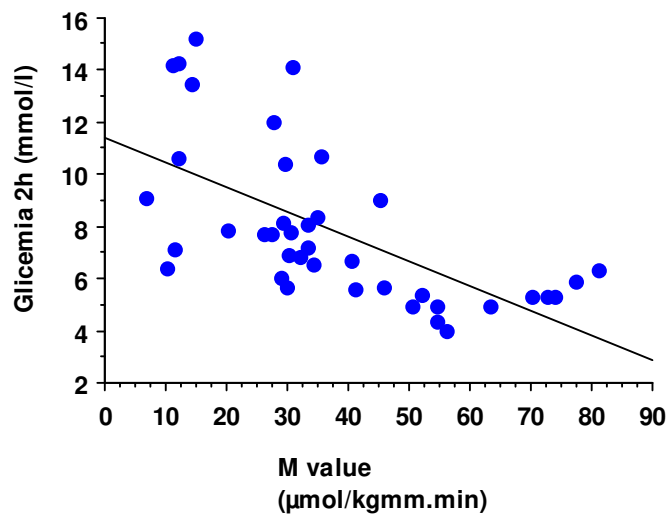
Valores = coeficiente de correlação (Spearman) significativos (p<0,05); f-ISR –IS basal, AIR – IS no IVGTT de 0-10min; T-ISR - IS no IVGTT; DI – Disposition index; ASCI/ASCG – area sob a curva de insulina e glucose no OGTT; X – correlações não testadas.

A



$p < 0,0001$

B



$p < 0,0001$

Fig 8 – Correlação entre a glicemia 2h e a sensibilidade da célula β (A) e a sensibilidade à insulina (B) no período pré-operatório ($M \pm EP$)

4.2- Fase pós-emagrecimento

Os dados apresentados referem-se somente aos pacientes que foram avaliados nos dois momentos (OB-pré e OB-pós), permitindo realizar análises estatísticas para grupos pareados. A subdivisão em NT, IT e DM não foi mantida devido ao número pequeno de voluntários em cada subgrupo no pós-operatório, ou melhor, após o emagrecimento induzido pelo bypass gástrico. O grupo é composto basicamente por voluntários normotolerantes à glicose: NT = 11, IT = 3 e DM = 0.

4.2.1- Antropometria e Composição corporal

O emagrecimento alcançado foi de aproximadamente 37,7% do peso inicial sendo esta redução composta por 69,6% de massa gorda e 28,4% de massa magra, acarretando redução da porcentagem de gordura e diminuição da circunferência da cintura apesar do grupo ainda ser classificado como obeso (Tabela 7).

O teste oral de tolerância à glicose não foi repetido nesta fase devido ao volume gástrico reduzido e reações adversas referidas pelos poucos voluntários em que foi realizado.

Tabela 7 – Características Antropométricas e Metabólicas após emagrecimento (M±EP)

	CT	OB pré	OB pós	p^1 <i>pre vs. CT</i>	p^2 <i>pos vs. CT</i>	p^3 <i>pos vs. pre</i>
Numero (M/F)	10(5/5)	14(4/10)	14(4/10)			
NT/IT/DM	10/0/0	11/3/0				
Peso (kg)	62,1±3,1	133,5±6,4	83,1±4,6	<0,0001	0,001	0,004
IMC (kg m ⁻²)	22,3±0,6	49,6±2,2	30,1±1,2	0,0001	0,0005	0,0007
Cintura (cm)	80±3	130±6	91±4	0,0002	0,07	0,02
Gord Corporal (%)	18,1±1,6	44,7±1,1	27,7±1,9	0,0001	0,004	0,0007
Massa Magra (kg)	51,2±2,8	73,7±3,4,1	59,4±3,2	0,0006	ns	0,0007

p^1 e p^2 – teste não-paramétrico de Mann-Whitney; p^3 – teste não-paramétrico de Wilcoxon;

4.2.2- Teste Endovenoso de tolerância à glicose e Sensibilidade da célula β à glicose

O emagrecimento foi acompanhado de significativa redução da insulinemia de jejum. A secreção de insulina diminuiu na fase lenta porém houve manutenção da elevada secreção na fase rápida. As secreções de insulina basal, fase rápida e total no grupo pós emagrecimento são semelhantes aos valores observados no grupo controle, sugerindo normalização da secreção com a perda de peso (Tabela 8; Fig 9 A e B).

Por outro lado, a segunda fase nos três voluntários IT reavaliados foi similar ao grupo normotolerante na fase pré-operatória: a fase rápida aumentou mas não realizamos análise estatística devido ao número reduzido de voluntários.

A sensibilidade da célula β à glicose, que neste grupo era semelhante à dos CT, aumentou alcançando valores significativamente maiores que os valores observados no grupo controle (Fig 10).

Tabela 8 – TITG – teste endovenoso de tolerância à glicose após emagrecimento (M $\pm$ EP).

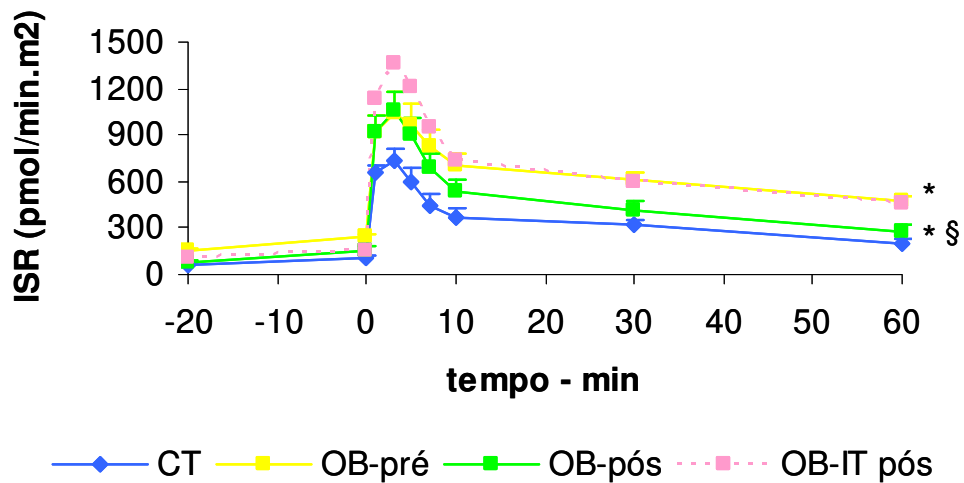
	CT	OB pré	OB pós	p^1 <i>pré vs. CT</i>	p^2 <i>pós vs. CT</i>	p^3 <i>pós vs. pré</i>
Glicose jejum (mmol l ⁻¹)	5,1 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1	0,04	0,03	0,001
Insulina jejum (pmol l ⁻¹)	59 $\pm$ 3	181 $\pm$ 24	54 $\pm$ 7	0,0002	ns	0,001
f-ISR (pmol min ⁻¹ m ⁻²)	75,7 $\pm$ 8,5	148,1 $\pm$ 11,8	83,0 $\pm$ 11,8	0,0003	ns	0,001
RAI (pmol m ⁻²)	5378 $\pm$ 590	8674 $\pm$ 940	7889 $\pm$ 1007	0,01	0,06	ns
T-ISR (nmol m ⁻²)	20,23 $\pm$ 1,95	37,98 $\pm$ 3,72	29,63 $\pm$ 3,17	0,001	ns	0,03
Sensibilidade da cél. β (pmol min ⁻¹ m ⁻²)	38,5 $\pm$ 5,5	43,2 $\pm$ 7,4	74,9 $\pm$ 10,0	ns	0,01	0,005

TITG – teste intravenoso de tolerância à glicose; f-ISR – fasting insulin secretion rate – IS basal; RAI – resposta aguda da insulina (fase rápida - 0 to 10 min); T-ISR – Total insulin secretion rate = área total sob a curva de secreção de insulina no TITG.

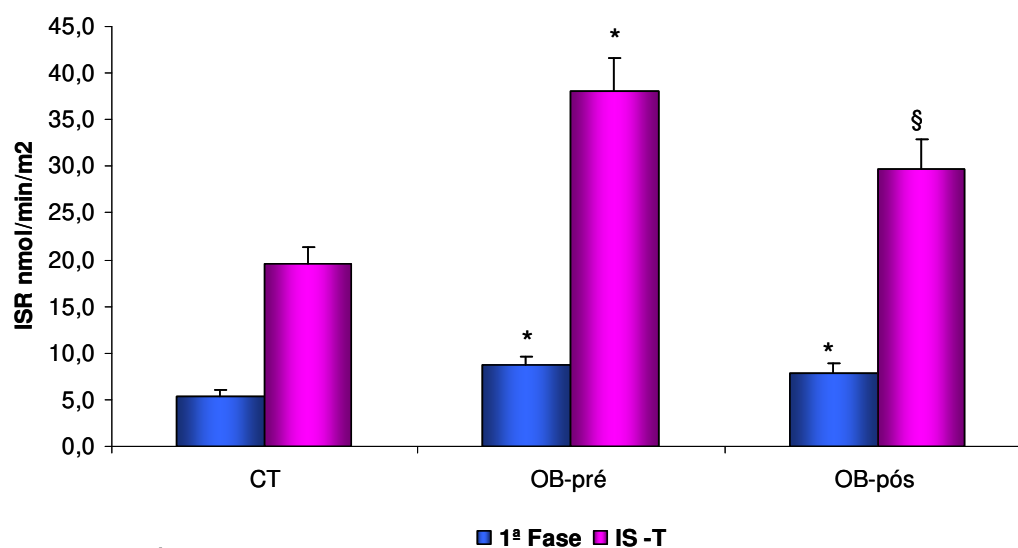
p^1 e p^2 – teste não-paramétrico de Mann-Whitney;

p^3 – teste não-paramétrico de Wilcoxon.

9A – Curvas de secreção de insulina durante o TITG (Média±Erro-Padrão).

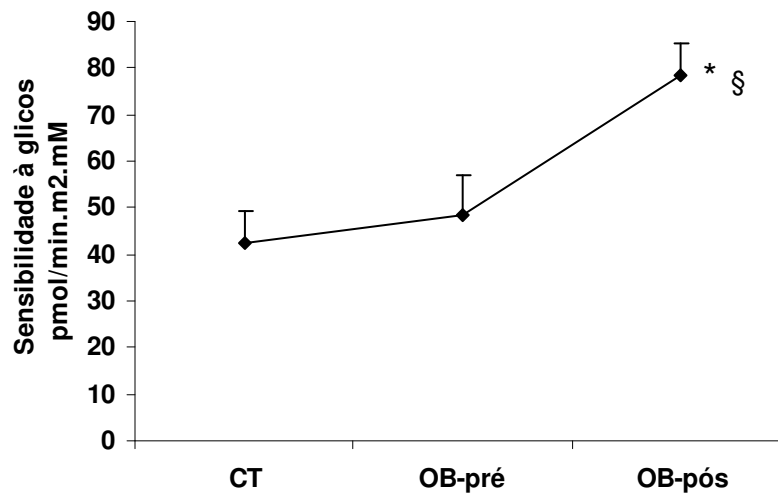


9 B – Áreas sob as curvas de IS na fase rápida (RAI) e no TITG total (T-IS) (M±EP).



* - $p < 0.05$ vs. CT; § - $p < 0.05$ – OB-post vs. OB-pre.

Figura 9 – TITG no período pós-emagrecimento.

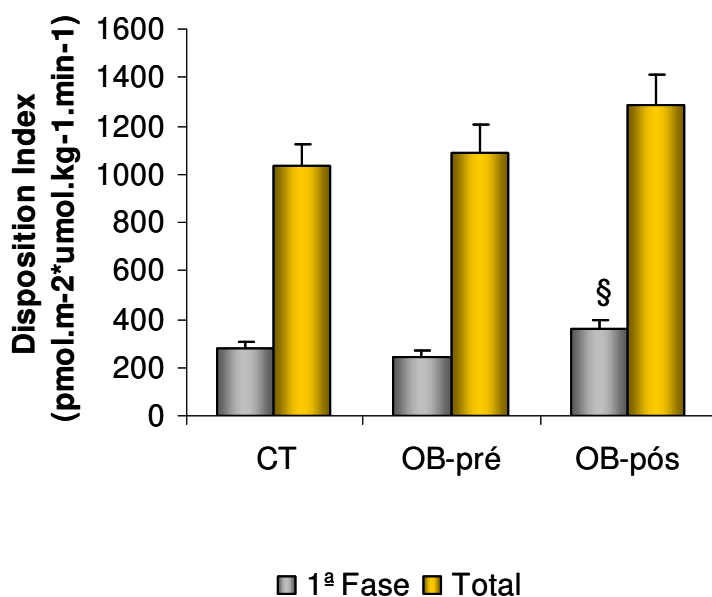


* - $p < 0.05$ vs. CT; § - $p < 0.05$ – OB-pós vs. OB-pré.

Fig 10 – TITG - Sensibilidade da célula β à glicose, nos períodos pré e pós operatório ($M \pm EP$)

4.2.3- Índices de adaptação da Secreção de Insulina ao grau de resistência à insulina

A manutenção da elevada fase rápida de secreção de insulina associada a aumento da sensibilidade à insulina (*M value*) levou ao aumento dos índices de adaptação calculados para a fase rápida de secreção. Os índices calculados para a fase lenta do TITG não se modificaram. (Fig 11).



* $p < 0.05$ vs CT ; § $p < 0.05$ vs OB Pre

Fig 11 – Índices de adaptação da IS à resistência à insulina durante o TITG (disposition index) ($M \pm EP$)

4.2.4- *Clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico

Após o emagrecimento pode-se observar a redução da glicemia e insulinemia em jejum e da secreção basal de insulina acompanhada do aumento do clearance de insulina e de importante aumento da sensibilidade à insulina (*M value*). O valor de M do grupo pós operatório equivale àquele observado no grupo controle, sugerindo deste modo normalização da sensibilidade à insulina após o emagrecimento (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados do *Clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico pós-emagrecimento

	CT	OB pré	OB pós	p^1 <i>pré vs. CT</i>	p^2 <i>pós vs. CT</i>	p^3 <i>pós vs. pré</i>
Glicemia _{basal} (mmol.l ⁻¹)	5,1±0,1	5,0±0,2	4,5±0,1	<i>ns</i>	0,01	0,05
Glicemia _{SS1} (mmol.l ⁻¹)	5,2±0,2	4,9±0,2	4,5±0,1	<i>ns</i>	0,03	0,05
Glicemia _{SS2} (mmol.l ⁻¹)	4,9±0,2	4,9±0,2	4,7±0,1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Insulinemia _{basal} (pmol.l ⁻¹)	59±3	177±23	54±6	0,0001	<i>ns</i>	0,001
Insulinemia _{SS1} (pmol.l ⁻¹)	775±67	834±61	656±36	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Insulinemia _{SS2} (pmol.l ⁻¹)	853±53	955±60	635±47	<i>ns</i>	0,01	0,005
IDR basal (pmol.min ⁻¹)	33±3	138±19	42±8	<0,0001	<i>ns</i>	0,001
Clear. Ins _{0-180min} (ml.min ⁻¹)	509±38	674±78	838±92	0,01	0,003	<i>ns</i>
Clear. Ins ₀₋₁₈₀ (ml.min.m ²)	302±22	291±17	431±44	<i>ns</i>	0,01	0,005
M ₁₂₀₋₁₈₀ (μmol.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	56±2	30±4	50±5	0,001	<i>ns</i>	0,001
M _{60-120min} (μmol.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	49±3	25±3	41±3	0,002	<i>ns</i>	0,001
p^4	0,01	0,003	0,008			

IDR – *insulin delivery rate* (taxa liberação de insulina=Clearance de insulina*insulina basal), M: captação de glicose por kg de massa magra.

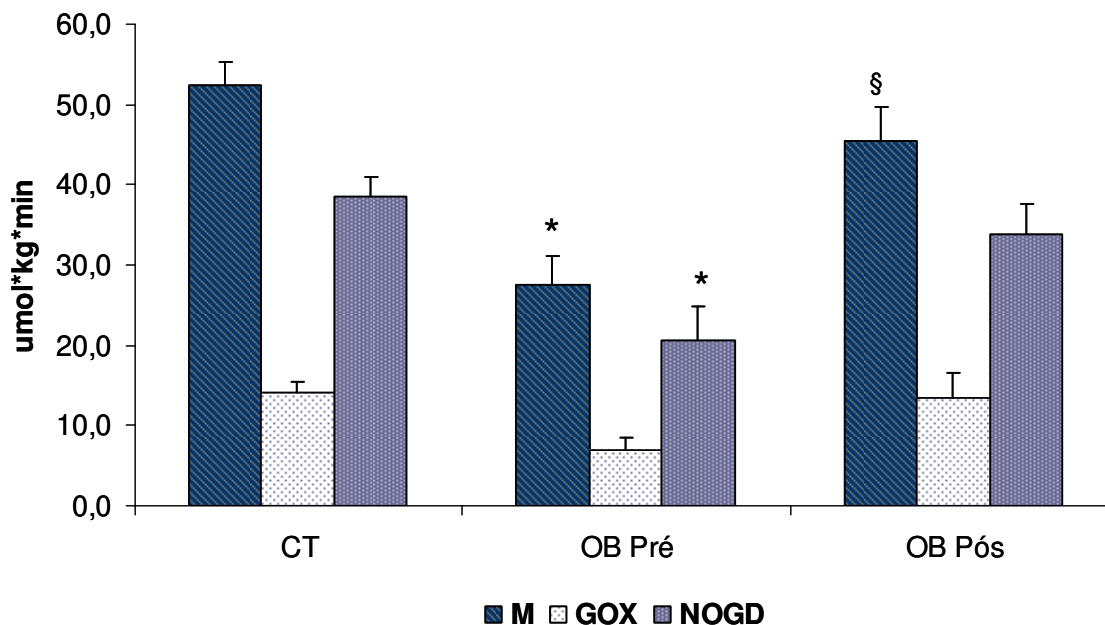
p^1 p^2 comparação intergrupo - Mann Whitney; p^3 comparação intragrupo pré e pós emagrecimento (Wilcoxon signed rank test). p^4 - comparação intragrupo clamp vs basal (Wilcoxon signed rank test).

4.2.5- Calorimetria

O emagrecimento induziu a melhora na utilização oxidativa de glicose, que era reduzida no período pré-operatório, como se pode observar na tabela 11. Ao mesmo tempo ocorreu aumento da NOGD. Portanto, o aumento de utilização de glicose durante o clamp

ocorreu tanto por maior oxidação como por maior utilização não oxidativa de glicose atingindo valores similares aos do grupo controle (Tabela 10 e Fig 12). A infusão de insulina durante o clamp reduziu as taxas de oxidação protéica em todos os grupos. Não houve influência sobre a oxidação de lipídeos.

Após o emagrecimento houve diminuição do gasto energético basal, com manutenção do GE normalizado por massa magra e redução do coeficiente respiratório. Porém, a infusão de insulina promoveu, no grupo emagrecido, aumento significativo do quociente respiratório e do gasto energético da mesma forma como ocorreu no grupo CT. Estes resultados diferem da fase pré-operatória, quando a infusão de insulina não modificou nem o gasto energético e nem o coeficiente respiratório (Tabela 11).



* - $p < 0.05$ vs. CT; § - $p < 0.05$ – OB-pós vs. OB-pré.

Fig 12 – *Clamp* - M_{value} , oxidação e utilização não oxidativa de glicose no período pré-operatório ($M \pm EP$)

Tabela 10 - Utilização de substratos energéticos no período basal e durante a infusão de insulina após emagrecimento.

	CT	OB pré	OB pós	p^1 <i>pré vs. CT</i>	p^2 <i>pós vs. CT</i>	p^3 <i>pós vs. pré</i>
Ox. glicose _{basal} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	5,8 $\pm$ 0,7	6,3 $\pm$ 1,5	1,4 $\pm$ 1,4	<i>grupo</i> 0,02	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i>ns</i>
Ox. glicose _{SS1} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	13,4 $\pm$ 1,9	4,6 $\pm$ 2,1	9,3 $\pm$ 3,7	<i>Ef tempo</i> 0,005	<i>Ef tempo</i> <0,0001	<i>Ef tempo</i> <0,0001
Ox. glicose _{SS2} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	14,6 $\pm$ 1,7	10,6 $\pm$ 2,0	16,9 $\pm$ 3,7	<i>Interação</i> 0,05	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> 0,01
NOGD _{SS1} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	35,7 $\pm$ 3,8	21,1 $\pm$ 4,7	33,5 $\pm$ 3,1	<i>grupo</i> 0,004	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> 0,02
NOGD _{SS2} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	41,2 $\pm$ 2,2	20,2 $\pm$ 4,1	37,5 $\pm$ 5,2			
Ox. protéica _{basal} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	6,8 $\pm$ 1,1	8,5 $\pm$ 1,0	5,7 $\pm$ 0,8	<i>grupo ns</i>	<i>grupo ns</i>	<i>grupo ns</i>
Ox. protéica _{clamp} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	4,1 $\pm$ 1,8	3,6 $\pm$ 1,7	0,0 $\pm$ 1,0	<i>Ef tempo</i> 0,0002	<i>Ef tempo</i> 0,0004	<i>Ef tempo</i> <0,0001
				<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>
Ox. lipídica _{basal} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	5,6 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 0,6	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i>ns</i>
Ox. lipídica _{SS1} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	4,9 $\pm$ 0,6	6,8 $\pm$ 1,1	7,0 $\pm$ 1,1	<i>Ef tempo</i> <i>ns</i>	<i>Ef tempo</i> <i>ns</i>	<i>Ef tempo</i> <i>ns</i>
Ox. lipídica _{SS2} ($\mu\text{mol kg min}^{-1}$)	5,2 $\pm$ 0,6	5,0 $\pm$ 0,9	6,2 $\pm$ 1,1	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>

Ox. – oxidação; NOGD – utilização não oxidativa de glicose (*nonoxidative glucose disposal*); SS1 e SS2 – *steady state* 1 e 2. p^1 p^2 p^3 comparação intergrupo – ANOVA para medidas repetidas – 2 vias: são apresentados os valores de p para a diferença entre os grupos, para o efeito tempo (ou tratamento – infusão de insulina) e para a interação destes.

Tabela 11- Resultados da calorimetria no período basal e durante infusão de insulina após emagrecimento (M±EP).

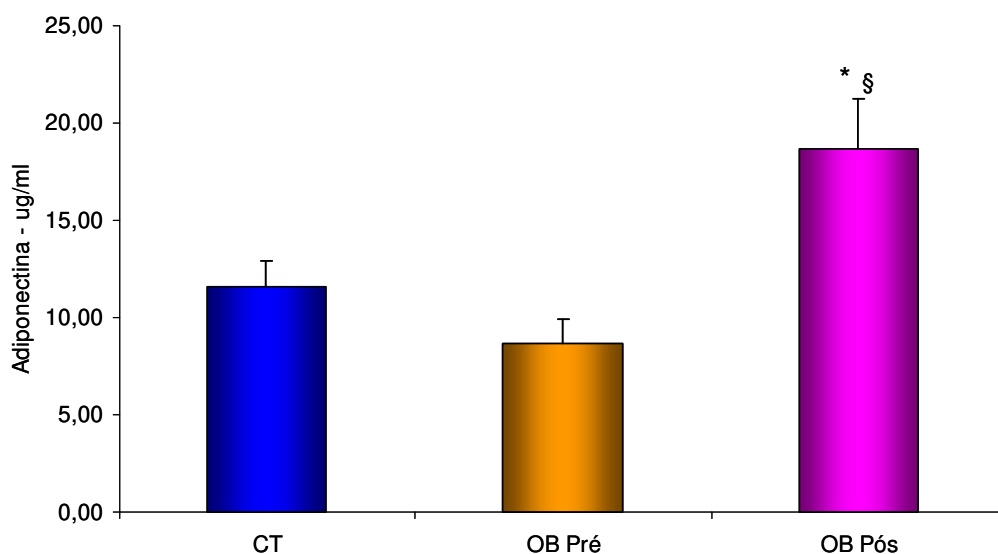
	CT	OB pré	OB pós	p^1 <i>pré vs. CT</i>	p^2 <i>pós vs. CT</i>	p^3 <i>pós vs. pré</i>
QR _{basal}	0,78±0,02	0,78±0,01	0,72±0,01	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i>0,002</i>
QR _{SS1}	0,83±0,02	0,78±0,01	0,78±0,02	<i>Ef tempo</i> <i>0,0008</i>	<i>Ef tempo</i> <i><0,0001</i>	<i>Ef tempo</i> <i><0,0001</i>
QR _{SS2}	0,83±0,02	0,82±0,02	0,82±0,03	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>0,04</i>
G E _{basal} (kcal/d)	1514±63	2426±145	1862±92	<i>grupo</i> <i>0,0002</i>	<i>grupo</i> <i>0,001</i>	<i>grupo</i> <i>0,02</i>
G E _{SS1} (kcal/d)	1633±53	2457±130	2059±75	<i>Ef tempo</i> <i>0,0008</i>	<i>Ef tempo</i> <i><0,0001</i>	<i>Ef tempo</i> <i><0,001</i>
G E _{SS2} (kcal/d)	1748±60	2531±151	2189±80	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>0,003</i>
G E _{basal/MM} (kcal/kg mm.d)	29,9±1,2	32,2±1,1	32,0±1,0	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i>0,03</i>
G E _{SS1/MM} (kcal/kg mm.d)	32,5±1,7	32,8±0,9	36,2±1,1	<i>Ef tempo</i> <i>0,0002</i>	<i>Ef tempo</i> <i><0,0001</i>	<i>Ef tempo</i> <i><0,0001</i>
G E _{SS2/MM} (kcal/kg mm.d)	34,7±1,7	33,3±1,2	37,9±1,2	<i>Interação</i> <i>0,03</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i>0,004</i>
G E _{basal/kgPC} (kcal/kg mm.d)	24,6±1,0	17,7±0,6	20,2±0,7	<i>grupo</i> <i><0,0001</i>	<i>grupo</i> <i>ns</i>	<i>grupo</i> <i><0,0001</i>
G E _{SS1/kgPC} (kcal/kg mm.d)	26,8±1,4	18,3±0,6	21,9±0,9	<i>Ef tempo</i> <i><0,0001</i>	<i>Ef tempo</i> <i><0,0001</i>	<i>Ef tempo</i> <i><0,0001</i>
G E _{SS2/kgPC} (kcal/kg mm.d)	28,6±1,3	18,3±0,6	22,7±1,0	<i>Interação</i> <i>0,003</i>	<i>Interação</i> <i>ns</i>	<i>Interação</i> <i><0,0001</i>

QR: quociente respiratório; GE: gasto energético; SS: *steady state*; MM: massa magra; TIG: termogênese induzida pela glicose. p^1 p^2 p^3 comparação intergrupo – ANOVA para medidas repetidas – 2 vias: são apresentados os valores de p para a diferença entre os grupos, para o efeito tempo (ou tratamento – infusão de insulina) e para a interação destes.

4.2.6- Ácidos graxos livres e Adiponectina

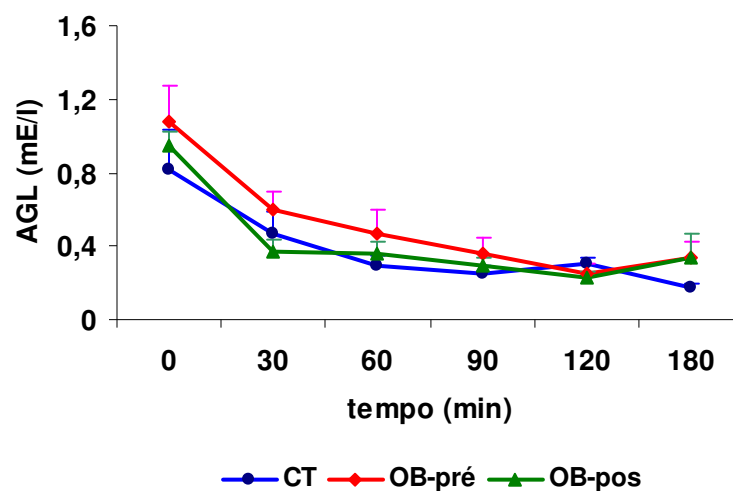
No período pós-emagrecimento houve aumento significativo da adiponectina sérica atingindo valores maiores que aqueles encontrados no grupo controle: CT = $11,6 \pm 1,4$; OB pré = $7,1 \pm 1,1$ e OB pos = $18,7 \pm 2,8$ ug/ml ($p \leq 0,05$ vs. CT e vs. OB pós). (Fig 13)

As concentrações de AGL no grupo OB-pré foram semelhantes aos do grupo CT e a pequena diminuição após o emagrecimento não foi significativa, $p=ns$ (Fig 14).



* $p < 0,05$ vs CT; § $p < 0,05$ vs OB Pre

Fig 13 – Adiponectina plasmática no clamp – período pós-emagrecimento



$p = <0,0001$ para efeito tratamento e $p = ns$ para a comparação entre os grupos (ANOVA para medidas repetidas – 2 vias).

Fig 14 – Ácidos graxos livres durante o clamp após emagrecimento ($M \pm EP$)

4.2.7- Correlações entre as variáveis após emagrecimento

Após o emagrecimento, as correlações observadas no período pré-operatório, descritas na tabela 6, se mantiveram, quando se analisaram os resultados em conjunto dos 3 grupos (CT, OB pré e OB pós). Estes resultados, devido às pequenas mudanças nos valores dos coeficientes de correlação (Spearman), sem modificação das significância não serão descritos.

Foram pesquisadas as correlações entre as mudanças pós vs. pré emagrecimento (variação percentual) de determinadas variáveis, em uma tentativa de verificar se a melhora da sensibilidade à insulina ou da secreção foi dependente das mudanças de outras variáveis. A variação percentual do *M value* não foi correlacionada às variações percentuais de IMC, cintura, gordura corporal e adiponectina ($p = ns$). O aumento da adiponectina por sua vez dependeu da redução do IMC e da gordura corporal ($r = -0,71$ e $-0,64$; ambos $p < 0,05$).

O aumento da sensibilidade da célula β também não foi relacionado às reduções das medidas antropométricas ($p = ns$). A diminuição da ISR basal, mas não da RAI ou a T-ISR, foi inversamente proporcional ao aumento da sensibilidade da célula β ($r = -0,56$, $p = 0,04$).



5- DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a contribuição da resistência à insulina e da disfunção da célula β sobre a redução da tolerância à glicose em indivíduos com obesidade grau III e a adaptação da secreção de insulina, ou seja, a habilidade da célula β em compensar a resistência à insulina. Além disto, prospectivamente, avaliamos o efeito da perda de peso induzida por bypass gástrico sobre estes parâmetros.

É importante observar que este estudo nos permitiu avaliar a resistência à insulina e a secreção de insulina ao mesmo tempo usando métodos *gold standard* antes e após a perda de peso induzida por bypass gástrico.

Nossos resultados mostram que os indivíduos com obesidade grau III apresentaram resistência à insulina durante o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico caracterizada pela menor captação total de glicose (*M value*). A resistência à ação da insulina pode ser observada também pelo menor consumo oxidativo e não oxidativo de glicose e pelas menores supressões da oxidação de lipídeos e dos níveis de ácidos graxos livres após infusão de insulina, principalmente naqueles com diabetes.

A avaliação da função da célula β mostrou que os obesos apresentaram maiores insulinemia de jejum e resposta insulinêmica à carga de glicose oral e intravenosa, comparados ao grupo controle. Esse estudo também evidenciou que à medida que a tolerância à glicose diminuiu do grupo NT ao IT e ao grupo portador de DM tipo2 houve um menor incremento da primeira fase de secreção de insulina, apesar dos maiores valores comparados aos controles. Observamos ainda um aumento de secreção na segunda fase e diminuição da sensibilidade da célula β à glicose.

A disfunção da célula β em nosso estudo foi caracterizada também pelo menor índice insulínogênico do TOTG e pela menor resposta da fase rápida do TITG, mesmo quando corrigidos pela resistência à insulina, em IT e DM. Esses índices avaliam a adaptação da secreção de insulina ao grau de resistência à insulina e mostram que os indivíduos com IT ou DM têm resposta secretória adaptativa deficiente ou em outras palavras caracterizam uma interrupção do *cross talk* entre pâncreas e tecidos periféricos. Os obesos com tolerância normal à glicose apresentaram os índices insulínogênicos e *adaptation* semelhantes aos observados no grupo controle devido à aumentada fase rápida de secreção de insulina. Nossos resultados estão em acordo em parte com outros previamente descritos em sujeitos menos obesos (Ferrannini, 2005; Gastaldelli, 2004).

Essa falha na compensação da resistência à insulina foi observada mesmo após carga oral de glicose. Neste caso, a liberação de incretinas como os hormônios GLP-1 e GIP podem ser estimular a secreção de insulina e, portanto auxiliar a compensação. Entretanto, é importante lembrar que a liberação, em condições fisiológicas, e as ações do GLP-1 e GIP são reduzidas nos obesos com diabetes e também naqueles com intolerância à glicose (Nauck 1986; Kjemis 2003; Vilsboll 2004; Muscelli 2006).

No estudo de seguimento, os pacientes emagrecidos apresentaram IMC médio ainda nos valores de obesidade, ou seja, ao redor de 30kg.m^{-2} . Mesmo assim, o emagrecimento esteve associado a aumento da sensibilidade à insulina e diminuição da secreção de insulina basal que atingiu valores semelhantes àqueles observados no grupo controle. O aumento na sensibilidade à insulina decorreu de ambos, consumo não oxidativo e oxidativo de glicose. Houve ainda aumento do *clearance* de insulina. Estes vários resultados concordam com estudo prévio de nosso grupo (Pereira, 2003b) e outros (Franssila-Kallunki, 1992).

A função da célula β foi caracterizada pela manutenção de elevada fase rápida de secreção de insulina e diminuição da secreção basal e da segunda fase de secreção atingindo valores semelhantes ao grupo controle. O grupo de estudo reavaliado após o emagrecimento foi composto basicamente por sujeitos com tolerância normal à glicose e poucos com intolerância à glicose. O pequeno grupo de intolerantes mostrou, após a perda de peso, aumento da primeira fase de secreção que se tornou semelhante àquela observada antes da cirurgia, nos obesos com tolerância normal à glicose. Portanto, houve um aumento na secreção rápida de insulina apesar da melhora na sensibilidade à insulina e este fato provavelmente seja decorrente de melhora da sensibilidade da célula β à glicose. Esses resultados concordam com aqueles demonstrados por Polyzogopoulou *et al* 2003, em sujeitos diabéticos. Mudanças parecidas na secreção de insulina foram reportadas por Letiexhe *et al* 1995, usando o modelo mínimo proposto por Bergman, em mulheres não diabéticas que atingiram IMC de eutrofia após gastroplastia. Em nosso estudo, o IMC inicial foi maior (~ 50 vs. 38 kg.m^{-2}) e o IMC final ainda está no intervalo de obesidade, ao contrario das pacientes estudadas por aquele autor.

E possível supor que o tipo de cirurgia realizada possa influenciar a resposta da secreção de insulina ao emagrecimento por mecanismos diversos, incluindo os efeitos da redução da ingestão alimentar, da absorção de substratos e estimulação do trato gastrointestinal e respectivo efeito incretínico. Assim, foram descritas importantes modificações da concentração plasmática de incretinas após bypass gástrico (Laferrère 2007; Näslund 2006) e resposta diversa da sensibilidade à insulina após bypass gástrico comparado à derivação bilio-pancreática (Muscelli 2005). Emagrecimento de 15% induzido por dieta hipocalórica não modificou a primeira fase de secreção de insulina em mulheres com ovário policístico (Holte 1995). Portanto, como discutiremos adiante, é importante reavaliar a secreção em face do grau de resistência à insulina. Além disto, a resposta secretória pós emagrecimento parece diferir entre pessoas com tolerância normal à glicose e diabéticos. Enquanto nas primeiras foram descritas reduções, nos diabéticos foram descritos aumentos da secreção de insulina, atribuídos a menor glicose e/ou lipotoxicidade.

Em nosso estudo, houve modificação importante na sensibilidade da célula β à glicose e os valores observados foram maiores que os encontrados no grupo controle. Desse modo, a perda de peso parece estar associada a ambas, melhora na sensibilidade à insulina e melhora na sensibilidade da célula β à glicose. Além disso, a manutenção da primeira fase de secreção de insulina elevada após o emagrecimento no grupo NT, adicionado à melhora da sensibilidade à insulina explicam a melhora no índice *adaptation*. Esta elevada primeira fase de secreção de insulina pode ser atribuída a uma inerente hiperatividade de função da célula β observada frequentemente em pessoas obesas, como sugerido por Ferrannini et al (2004).

Os mecanismos pelos quais a resistência à insulina, a secreção de insulina e a adaptação da resposta da célula β à glicose melhoraram após a perda de peso não foram investigados no presente trabalho.

Enquanto no estudo basal a resistência à insulina esteve associada diretamente à obesidade e inversamente à adiponectina, sendo estas correlações independentes, a secreção rápida de insulina esteve diretamente associada à sensibilidade da célula β à glicose. Na

fase pré-operatória, a deterioração da tolerância à glicose pareceu ser dependente e relacionada à resistência à insulina e à reduzida função da célula β (sensibilidade à glicose) em concordância com as observações de Mari et al, 2006.

Como descrito anteriormente, o emagrecimento foi caracterizado por alterações na sensibilidade à insulina, secreção de insulina, adaptação da secreção à resistência e também mudanças na sensibilidade da célula β à glicose. A variação do M e da sensibilidade da célula β não pode ser explicada por mudanças nas medidas antropométricas ou na adiponectinemia. Já as alterações observadas na secreção basal e total de insulina foram relacionadas à melhora na sensibilidade da célula β à glicose. Alguns fatores podem prejudicar a sensibilidade e a secreção de insulina. Dentre eles podemos citar a glicotoxicidade, a lipotoxicidade, as citocinas inflamatórias, a leptina e a adiponectina.

Na literatura científica tem sido salientado o papel deletério dos ácidos graxos livres na sensibilidade à insulina e secreção de insulina tanto em estudos experimentais quanto em estudos em humanos (Boden 1997; Griffin 1999). E em particular, teriam ações diretas sobre a própria célula β (Nolan 2006). No nosso estudo, os ácidos graxos livres de jejum não diferiram entre o grupo de obesos e o grupo controle com exceção dos obesos com diabetes e a pequena redução com o emagrecimento não foi significativa e nem foi relacionada às modificações da IR ou da IS. A glicotoxicidade, por sua vez, provavelmente não teve papel sobre a melhora na sensibilidade da célula β pois o grupo de voluntários reavaliado após o emagrecimento foi composto basicamente por indivíduos normotolerantes à glicose.

As citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e CRP têm tido grande destaque na literatura por relacionar-se à resistência a insulina e poderem ser elos de ligação entre obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus.

O TNF- α tem muitas ações pró-inflamatórias e imuno-regulatórias. Sua expressão pelo tecido adiposo é aumentada em pessoas obesas comparadas às magras e exerceria uma ação parácrina sobre os adipócitos, portanto mais localizada, no estímulo

sobre a secreção dos AGL, IL-6 ou outras substâncias circulantes (Kern *et al* 2001). O TNF α tem sido relacionado à inibição da sinalização da insulina em adipócitos humanos *in vitro* (Liu *et al* 1998). Seu mecanismo de ação envolve a fosforilação da serina do IRS-1, o qual altera sua associação com a fosfatidil inositol 3 quinase e ou reduz a ação do receptor de insulina tirosino quinase (Hotamisligil *et al* 1994; 1996; Kanety *et al*, 1995). Inibe também a LPL (lipase lipoprotéica) e estimula a lipólise, que resulta no aumento dos ácidos graxos livres, AGL, o que contribuiria para aumentar a resistência à insulina presente em obesos e pacientes diabéticos.

Os mecanismos de ação da IL-6 ainda são pouco conhecidos, mas seus níveis séricos de jejum estão associados a todos os marcadores de resistência à insulina, em estudos realizados em mulheres (Bastard *et al* 2000) e também ao IMC (Mohamed-Ali *et al* 1997 b). Sabe-se que, tal como o TNF α , inibe a expressão de LPL, mas não estimula a lipólise e, em hepatócitos de ratos teria efeito oposto ao da insulina sobre a síntese de glicogênio (Kanemaki *et al* 1998). Como está aumentada em obesos, pode ser importante tanto como um regulador local da ação da insulina ou como um hormônio circulante, levando a um aumento da resistência à insulina no tecido muscular. De fato, a administração subcutânea de IL-6 recombinante em humanos provocou pequenos aumentos da glicemia de jejum, de forma dose-dependente (Tsigos *et al* 1997). Seu papel na resistência à insulina não foi totalmente definido (Kern *et al* 2001), embora alguns estudos comprovem a correlação entre altos níveis de IL-6 e aumento da resistência à insulina, com conseqüente aumento dos níveis de CRP (Pradhan *et al* 2001). Resultados de nosso laboratório demonstraram previamente que as citocinas estiveram aumentadas no grupo de obesos e após o emagrecimento, houve diminuição para concentrações semelhantes aos do grupo controle (Ortiz *et al* 2007 – manuscrito submetido à avaliação para publicação). Porém, não houve correlação independente entre as citocinas e sensibilidade à insulina, secreção de insulina ou sensibilidade da célula β e tolerância à glicose, tanto no período pré-operatório como após o emagrecimento. As correlações observadas com estas variáveis pareceram secundárias aos parâmetros antropométricos, reafirmando o papel da massa adiposa em liberar citocinas e a obesidade como um estado pró-inflamatório.

Quanto à leptina, Greco et al 2002, relacionaram a melhora na sensibilidade à insulina às menores concentrações de leptina, em obesos submetidos à derivação bilio-pancreatica. No nosso estudo não foi avaliada e provavelmente tenha diminuído muito, pois suas concentrações plasmáticas costumam ser inversamente proporcionais à massa gorda, mesmo em pessoas emagrecidas. Portanto, verificar suas correlações com a resistência à insulina teria sido interessante.

Um aumento na secreção de incretinas foi descrito em sujeitos com obesidade após derivação bilio-pancreatica (Guidone 2006) e gastroplastia com bandagem (Patriti 2004) e foi relacionada à reversibilidade do diabetes tipo 2. Um mecanismo pelo qual a secreção desses hormônios aumenta a secreção de insulina é através de sua ação sobre a sensibilidade da célula β à glicose (Ahren, 2003). Portanto, o efeito incretínico pode ser uma possível explicação para a melhora da sensibilidade da célula β à glicose e consequentemente para a secreção de insulina.



6- CONCLUSÃO

Este estudo nos permitiu confirmar que mesmo em pacientes portadores de obesidade grave, a intolerância à glicose se manifesta quando a célula β não consegue manter uma hipersecreção capaz de compensar a importante resistência à insulina, entre outros fatores, por reduzida sensibilidade da célula β à glicose. A resistência à insulina é dependente do grau de obesidade e de menores concentrações de adiponectina. O emagrecimento induzido por bypass gástrico em pessoas não diabéticas é capaz de restaurar a sensibilidade à insulina e a sensibilidade à glicose, melhorando o metabolismo dos carboidratos. A extensão deste estudo a pacientes diabéticos emagrecidos por bypass gástrico é importante para melhor compreender os mecanismos envolvidos.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdul-Ghani MA, Tripathy D, De Fronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 2006, 29:1130-1139.

Ahren B, Holst JJ, Mari A. Characterization of GLP-1 effects on β -cell function after meal ingestion in humans. *Diabetes Care* 2003, 26:2860–2864.

Ahrén B, Pacini G. Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta-cell function in clinical studies. *Eur J Endocrinol* 2004, 150: 97-104.

American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997, 20: 1183-97.

Ashley FW, Kannel WB. Relation of weight change to changes in atherogenic traits: the Framingham study. *J Chronic Dis.* 1974, 27: 103–114.

Bastard JP, Jardel C e cols. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(9): 3338-42.

Bergman RN, Ader M, Huecking K, Van Citters G. Accurate assessment of beta-cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes* 2002, 51 (suppl. 1):s212-s220.

Boden G. Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997, 46(1): 3-10.

Bonadonna RC, Groop L, Kraemer N, Ferrannini E, Del Prato S, DeFronzo RA. Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. *Metabolism* 1990, 39(5):452-9.

Bonora E, Coscelli C, Butturini U. Relationship between insulin resistance, insulin secretion and insulin metabolism in simple obesity. *Int J Obes* 1985, 9(5): 307-12.

Bratusch-Marrain PR, Waldhausl WK, Gasic S et al. Hepatic disposal of biosynthetic human insulin and porcine C-peptide in humans. *Metabolism* 1984, 33: 151-157.

Brunzell JD, Robertson RP, Lerner RL, et al. Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 42: 222-229.

Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C, Tan S, Berkowitz K, Hodis HN, Azen SP. Preservation of pancreatic B cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 2002, 51: 2796-2803.

Byrne MM, Sturis J, Sobel RJ, et al. Elevated plasma glucose 2h postchallenge predicts defects in β -cell function. *Am J Physiol* 1996, 270: E572-E579.

Caprio S, Bronsosl M, Sherwin RS, Rife F, Tamborlane WV. Co-existence of severe insulin resistance and hyperinsulinaemia in pré-adolescent obese children. *Diabetologia*, 39: 1489-1497, 1996.

Caumo A, Luzi L. First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 287: E371–E385.

Cerasi E, Luft R, Efendic S. Decreased sensitivity of the pancreatic beta cells to glucose in prediabetic and diabetic subjects. A glucose dose-response study. *Diabetes* 1972, 21: 224-234.

Cerasi E, Luft R. The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol* 1967, 55: 278-304.

Chen M, Porte D Jr. The effect of rate and dose of glucose infusion on the acute insulin response in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 42:1168-1175.

Cherrington AD, Edgerton D, Sindelat DK. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia* 1998, 41: 987-996.

COMBS TP, BERG AH, OBICI S, SCHERER PE, ROSSETTI L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(12): 1875-1881, 2001.

De Fronzo, RA, Tobin, JD, Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance *Am J Physiol* 1979, 237,E214-E223.

DeFronzo RA, Bonadonna RG, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 1992, 151: 318-368.

Dixon JB, O'Brien PE. Lipid profile in the severely obese: changes with weight loss after lap-band surgery. *Obesity Research* 2002, 10(9):903-910.

Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *The Journal Clin Invest* 1999, 103:253-259.

Efendic S, Cerasi E, Luft R. Quantitative study on the potentiating effect of arginine on glucose-induced insulin response in health, prediabetic, and diabetic subjects. *Diabetes* 1974, 23:161-171.

Elahi D, Nagulesparan M, Hershcopf RJ, Muller DC, Tobin JD, Blix PM, et al. Feedback inhibition of insulin secretion by insulin: relation to the hyperinsulinemia of obesity. *N Engl J Med* 1982, 306:1196-202.

Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA. Effect of free fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 1983, 72: 1737-1745.

Ferrannini E, Camastra S, Gastaldelli A, Sironi AM, Natali A, Muscelli E, Mingrone G, Mari A. Beta-Cell function in obesity. Effects of weight loss. *Diabetes* 2004, 53 (supp. 3): s26-s33.

Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. β -cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(1): 493-500.

Ferrannini, E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 1988, 37(3):287-301.

Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G et al. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000, 102: 42-47.

Fobi MAL, Lee H, Igwe D, et al. Revision of failed gastric bypass to distal Roux-en-Y gastric bypass: a review of 65 cases. *Obes Surg* 2001, 11:190-195.

Franssila-Kallunki A, Rissanen A, Ekstrand A, Ollus A, Groop L. Effects of weight loss on substrate oxidation, energy expenditure, and insulin sensitivity in obese individuals. *Am J C/in Nutr* 1992, 55:356-361.

Fruebis J et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2001, 98: 2005-2010.

Garvey WT, Birnbaum M. Cellular insulin action and insulin resistance. In: *Clin Endocrinol Metab* 1993; 7(4): 785-873. Ed: Ferrannini E.

Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, De Fronzo RA. San Antonio Metabolism study: beta-cell dysfunction and glucose intolerance: results from the San Antonio Metabolism (SAM) study. *Diabetologia* 2004, 47: 31-39.

Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morroni M, Cinti S, Granzotto M, Vettor R, Camastra S, Ferrannini E. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes*, 51(1):144-51, 2002.

Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance Is Associated With Activation of Protein Kinase C α and Alterations in the Insulin Signaling Cascade. *Diabetes* 1999, 48: 1270-1274.

Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Holst JJ, Nielsen JH, Rorsman P. Glucagon-like peptide 1 (7-36) amide stimulates exocytosis in human pancreatic β -cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. *Diabetes* 1998, 47: 57-65.

Gromada J, Ding WG, Barg S, Renstrom E, Rorsman P. Multisite regulation of insulin secretion by cAMP-increasing agonists: evidence that glucagon-like peptide 1 and glucagon act via distinct receptors. *Pflugers Arch* 1997, 434: 515-521.

Guidone C, Manco M, Valera-Mora E, Iaconelli A, Gniuli D, Mari A, Nanni G, Castagneto M, Calvani M, Mingrone G. Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. *Diabetes* 2006, 55:2025-2031.

Guldstrand M, Ahrén B, Adamson AU. Improved β -cell function after standardized weight reduction in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, 284: E557-E565.

Hansen BC, Bodkin NL. Standardization of IVGTT. Importance of method used to calculate glucose disappearance. *Diabetes Care* 1993, 16(5): 847.

Hanson RL, Pratley RE, Bogardus C, Narayan KM, Roumain JM, Imperatore G, Fagot Campagna A, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC. Evaluation of simple indices of insulin sensitivity and insulin secretion for use in epidemiological studies. *Am J Epidemiol* 2000, 151: 190-198.

Havel JP. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* 2002, 13:51-59.

Holte J, Bergh T, Berne C, Wide L, Lithell H: Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80:2586–2593.

Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994, 43(11): 1271-8.

Jones CNO, Abbasi F, Carantoni M et al. Roles of insulin resistance and obesity in regulation of plasma insulin concentrations. *Am J Physiol* 2000, 278: E501-508.

Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993, 42:1663-1672.

Kanemaki T, Kitade H, Kaibori M, e cols. Interleukin 1 beta and interleukin 6, but not tumor necrosis factor alpha, inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology* 1998, 27:1296-1303.

Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor alpha induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270(40): 23780-4.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280(5): E745-51.

Kissebah AH Central obesity: measurement and metabolic effects. *Diabetes Rev* 1997, 5:8-20..

Kitabchi AE, Tempresa M, Knowler WC, Kahn SE, Fowler SE, Haffner SM, Andres R, Saudek C, Edelstein SL, Arakaki R, Murphy MB, Shamooh H. The Diabetes Prevention Program Research Group. Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin. *Diabetes* 2005, 54:2404-2414.

Kjems LL, Holst JJ, Vølund A, Madsbad S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion. Effects on β -cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* 2003, 52:380-386.

Korner J, Bessler M, Cirilo LJ, Conwell IM, Daud A, Restuccia NL, Wardlaw SL. Effects of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on Fasting and Postprandial Concentrations of Plasma Ghrelin, Peptide YY, and Insulin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005, 90(1):359–365

Laferrère B, Heshka S, Wang K, Khan Y, MCGINTY J, Teixeira J, Hart AB, Olivan B. Incretin Levels and Effect Are Markedly Enhanced 1 Month After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery in Obese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2007, 30:1709-1716.

Letiexhe MR, Scheen AJ, Gérard PL, Desai C, Lefévre PJ. Postgastroplasty recovery of ideal body weight normalizes glucose and insulin metabolism in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80:364-369.

Lilloja S, Bogardus C. Obesity and insulin resistance: lessons learned from Pima Indians. *Diabetes Metab Rev*, 4: 517-540, 1988.

Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J. Tumor Necrosis factor alpha acutely inhibits insulin signalling in human adipocytes: implications of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 1998, 47(4): 515-22.

Malaisse WJ, Sener A, Herchuelz A, Hutton JC. Insulin release : the fuel hypothesis. *Metabolism* 1979, 28: 373.

Mari A, Ahrén B, Pacini G. Assessment of insulin secretion in relation to insulin resistance. *Curr Opin in Clin Nutr and Metab Care* 2005, 8:529-533.

Mari A, Manco M, Guidone C, Nanni G, Castagneto M, Mingrone G, Ferrannini E. Restoration of normal glucose tolerance in severely obese patients after bilio-pancreatic diversion: role of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia* 2006, 49(9): 2136-43.

Mari A, Schmitz O, Gastaldelli A, Oestergaard T, Nyholm B, Ferrannini E. Meal and oral glucose tests for assessment of beta-cell function: modeling analysis in normal subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, 283: E 1159-E 1166.

Mattar, R. Avaliação da composição corporal por bioimpedância: uma nova perspectiva. *Âmbito Medicina Desportiva* 1995, Ano II, 13: 22-24.

Matthews D, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Trecher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.

McGuire, EAH, Heldermaun, JH, Tobin, JD, Andres, R, Berman, M. Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man *J Appl Physiol* 1976, 41:1312-1318.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, *et al.* Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(12): 4196–4200.

Mokdad et al. Prevalence of obesity, diabetes and obesity-related health risk factors 2001. *JAMA* 2003, 289(1): 79-79.

Muscelli E, Mari A, Natali A, Astiarraga BD, Camastra S, Frascerra S, Holst JJ, Ferrannini E. 2006 Impact of incretin hormones on β -cell function in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E1144 - E1150.

Muscelli E, Mingrone G, Camastra S, Manco M, Pereira JA, Pareja JC, Ferrannini E. Differential effect of weight loss on insulin resistance in surgically treated obese patients. *Am J Med* 2005, 118(1): 51-57.

Muscelli E, Pereira JA, Lizarin MA, Silva CA, Pareja JC, Saad JM. Lack of insulin inhibition on insulin secretion in non-diabetic morbidly obese patients. *International Journal of Obesity*, 25(6):798-804, 2001.

Näslund E, Kral J. Impact of gastric bypass surgery on gut hormones and glucose homeostasis in type 2 diabetes. *Diabetes* 2006, 55 (suppl. 2): S92-S97.

Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W: Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986, 29:46 –54.a

Nauck MA, Homberger E, Eberhard GS, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and c-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986, 63: 492-498 b.

Nolan CJ, Madiraju MSR, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. Fatty Acid Signaling in the β Cell and Insulin Secretion. *Diabetes* 2006, 55 (suppl 2): S16-S23.

Novoa FJ, Boronat M, Saavedra P, Diaz- Cremades JM, Varillas VF, La Roche F, Alberiche MP, Carrillo A: Differences in cardiovascular risk factors, insulin resistance, and insulin secretion in individuals with normal glucose tolerance and in subjects with impaired glucose regulation: the Telde Study. *Diabetes Care* 2005, 28: 2388–2393.

Ortiz JNM, Monte Alegre S, Marin DM, Souza AL, Pareja JC, Muscelli E. The effect of insulin on serum adiponectin, IL-6, TNF- α and CRP in severely obese subjects with normal or impaired glucose tolerance 2007- manuscrito submetido a publicação.

Patriti A, Facchiano E, Sanna A, Gulla N, Donini A: The enteroinsular axis and the recovery from type 2 diabetes after bariatric surgery. *Obes Surg* 2004, 14:840–848.

Pereira JA, Claro BM, Pareja JC, Chaim EA, Astiarraga BD, Saad MJ, Muscelli E. Restored insulin inhibition on insulin secretion in nondiabetic severely obese patients after weight loss induced by bariatric surgery. *International Journal of Obesity* 2003, 27:463-468. a

Pereira JA, Lararin MACT, Pareja JC, Souza AL, Mescelli E. Insulin resistance in nondiabetic morbidly obese patients: effect of bariatric surgery. *Obesity Research* 2003, 11:1495-1501. b

Pereira JA, Pareja JC, Chain EA, Lazarin MACT, Souza AL, Muscelli E. Effect of weight loss on insulin resistance, energy expenditure and glucose induced thermogenesis in morbidly obese patients. *Obesity Research*, 9(S3): 149 S, 2001.

Perley MJ, DM. Kipnis. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *Gun. Invest.* 1967, 46: 1954.

Pfeifer MA, Halter JB, Porte D Jr. Insulinsecretion in diabetes mellitus. *Am J Med* 1981, 70: 579-588.

Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998, 41: 1241-1248.

Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD et al. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997, 40: 1286-1292.

Poitout V, Robertson P. Minireview: Secondary β -Cell Failure in Type 2 Diabetes—A Convergence of glucotoxicity and Lipotoxicity. *Endocrinology* 2002, 143(2):339–342.

Polonsky KS, Jaspan J, Pugh W et al. Metabolism of C-peptide in the dog: in vivo demonstration of the absence of hepatic extraction. *J Clin Invest* 1983, 72: 1114-1123.

Polonsky KS, Rubenstein AH. C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin: pitfalls and limitation. *Diabetes* 1984, 33: 486-494.

Polyzogopoulou EV, Kalfarentzos F, Vagenakis AG, Alexandrides TK. Restoration of euglycemia and normal acute insulin response to glucose in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery. *Diabetes* 2003, 52:1098-1103.

Potteiger JA, Jacobsen DJ, Donnelly JE. A comparison of methods for analyzing glucose and insulin areas under the curve following nine months of exercise in overweight adults. *Int J Obes* 2002, 26: 87-9.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA* 2001, 286(3): 327-34.

Rajala MW, Scherer PE. Minireview: the adipocyte: at the crossroads of energy homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003, 144: 3765-3773.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1:785–789, 1963.

Rastam L, Prineas RJ, Gomez-Marin O. Ratio of cuff/arm circumference as a determinant of arterial blood pressure measurements in adults. *Journal of Internal Medicine* 1990, 227: 225-32.

Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. Diabetes Prevention Program Research Group. *N. Engl. J. Med.*, Feb 2002; 346: 393 - 403.

Rubstein AH, Clark JL, Melani F et al. Secretion of proinsulin, C-peptide by pancreatic cells and its circulation in blood. *Nature* 1969, 224: 697-699.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA et al. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 2002, 51: 3391-3399.

Shah M, Simha V, Garg A. Long-term impact of bariatric surgery on body weight, comorbidities and nutritional status. *Journal of Clin Endocrinol & Metab* 2006, 91(11): 4223-4231.

Sjöström CD, Lissner L, Wedel H, Sjöström L. Reduction in incidence of diabetes, hypertension and lipid disturbances after intentional weight loss induced by bariatric surgery: the SOS Intervention Study. *Obes Res.* 1999, 7:477– 484.

Steiner KE, Mouton SM, Bowles CR, Williams PE, Cherrington AD. The relative importance of first and second-phase insulin secretion in countering the action of glucagon on glucose turnover in the conscious dog. *Diabetes* 1982, 31: 964-972.

Steiner KE, Mouton SM, Williams PE, Lacy WW, Cherrington AD. Relative importance of first and second-phase insulin secretion on glucose homeostasis in conscious dog. *Diabetes* 1986, 35: 776-784.

The Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI). *Arch Intern Med* 1997; 157:2413-2446.

Toffolo G, De Grandi F, Cobelli C. Estimation of beta-cell sensitivity from intravenous glucose tolerance test C-peptide data. Knowledge of the kinetics avoids errors in modeling the secretion. *Diabetes* 1995, 44: 845-854.

Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitisiadis CS, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(12): 4167-70.

Tura A, Kautzky-Willer A, Pacini G. Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006, 72(3):298-301.

UK prospective diabetes study 7: Response of fasting plasma glucose to diet therapy in newly presenting type II diabetic patients. UKPDS Group. *Metabolism* 1990, vol 39(9): 905-912

Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KGMN. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabet Med* 2002, 19: 708-723.

Viltsboll T, Holst JJ: Incretins, insulin secretion and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2004, 47: 357–366.

Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B et al. Diminished β -cell secretory capacity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1984, 74: 1318-1328.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(5):1930-35.

White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science* 2003, 302 (5651):1710-1711.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, 2000. Reprinted 2004. p. 8-16

Yokota T *et al.* Adiponectin, a new member of the family of siluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the function of macrofages. *Blood* 2000, 96: 1723-1732.

ZHANG YY, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. **Nature**, 372: 425-432, 1994.

Zhou YP, Grill VE. Palmitate-induced beta-cell insensitivity to glucose is coupled to decreased pyruvate dehydrogenase activity and enhanced kinase activity in rat pancreatic islets. *Diabetes* 1995, 44:394-399.



8- ANEXOS

**The effect of insulin on serum adiponectin, IL-6, TNF- α
and CRP in severely obese subjects with normal or
impaired glucose tolerance**

**Josiane Noveti Morais Ortiz, Sarah Monte Alegre, Daniela
Miguel Marin, Aglécio L de Souza, José Carlos Pareja, Elza
Muscelli**

**Department of Internal Medicine, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil**

Address correspondence to: Elza Muscelli, MD
Department of Internal Medicine
Via Roma, 67
56122 Pisa, Italy
phone: +39 050 553272
fax: +39 050 553235
muscelli@ifc.cnr.it

Short title: Insulin effect on IL-6, CRP, TNF- α and adiponectin

ABSTRACT

Background: obesity is associated with decreased circulating adiponectin and insulin sensitivity (IS) and increased serum IL-6, C-reactive protein (CRP) and TNF α . **Aims:** to investigate the acute effect of insulin on these cytokines in lean control and insulin resistant (IR) obese subjects with normal or impaired glucose tolerance. **Methods:** 32 obese, 15 normal glucose tolerant (NGT), 11 impaired glucose tolerant (IGT) and 6 type 2 diabetic (T2D) subjects: BMI=50.2 $\pm$ 2.2; 48.5 $\pm$ 2.4 and 51.0 $\pm$ 3.0 kg/m²) and 9 lean subjects (CT, 22.3 $\pm$ 0.6kg/m²) paired by age, received an OGTT and a 3h-euglycemic insulin clamp (40 μ U/min-m²). IL-6, TNF α , adiponectin and CRP were assayed at fasting and at 180min of insulin infusion. **Results:** T2D were more insulin resistant (M=19 $\pm$ 4 μ mol/kg_{FFM}/min) than NGT and IGT (36 $\pm$ 5 and 28 $\pm$ 4; all p<0.01 vs. CT=62 $\pm$ 4 μ mol/kg_{FFM}·min). Fasting IL-6, and CRP were similar among obese subgroups, higher than CT (all p $\leq$ 0.01) and related to each other, to BMI and percent fat mass. Adiponectin was lower in NGT, IGT and T2D (7.55 $\pm$ 1.26; 5.14 $\pm$ 0.94; 2.79 $\pm$ 0.66 vs. CT 11.56 $\pm$ 1.37 μ g/ml) and directly and independently related to M, to non-oxidative and oxidative glucose oxidation and to HDL-cholesterol after adjustment for sex, waist, age and BMI (r²=0.51; p<0.0001). Insulin infusion lowered adiponectin only in obese subjects (p<0.0001) and little affected the other cytokines. **Discussion:** in severely obese subjects, IL-6, TNF α and CRP are similarly increased independently of glucose tolerance status and insulin resistance, and are not affected in the short-term by insulin. Adiponectin is decreased in obese subjects mainly with IGT or DM2 and is independently related to the insulin sensitivity, both to oxidative and to non-oxidative glucose utilization. In obese subjects, the inhibitory effect of insulin on adiponectin may contribute to its lower levels and to IR.

Keywords: Obesity, insulin action, IL-6, TNF- α , adiponectin and IGT.

INTRODUCTION

Obesity is associated with a cluster of metabolic alterations such as insulin resistance, hypertension, and dyslipidemia (1) and also with a low-grade systemic inflammation, which is presumed to play a role in the development of insulin resistance, cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes mellitus (T2D) (2,3). Adipocytokines or adipokines are synthesized by adipose tissue, released into the circulation and may act as signalling molecules (4,5). Many studies have explored the interrelation between the metabolic alterations and adipokines; however, the physiological mechanisms underlying this complex relationship remain unclear. High serum levels and greater expression of Interleukin-6 (IL-6) and Tumour Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) in adipose tissue have been demonstrated in different rodent models of obesity and also in humans (2,6-7) and have been correlated to the visceral adipose mass in some studies but this was not found in others (4,5,8). Acting in an autocrine, paracrine, or endocrine fashion IL-6 and TNF- α control different metabolic functions (5,6) that can contribute to the development of insulin resistance. IL-6 induces the production of C-reactive protein (CRP) by the liver, and together, they are considered to be physiological markers of low-grade systemic inflammation (9). Over-expression of TNF- α by adipose tissue seems to play a major role in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance, probably resulting from an interaction with insulin signalling pathways (10,11). Impairment of insulin action has been observed in isolated adipocytes under IL-6 control (12). In vivo, the circulating levels of these cytokines are directly associated with insulin resistance (6). Furthermore, higher circulating levels of IL-6 and TNF- α have been measured in T2D (13) and in normal subjects the subcutaneous injection of recombinant IL-6 has been shown to induce a small increase in glycemia (14).

However, there is still controversy regarding acute regulation of IL-6 and TNF- α by insulin. *In vitro* studies have shown that insulin stimulated the expression of IL-6 in human adipocytes (15) and in 3T3-L1 cells (16) and an *in vivo* study showed that insulin infusion during a euglycemic clamp increased IL-6 expression in adipose tissue and serum, while no changes were seen in serum TNF- α levels and only a small increase in TNFmRNA (17). Other studies have found no effect of insulin on TNF- α expression in subcutaneous adipose tissue and TNF- α release from cultured human adipose tissue (18,19).

Adiponectin is abundantly expressed in white adipose tissue, and is decreased in individuals with obesity (20), T2D (21) and coronary artery disease (22). Adiponectin has some peculiarities that differentiate it from the other adipokines, since adiponectin seems to play a protective role against atherosclerosis and insulin resistance and to have anti-inflammatory properties (23). Circulating concentrations of adiponectin are directly related to whole-body and hepatic insulin sensitivity (24,25). There is evidence to suggest that adiponectin might modulate insulin signalling and insulin sensitivity in animals and in humans (23) and that insulin might modulate adiponectin expression (26,27). However, the role of insulin sensitivity and of insulin plasma levels on the modulation of adiponectin concentrations in humans remains unclear. Regarding its anti-inflammatory action, adiponectin might modulate the TNF- α induced inflammatory response, by reducing the secretion of TNF- α by macrophages. Inversely, TNF- α and IL-6 reduce human adipocyte expression of adiponectin, thus contributing to insulin resistance (3).

Severely obese subjects and those with impaired glucose tolerance (IGT), are frequently insulin resistant (28). The aim of this study was to evaluate the acute insulin effect on circulating adiponectin, IL-6, TNF- α and C-reactive protein and, their relationship with insulin resistance, glucose oxidation and non-oxidative glucose disposal in normal subjects and in class III obese subjects with normal or impaired glucose tolerance.

RESEARCH METHODS AND PROCEDURES

Study population 32 morbidly obese patients (9 male/23 female, BMI $49.8 \pm 1.4 \text{ kg/m}^2$, aged 37.2 ± 1.4 years) and 9 lean control subjects (5 male/4 female, BMI $22.3 \pm 0.6 \text{ kg/m}^2$, aged 35.4 ± 3.7 years) were invited to participate in this study. Exclusion criteria were hormonal replacement therapy, hepatic or renal insufficiency, stage 2 arterial hypertension according to the criteria of the seventh report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (29) and any pharmacological treatment that could influence insulin secretion and sensitivity. The lean subjects were selected from students and hospital employees. The investigation was approved by the Institutional Review Board of the School of Medical Sciences (State University of Campinas), and all of the subjects gave informed consent before the study began.

Experimental protocol All participants were examined in the morning after an overnight fast (about 12h). Body composition was evaluated by electrical bioimpedance with a Biodynamics monitor (Biodynamics Corp, Seattle, WA, USA)(30). Arterial blood pressure was measured by a mercury sphygmomanometer (a large cuff was used for obese individuals). For the OGTT, 75g of glucose was ingested over 5 min, and venous blood was sampled at 30 min intervals over 2h for plasma glucose and insulin measurements. Glucose tolerance was defined during an OGTT according to American Diabetes Association criteria (31). The euglycemic hyperinsulinemic clamp (3h insulin infusion at $40 \mu\text{U} \cdot \text{min} \cdot \text{m}^{-2}$ of body surface area), was carried out after an overnight fast (12-14h) (32). To allow sampling of arterialized blood during the study the hand was placed in a heated box ($\sim 60^\circ\text{C}$). The 2-h period before the insulin infusion commenced constituted the basal period. During insulin infusion glucose was measured at 5 min intervals and plasma glucose was maintained constant with a variable glucose infusion, using an infusion pump AVI 270 (3M Health Care, EUA). In T2D subjects, glucose infusion was started when concentrations of plasma glucose, following insulin infusion, reached values between 5.5

and 6.0 mmol/l. Arterialized venous blood samples were obtained at 30 min intervals for subsequent measurements of insulin, adiponectin, IL-6, CRP, TNF- α , total and HDL cholesterol and triglycerides. Indirect calorimetry was carried out during the basal period and the insulin clamp, using a computerized, continuous open-circuit system with a canopy (Metabolic Cart Horizon; Vmax; SensorMedics; Yorba Linda; CA).

Analytical Procedures

Plasma glucose was measured by the glucose oxidase technique in a Beckman Glucose Analyzer (Beckman, Fullerton, CA, USA). Serum concentrations of insulin and C-peptide were measured by radioimmunoassay, by using specific kits for human insulin (less than 0.2% cross-reactivity with proinsulin) and C-peptide (Linco Research, St. Louis, MO, USA). Serum total and HDL cholesterol, triglycerides and uric acid were assayed spectrophotometrically on an automatic colorimetric system (Cobas Mira; Roche Ltd, Basel, Switzerland). Serum levels of IL-6 and TNF- α were determined by ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay (TNF- α : Quantikine High Sensitivity-HSTA00C and IL-6: Quantikine High Sensitivity-HS600B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The sensitivity of these assays was 0.06-0.32 pg/ml for TNF- α and 0.016-0.110 pg/ml for IL-6. Serum Adiponectin was assayed by ELISA (Human Adiponectin ELISA Kit, Linco Research Inc., Missouri, USA). The test sensitivity was 0.78 ng/ml.

Data Analysis

At the circulating insulin levels reached in our insulin clamp studies, suppression of endogenous glucose release was virtually complete (33). Thus, whole-body glucose uptake (or M value) was calculated as the glucose infusion rate during the second (SS-1) and third hour (SS-2) of the insulin clamp period after correction for changes in glucose levels in a distribution volume of 250 ml/kg. The M value was normalized per kilogram of fat-free mass ($\mu\text{mol/min per kilogram fat-free mass}$). Areas under OGTT time-concentration curves were calculated by the trapezoidal rule. Glucose oxidation (GOx) was calculated from the

carbon dioxide release, oxygen consumption, measured by the calorimetry and nitrogen urinary excretion. Nonoxidative glucose disposal (NOGD) was calculated as the difference between the whole body glucose uptake and net glucose oxidation (34).

Statistical Analysis

Data are presented as the mean $\pm$ s.e.m. Group values were compared by the Mann-Whitney test. Paired group values were compared by the Wilcoxon test. Time series were analyzed by ANOVA for repeated measures, with a group factor, treatment factor (time), and their interaction. Linear and stepwise regression models were tested by standard techniques. Adjustment for covariates was carried out by ANCOVA. The tests were performed using the software StatView. A p-value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Fifteen of the obese subjects had normal glucose tolerance (OB-NGT), while 11 were intolerant (OB-IGT) and 6 had T2D (OB-DM). The obese groups were well matched for age to the CT group and, as expected, obese subjects had much higher waist, hip, fat mass and fat-free mass. Their lipid profile, except for higher triglycerides in all OB groups and lower HDL-cholesterol in OB-DM, was similar (Table 1). Fasting plasma glucose was higher in OB-DM while the area under the glucose curve in the OGTT, as expected, increased progressively from CT to OB-NGT, OB-IGT and OB-DM. Fasting (FPI) and stimulated serum insulin were significantly higher in all obese groups than in controls and FPI was higher in OB-DM as compared to OB-NGT group (Table 2).

Insulin induced glucose uptake (M value) was reduced in the obese groups as compared to the CT group, during both SS1 and SS2, when it was also significantly lower in OB-DM

compared to the other OB groups. M value in the SS2 period, as expected, was significantly higher than in SS1 in all study groups (Table 2 and Fig 1A). In SS1 and SS2, both glucose oxidation and non-oxidative glucose disposal were reduced in the obese groups. There were no differences between NGT and IGT groups.

Adiponectin concentrations were lower in NGT, IGT and T2D groups, as compared to CT and, were also lower in OB-DM compared to OB-NGT and OB-IGT (Fig 1B). Furthermore, insulin infusion lowered plasma adiponectin significantly in the obese subgroups all together, from an average of 5.95 ± 0.77 $\mu\text{g/ml}$ during fasting to 4.96 ± 0.65 $\mu\text{g/ml}$ after insulin infusion ($p < 0.0001$; mean variation of $-12 \pm 3\%$), but not in the control group ($-2 \pm 4\%$). The decrease was also significant in OB-IGT ($-9 \pm 7\%$) and OB-DM ($-22 \pm 10\%$) analysed separately but did not reach statistical significance in OB-NGT ($-11 \pm 5\%$).

During fasting and also at 3h of insulin infusion, serum levels of IL-6 and C-reactive protein were higher in the obese subjects compared to CT, with no differences among IGT, NGT and DM groups. Even if the fasting plasma TNF- α was higher in the obese subgroups, the difference compared to the CT group reached statistical significance only in the OB-DM group (Fig 2 A-C). The effect of insulin on serum concentration of these cytokines was observed as a reduction of TNF- α for OB-NGT and, CRP for OB-DM and for the pooled data of obese subjects (clamp vs. basal: $p < 0.002$), whereas IL-6 did not change significantly in any group.

In the pooled data of all volunteers (CT plus obese subgroups), insulin sensitivity was inversely related to the measures of adiposity, to fasting and OGTT plasma glucose, insulin, HDL-cholesterol and directly related to adiponectin (Table 3; Fig 3A). TNF- α , IL-6 and CRP were related to many of the above parameters (Table 3). The adiponectinemia was related to all of these parameters in an inverse fashion to the insulin sensitivity. After adjustment for age, waist and sex, insulin sensitivity (M value) was still related to plasma

adiponectin and to BMI (adjusted $r^2=0.57$; $p<0.0001$) (Fig 3B). In addition, using the same model NOGD was independently related to BMI, adiponectin and age ($r^2=0.47$; $p<0.0001$) and **glucose** oxidation only to adiponectin ($r^2=0.22$; $p=0.003$). Furthermore, adiponectin, adjusted for BMI, sex and age, was still related to M and to HDL-cholesterol (adjusted $r^2=0.51$; $p<0.0001$). After adjusting for BMI or fat mass, IL-6 and CRP were no longer related to the metabolic parameters, whereas TNF- α after adjustment was still related to FPI, but not to the M value.

DISCUSSION

This study allowed us to compare selected inflammatory markers and adiponectinemia in subjects with severe obesity and important insulin resistance, displaying different degrees of glucose tolerance from normal to diabetes. The higher values of the inflammatory markers, IL-6 and CRP were better explained by the obesity, whereas the hypo-adiponectinemia, obesity, insulin resistance to glucose oxidation and to the non-oxidative glucose disposal were all correlated. In addition, the results suggest an *in vivo* inhibitory effect of insulin on adiponectin. Higher levels of inflammatory markers and reduced adiponectin were expected in the obese as compared to lean subjects, but the contribution of each one of obesity, glucose tolerance and insulin resistance remains controversial. It is important to observe that the obese subgroups were similar regarding the degree of obesity and body composition. The few metabolic differences were (in T2D), lower insulin sensitivity associated with higher insulin levels at fasting but not during OGTT and, as expected by group definition criteria, there was distinct fasting and OGTT plasma glucose among the obese groups.

There were no differences among NGT, IGT or T2D obese, regarding serum TNF- α , IL-6 and CRP values, but all of these cytokines were significantly higher in the obese groups than in lean subjects. The small but significantly higher TNF- α in obese subjects

(whichever cell is implicated in plasma levels; e.g. macrophages or adipocyte) and the independent relationship with insulinemia agrees with findings of a correlation between the circulating levels and obesity and/or insulin resistance and a decrease after weight loss (6,35), although others did not find elevated circulating levels of this cytokine in obesity (18). Elevated IL-6 in obesity has been clearly demonstrated by several studies. IL-6 secretion is higher in visceral than in subcutaneous adipose tissue, the circulating levels are strongly related to its protein content in adipose tissue and is expressed by macrophages and adipocytes (3). Although the exact mechanisms have not been elucidated, a link between the serum concentration and insulin resistance has been suggested (3,12). An increase of plasma glucose was reported after IL-6 subcutaneous administration (14). However, acute IL-6 administration did not change the whole body glucose uptake or the endogenous glucose production in another report (36). Since in the present study, the higher levels of these cytokines were present in the severely obese patients who were also insulin resistant and had variable degrees of impaired glucose tolerance, we cannot distinguish between the effects of each one of these factors on inflammatory markers and on adiponectin. But, IL-6 seemed to be influenced more by obesity than insulin resistance, since it was similar among the obese groups and, after correction for BMI or body fat, was no longer related to the metabolic parameters. One of the main effects of this cytokine is to induce hepatic CRP production, which, we also found increased in the obese groups. CRP, like IL-6, was better explained by obesity than by insulin resistance or glucose tolerance status. Both, IL-6 and CRP contribute to the low-grade systemic inflammation observed in obesity and DM and, CRP is accepted as an independent risk marker for cardiovascular complications (9).

In the present study, adiponectinemia and insulin sensitivity were progressively and in parallel reduced in obese subjects from NGT to IGT and to T2D despite similar degree of obesity; adiponectin was strongly related to insulin sensitivity and to the glucose levels

during the OGTT, even after correction for adiposity measures. These results together suggest a predominant role of adiponectin to improve insulin sensitivity, both the non-oxidative and oxidative pathway. The direct relationship between adiponectin and insulin sensitivity has been demonstrated in animal models and in humans (23), but the exact mechanisms are not known. Many physiological effects seem to be involved, like a decrease in tissue content of triglycerides, activation of PPAR α and AMP kinase, and a reduction of TNF α secretion by macrophages (3,23). The correlation with NOGD agrees with a recent report by Yokoyama et al. in diabetic subjects and could be attributed to a reduced stimulation of glycogen synthase in skeletal muscle (37) but they did not find a correlation to glucose oxidation.

In the same way, the independent relationship between HDL-cholesterol and adiponectin is in agreement with other studies (21) and might be evidence of the protective role of adiponectin against atherosclerosis. Indeed, the decreased levels found in our study are in agreement with the finding that HDL-cholesterol levels decrease with obesity, T2D and insulin resistance, leading to a major risk of CV complications in obese, insulin resistant and diabetic subjects.

While insulin infusion during a 3-h clamp did not change the IL-6, TNF- α and CRP values, a significant decrease of plasma adiponectin was seen only in obese subjects. One possible explanation is a differentiated response to insulin according to the degree of insulin sensitivity, as recently suggested in an elegant study by Westerbacka et al, analyzing human adipose tissue collected during a euglycemic clamp (27). Other studies did not found any insulin action on subcutaneous adipose tissue expression of inflammatory markers (18,19,38), so this remains controversial. However, in the former study, insulin increased the adipose tissue mRNA of adiponectin in the group with normal insulin sensitivity and did not change it in the IR group. In our study there was a reduction of adiponectin in insulin resistant patients and no changes in normal participants. Study

characteristics may be responsible for the differences, such as: our patients being heavier, more insulin resistant and having some degree of impaired glucose tolerance. Furthermore, circulating adiponectin originates not only from secretion by the subcutaneous fat, but also by the visceral fat. In fact, a differential insulin regulation on secretion of adiponectin by omental and subcutaneous derived adipocytes has been reported, justifying apparently distinct responses (39). Despite these differences, when results from the two studies are taken together they suggest a harmful regulation of adiponectin by insulin. The overall harmful effect of the interaction insulin/adiponectin on glucose metabolism is also suggested by the fact that the obese subjects in whom adiponectin decreased during the clamp (73% of subjects), displayed a higher plasma glucose 120 min after glucose ingestion (OGTT) and a lower M value ($p < 0.05$; data not shown) than those which adiponectin did not change or increased.

The weak effect of insulin on inflammatory markers in our study may be attributed to a relatively short insulin infusion (3h), since the activation of adipose TNF- α mRNA and IL-6 mRNA was seen only after 4h of insulin clamp (17). The reasons for the apparently paradoxical response of TNF- α in OB-NGT and of CRP in the diabetic subjects are not easily explained. Longer duration of insulin infusion and a larger number of participants may help.

In conclusion, our results suggest that the increase of inflammatory markers in severely obese subjects is mainly related to the degree of obesity and we found a weak response to insulin infusion. More importantly, insulin resistance, especially to non-oxidative glucose disposal, was related to the low adiponectin concentration. The persistent hyperinsulinemia of the severely obese can contribute to down regulate the adiponectin expression, to worsen their glucose regulation and also to increase their cardiovascular risk.

Acknowledgements – we thank Conceição Ap da Silva, Brenno Domingues Astiarraga and Sarah Hills for their assistance.

Financial support – Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP; SP, Brasil)

REFERENCES

1. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; **14**:173–194.
2. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; **259**: 87–91.
3. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw* 2006; **17** (1): 4-12.
4. Bullò M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research* 2003; **11** (4): 525-31.
5. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. Human subcutaneous adipose tissue releases IL-6 but not TNF- α in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 4196–4200.
6. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue: regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; **95**: 2111–2119.
7. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; **95**(5): 2409.
8. Blüher M, Kratzsch J, Paschke R. Plasma levels of tumor necrosis factor α , angiotensin II, growth hormone, and IGF-I are not elevated in insulin resistant obese individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2001; **24** (2): 328-34.
9. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA* 2001; **286** (3): 327-34.

- 10.Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor alpha induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 1995; **270** (40): 23780-4.
- 11.Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White M, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; **271**: 665–8.
- 12.Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **311**: 372-9.
- 13.Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and blood cytokine production in types 2 diabetes. *Life Sciences - Elsevier Science* 2000; **67**: 291–300.
- 14.Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitisiadis CS, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human inteleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82** (12): 4167-70.
- 15.Vicennati V, Vottero A, Friedman C, Papanicolaou DA. Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26**: 905-11.
- 16.Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R. Interleukin(IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumor necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 2003; **35**: 147-52.
- 17.Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Keller P, Keller C, Pedersen BK. Insulin stimulates interleukin-6 tumor necrosis factor- α gene expression in human subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **286**: E234-E238.

- 18.Koistinen HA, Bastard JP, Dusserre E, Ebeling P, Zegari N, Andreelli F, et al. Subcutaneous adipose tissue expression of tumour necrosis factor-alpha is not associated with whole body insulin resistance in obese nondiabetic or in type-2 diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 2000; **30** (4): 302-10.
- 19.Sewter CP, Digby JE, Blows F, Prins J, O'Rahilly S. Regulation of tumour necrosis factor-alpha release from human adipose tissue in vitro. *J Endocrinol* 1999; **163** (1): 33-8.
- 20.Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **257**: 79-83.
- 21.Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 1595-99.
- 22.Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; **100**:2473-76.
- 23.Kadowaki, T.; Yamauchi, T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocrine Reviews* 2005; **26**: 439-51.
- 24.Stefan N, Stumvoll M, Vozarova B, Weyer C, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care* 2003; **26** (12): 3315-19.
- 25.Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 1930-35.

26. Brame LA, Considine RV, Yamauchi M, Baron AD, Mather KJ. Insulin and endothelin in the acute regulation of adiponectin in vivo in humans. *Obesity Research* 2005; **13** (3): 582-8.
27. Westerbacka J, Corner A, Kannisto K, Kolak M, Makkonen J, Korshennikova E, et al. Acute in vivo effects of insulin on gene expression in adipose tissue in insulin-resistant and insulin-sensitive subjects. *Diabetologia* 2006; **49** (1): 132-40.
28. Pereira JA, Lizarin MACT, Pareja JC, Souza A, Muscelli E. Insulin resistance in nondiabetic morbidly obese patients: effect of bariatric surgery. *Obesity Research* 2003; **11** (12): 1495-501.
29. National Institutes of Health. The Seventh Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VII). *NIH Publication N° 03-5233*. EUA, 2003. p. 2-3.
30. Fulcher GR, Farrer M, Walker M, Rodham D, Clayton B, Alberti KGM. A comparison of measurements of lean body mass derived by bioelectrical impedance, skinfold thickness and total body potassium. A study in obese and non-obese normal subjects. *Scand J Lab Invest* 1991; **51**: 245-53.
31. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Clinical Practice Recommendations 2003: Committee Report. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: *Diabetes Care* 2003; **26** (1): S4-S20.
32. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; **237**(3): E214-33.
33. Bonadonna RC, Groop L, Kraemer N, Ferrannini E, Del Prato S, DeFronzo RA. Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. *Metabolism* 1990; **39** (5): 452-9.

- 34.Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review: *Metabolism* 1988; **37** (3): 287-301.
- 35.Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor alpha in serum of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83** (8): 2907-10.
- 36.Steensberg A, Fischer CP, Sacchetti M, Keller C, Osada T, Schjerling P, et al. Acute interleukin-6 administration does not impair muscle glucose uptake or whole-body glucose disposal in healthy humans. *J Physiol* 2003; **548** (2): 631-8.
- 37.Yokoyama H, Emoto M, Mori K, Araki T, Teramura M, Koyama H, et al. Plasma adiponectin level is associated with insulin-stimulated nonoxidative glucose disposal. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 290-94.
- 38.Koistinen HA, Forsgren M, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Insulin action on expression of novel adipose genes in healthy and type 2 diabetic subjects. *Obesity Research* 2004; **12**: 25-31.
- 39.Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, et al. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87** (12): 5662-7.

Legend to the figures

Fig. 1 –

A - M value from the second (SS1) and third (SS2) hours of the euglycemic hyperinsulinemic clamp adjusted for FFM. * - $p \leq 0.05$ for each group vs. CT group (Mann Whitney test); # - $p \leq 0.05$ for OB-DM vs. OB-NGT and § - $p \leq 0.05$ for OB-DM vs. OB-IGT (Mann Whitney test); ^a - $p \leq 0.05$ for SS2 vs. SS1 in each group (Wilcoxon signed rank). **B - Adiponectin** concentrations at basal state and after 3-h euglycemic hyperinsulinemic clamp. * - $p \leq 0.05$ for each group vs. CT group (Mann Whitney test); # - $p \leq 0.05$ for OB-DM vs. OB-NGT and § - $p \leq 0.05$ for OB-DM vs. OB-IGT (Mann Whitney test); ^a - $p \leq 0.05$ for clamp vs. basal concentration (Wilcoxon signed rank); ^b - $p = 0.06$ for clamp vs. basal concentration (Wilcoxon signed rank). Data are mean $\pm$ SEM.

Fig 2 – A - TNF α ; B - IL-6 and C – CRP – serum concentrations at basal state and after 3-h euglycemic hyperinsulinemic clamp. * - $p \leq 0.05$ for each group vs. CT group (Mann Whitney test); ^a - $p \leq 0.05$ for clamp vs. basal concentration (Wilcoxon signed rank).

Fig 3 – A: M value and B: BMI - simple regression against plasma **adiponectin** concentration in the pooled data of CT, OB-NGT, OB-IGT and OB-DM groups. **r** and **p** from Spearman correlation.

Table 1. Anthropometric and clinical characteristics

	CT	OB-NGT	OB-IGT	OB-DM	p^1 IGT vs NGT	p^2 DM vs NGT
Number (M/F)	5/4	5/10	2/9	2/4	ns	ns
Age (years)	35.4±3.7	36.1±2.2	36.4±2.3	41.3±1.9	ns	ns
BMI (kg/m ²)	22.3±0.6	50.2±2.2 ^a	48.5±2.4 ^b	51.0±3.0 ^b	ns	ns
Waist (cm)	80±3	130±6 ^a	127±6 ^b	140±6 ^b	ns	ns
Fat mass (%)	18±2	44±1 ^a	45±1 ^b	43 ±2 ^b	ns	ns
Lean body mass (kg)*	51.2±2.8	80.1±5.7 ^b	69.4±5.1 ^b	75.0±6.8 ^b	ns	ns
T Cholesterol (mmol/l)	4.3±0.2	4.9±0.4	4.7±0.2	5.0±0.7	ns	ns
HDL-Cholesterol (mmol/l)	1.3±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.0±0.1 ^c	ns	ns
Triglycerides (mmol/l)	0.7±0.1	1.2±0.1 ^b	1.1±0.1 ^c	3.3±1.3 ^b	ns	0.03

p^1 e p^2 - Mann Whitney test; ^a - $p \leq 0.0001$. ^b - $p \leq 0.01$ and ^c - $p \leq 0.05$ vs. CT group - Mann Whitney test.

Table 2. OGTT and clamp data

	CT	OB-NGT	OB-IGT	OB-DM [#]	p^1 IGT vs NGT	p^2 DM vs NGT
Fasting pl. glucose (mM)	4.8±0.2	4.9±0.1	5.6±0.3	8.0±0.6 ^b	0.05	0.001
Fasting pl. insulin (pmol)	60±5	236±58 ^a	170±21 ^b	375±61 ^b	ns	0.04
AUGC (mM/h)	684±48	815±33 ^c	1042±42 ^b	1500±87 ^b	0.0008	0.0005
AUIC (nmol)	41.6±4.3	130.7±31.5 ^b	121.1±18.2 ^b	128.9±35.1 ^c	ns	ns
GOx _{SS2} (μmol/min kg _{FFM})	14.6±1.7	10.2±1.9	9.2±2.7 ^c	2.2±2.3 ^b	ns	0.03
NOGD _{SS2} (μmol/min kg _{FFM})	47.3±3.5	26.1±4.5 ^b	18.6±4.0 ^b	16.4±4.4 ^b	ns	ns
M _{SS1} (μmol/min kg _{FFM})	49±4	27±4 ^b	22±2 ^b	16±3 ^b	ns	ns
M _{SS2} (μmol/min kg _{FFM})	62±4	36±5 ^{b*}	28±4 ^{b*}	19±4 ^{b*}	ns	0.04

AUGC – area under glucose curve (OGTT), AUIC – area under insulin curve (OGTT); GOx – glucose oxidation; NOGD – non oxidative glucose disposal; M_{SS1} and M_{SS2} – M value calculated from 80 to 120 min and from 150 to 180min of insulin infusion; p^1 e p^2 - Mann Whitney test; ^a – p≤0.0001. ^b - p≤0.01 and ^c - p≤0.05; group vs. CT group - Mann Whitney test; * - p≤0.05; SS2 vs. SS1 – Wilcoxon signed rank.

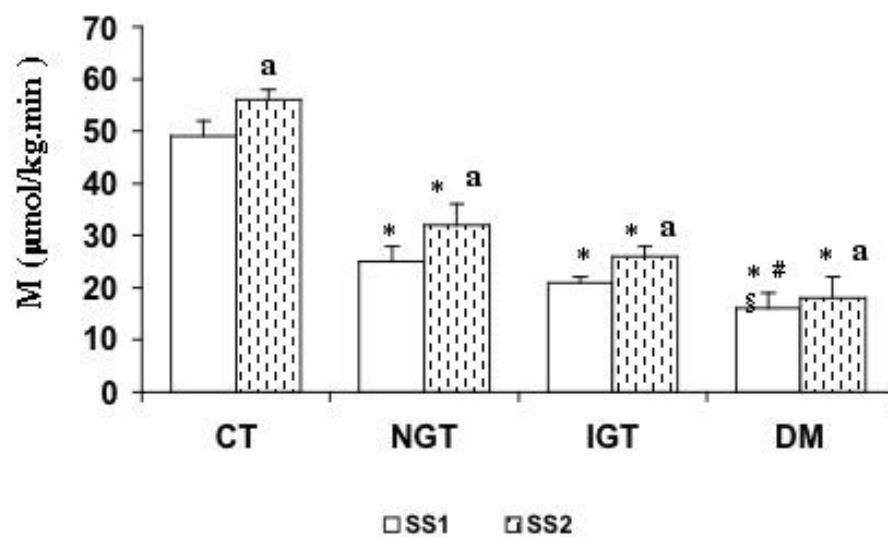
Table 3. Relationship of adipokines with anthropometric and metabolic results in the pooled data of CT and Obese subjects.

	M value*	Adiponectin	TNF- α	IL-6	CRP
BMI	-0.61 ^a	-0.45 ^b	0.36 ^c	0.57 ^b	0.44 ^b
Waist	-0.66 ^a	-0.57 ^b	0.40 ^c	0.61 ^b	0.61 ^b
Fat mass (%)	-0.33 ^c	-0.18	0.25	0.48 ^b	0.57 ^b
FPG	-0.49 ^b	-0.58 ^b	0.08	0.21	0.10
Glucose _{ogtt120min}	-0.69 ^a	-0.69 ^a	0.19	0.26	0.45 ^b
AUGC _{oggt}	-0.65 ^a	-0.69 ^a	0.17	0.18	0.46 ^b
FPI	-0.85 ^a	-0.67 ^a	0.41 ^b	0.38 ^c	0.49 ^b
Insulin _{ogtt120min}	-0.83 ^a	-0.64 ^a	0.120	0.39 ^c	0.45 ^b
AUIC _{oggt}	-0.79 ^a	-0.58 ^b	0.17	0.37 ^c	0.45 ^b
HDL-Cholesterol	0.14	0.51 ^b	-0.11	-0.03	-0.09
GOX _{ss2}	0.48 ^c	0.57 ^b	-0.45 ^b	-0.32 ^c	-0.24
NOGD _{ss2}		0.50 ^b	-0.23	-0.33 ^c	-0.47 ^b
Adiponectin	0.55 ^b				
TNF- α	-0.45 ^b	-0.22			
IL-6	-0.44 ^b	-0.12	0.47 ^b		
CRP	-0.46 ^b	-0.31 [#]	0.28	0.45 ^b	

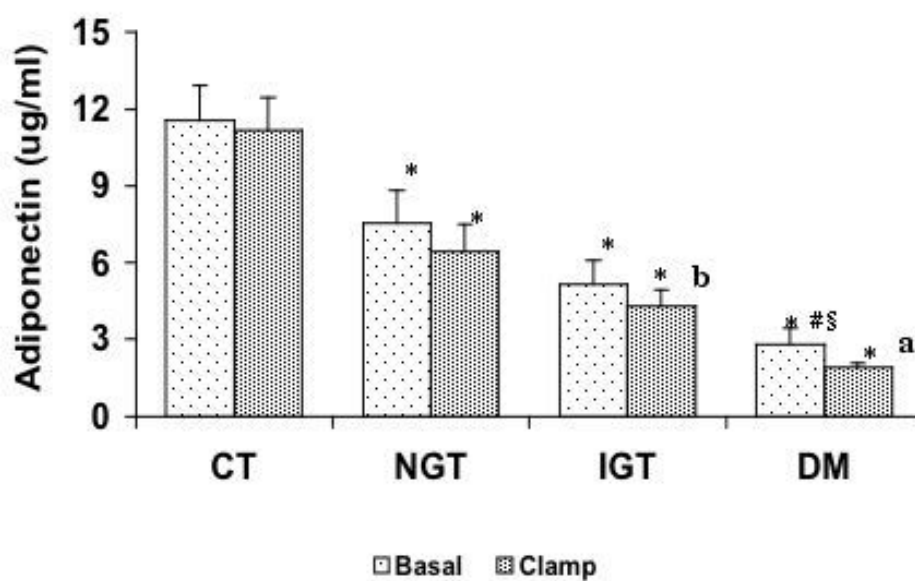
Values are the *rho* results (r) from the Spearman correlation; M value in the second hour of insulin clamp; FPG and FPI – fasting plasma glucose and insulin; AUGC and AUIC – area under glucose or insulin curve during the OGTT; Gox – glucose oxidation; NOGD – non oxidative glucose disposal; SS2 – steady state from 150 to 180min of clamp insulin infusion.

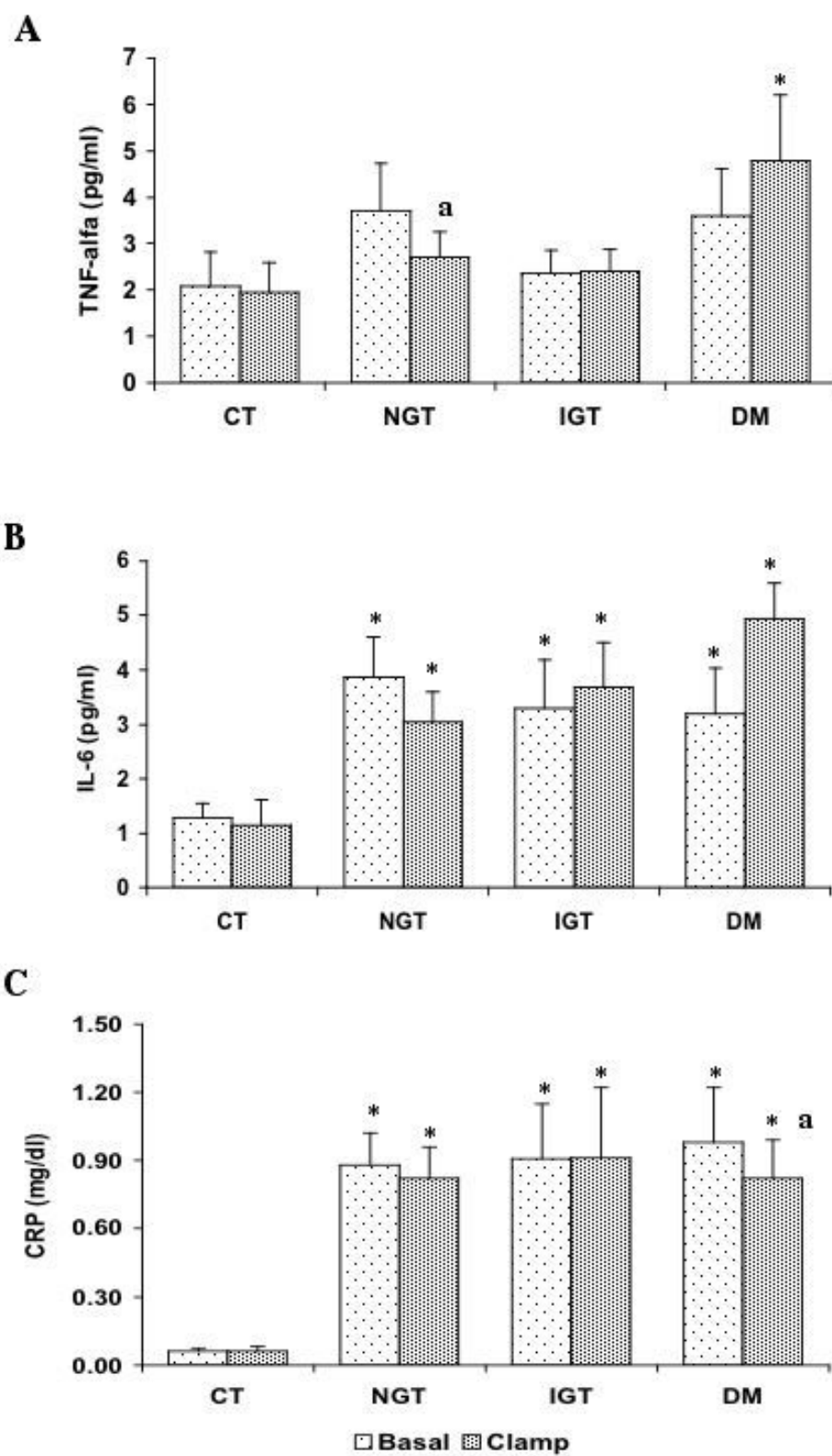
^a - $p \leq 0.0001$; ^b - $p \leq 0.01$; ^c - $p \leq 0.05$ - from Spearman correlation. [#] - $p = 0.06$.

A

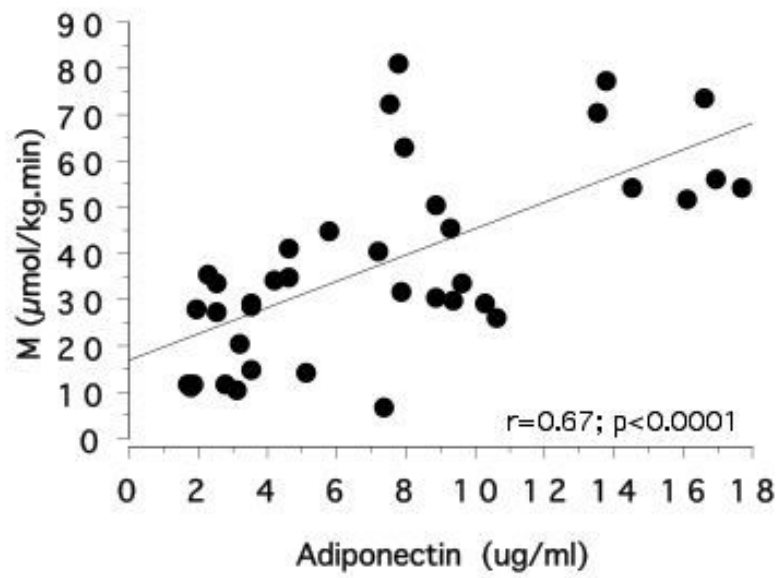


B





A



B

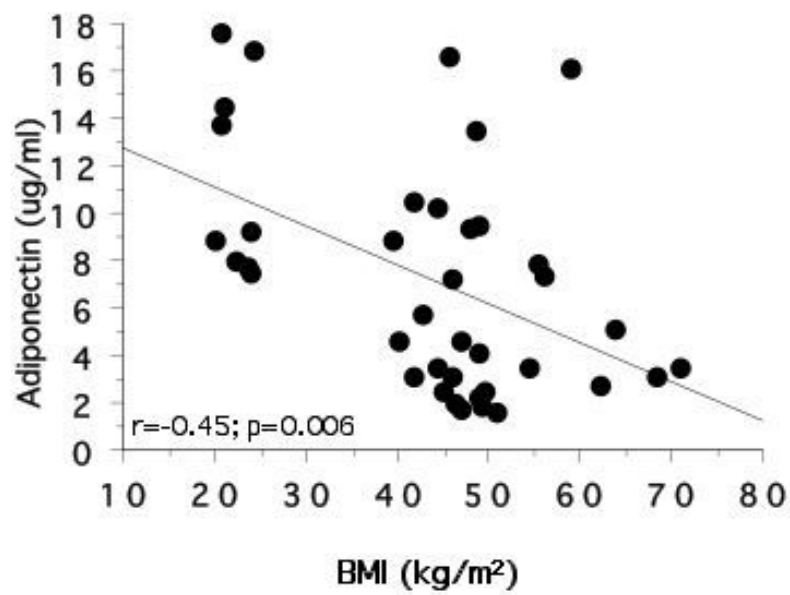


Tabela 12- Citocinas e marcadores inflamatórios no período pré operatório (M±EP)

	CT	OB-NT	OB-IT	OB-DM	p^1 <i>IT vs NT</i>	p^2 <i>DM vs NT</i>	p^3 <i>DM vs IT</i>
Adiponectina _{basal} (ug/ml)	11,6±1,4	7,5±1,3 *	5,5±0,9 *	3,3±0,7 *	<i>ns</i>	0,04	<i>ns</i>
Proteína C _{basal} (mg/dl)	0,06±0,01	0,88±0,14 *	0,99±0,62 *	1,02±0,23 *	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
IL-6 _{basal} (pg/ml)	1,28±0,27	4,07±0,76 *	3,29±0,89 *	3,20±0,37 *	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
TNF- α _{basal} (pg/ml)	2,08±0,73	3,77±1,02 *	2,37±0,48	3,59±1,03	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

* - $p \leq 0,05$ vs. CT - Mann Whitney.

$p^1 p^2 p^3$ comparação intergrupo - Mann Whitney.

Tabela 13– Citocinas e marcadores inflamatórios após o emagrecimento (M±EP).

	CT	PRÉ	PÓS	p^1 <i>Pré vs. CT</i>	p^2 <i>Pos vs. CT</i>	p^3 <i>Pos vs. Pré</i>
Adiponectina _{basal} (ug/ml)	11,6±1,4	7,1±1,1	18,7±2,8	<i>ns</i>	0,05	0,002
Proteína C _{basal} (mg/dl)	0,06±0,01	1,06±0,17	0,16±0,05	<0,0001	<i>ns</i>	0,002
IL-6 _{basal} (pg/ml)	1,28±0,27	3,81±0,54	1,64±0,13	0,001	<i>ns</i>	0,01
TNF- α _{basal} (pg/ml)	2,08±0,73	3,08±0,66	1,71±0,33	0,04	<i>ns</i>	0,004

$p^1 p^2$ comparação intergrupo - Mann Whitney; p^3 comparação intragrupo pré e pós emagrecimento (Wilcoxon signed rank test).

**Insulin Resistance and β -cell function in Severe Obesity: Effect of Weight Loss after
Gastric bypass**

Running Title: Insulin Resistance, Secretion and Gastric Bypass

**Daniela M Marin¹, Sarah Monte Alegre¹, Josiane N M Ortiz¹, José C Pareja², Elinton
A Chaim², Conceição A da Silva¹; Brenno D Astiarraga¹; Amalia Gastaldelli³, Elza
Muscelli¹**

**¹ Department of Internal Medicine, ² Surgery Department, Faculdade de Ciências
Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil; ³Consiglio Nazionale
delle Ricerche, CNR, Pisa; Italy**

Address correspondence to: Elza Muscelli, MD

Department of Internal Medicine

Università di Pisa

Via Roma, 67

56122 Pisa, Italy

Phone: +39 050 993531

Fax: +39 050 553235

muscelli@ifc.cnr.it.

Abstract

Objective: to evaluate the contribution of insulin resistance and impaired β -cell function to glucose tolerance in severe obesity and the effect of massive weight loss (Gastric-bypass) on adaptation insulin secretion/insulin resistance.

Methods and procedures: euglycemic clamp ($3\text{h}\cdot 240\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{m}^{-2}$), indirect calorimetry, IVGTT and OGTT in 34 obese subjects (17NGT, 11IGT; 6type2 diabetic–OB-T2D) and 10 controls. Total (T-ISR), acute (AIR) and fasting insulin secretion rate (f-ISR) were evaluated by C-peptide deconvolution, β -cell glucose sensitivity (β -GS) as dose-response curve ISR-to-glucose and disposition index (DI) as $\text{ISR}\times\text{M}$ -value. 14 patients (11-NGT/3-IGT) were re-evaluated after weight loss (WL).

Results: Oxidative, non-oxidative and whole body glucose disposal were reduced in OB groups (M-value $\sim 30\%$, 60% and 43% of CT). AIR was higher in OB-NGT than CT and reduced in OB-T2D (CT 5378 ± 590 ; OB-NGT 9274 ± 845 ; OB-IGT 6225 ± 597 ; OB-T2D $3893\pm 622\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$); T-ISR was elevated in all obese groups ($\sim 200\%$) while β -GS and DI were decreased in OB-IGT and -T2DM but not in –NGT compared to CT. After WL (BMI= $30.2\pm 1.2\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$), f-ISR and M-value normalized (148 ± 12 to $83\pm 12\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$; 30 ± 3 to $55\pm 4\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; $p<0.05$). The time-course showed a significant decrease of T-ISR, and unchanged AIR. β -GS (from 49 ± 7 to $78\pm 12\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$) and DI increased to levels higher than CT.

Discussion our study demonstrates that 2h-glucose deterioration is related to both impaired β -GS and insulin resistance also in severe obesity and, that WL reduces fasting and post-load insulin secretion, improves insulin resistance and restores the β -cell ability to compensate for insulin resistance.

Key words: *insulin resistance, insulin secretion, weight loss, obesity , gastric bypass*

Introduction

Obesity has been related to a variety of metabolic alterations such as hypertension, diabetes, hyperlipidemia (1,2) and is characterized as a state of hyperinsulinemia and insulin resistance (3,4). Insulin resistance leads to a greater insulin response to a given glucose stimulus and subjects with severe obesity and normal glucose tolerance usually display very important hyperinsulinemia. It is accepted that a progressive fall of insulin sensitivity is accompanied by a rise in insulin secretion in order to compensate for prevailing insulin resistance resulting in an appropriate and constant glucose disposal - *hyperbolic relationship of insulin* (5,6). Therefore, evaluation of insulin secretion should consider the insulin sensitivity to explain how much of β -cell function is adapted for that degree of insulin resistance (7,8). In the progression from normal glucose tolerance to overt diabetes both reduction of β -cell function and progressive decrease in insulin sensitivity play important roles (9-11). One major defect is the loss/decrease in first phase insulin secretion in response to intravenous and oral glucose load already present in IGT (12). β -cell glucose sensitivity and insulin sensitivity seems to be independent determinants of 2h-plasma glucose. Recently, Gastaldelli et al have shown that deterioration of glucose tolerance (i.e. 2h-plasma glucose) not only parallels a progressive impairment in β -cell function but also that the defect is already present in NGT subjects (13). These results have been confirmed by modelling analysis of insulin secretion (14) showing that among the factors that contribute to deterioration of glucose tolerance, the decrease in β -cell glucose sensitivity (i.e. the slope of the dose-response function relating insulin secretion and glucose concentration) appears before the decrease in insulin sensitivity. IGT subjects are also characterized by defective first and second-phase insulin secretion to intravenous and oral glucose load (12,15-16). The ability of β -cell to compensate for the important insulin resistance in severe obese with different degrees of glucose tolerance has not extensively been investigated, so the first aim of this study was to evaluate the relationship of insulin secretion and insulin resistance in severe obese patients with different degrees of glucose tolerance submitted to gastric bypass(GB).

Several studies have shown that weight loss improves insulin sensitivity and glycemic control (17,18) and delays the progression of IGT to diabetes (19). The time course and the method used to loose weight might be important factors modulating the improvement in insulin secretion, like as for insulin resistance (20).

Even if an improvement of insulin resistance/glucose tolerance and a decrease of hyperinsulinemia have been demonstrated after gastric bypass (21-23), the changes of β -cell glucose sensitivity and the relationship between insulin secretion and insulin resistance remains unclear. In this way, the aims of this study were to evaluate the contribution of the insulin resistance and impaired β -cell function to glucose tolerance in severely obese subjects and, in addition, to evaluate the effect of massive weight loss induced by gastric bypass on these parameters and on the adaptation of insulin secretion to insulin resistance.

Research Methods and Procedures

Subjects - 34 obese individuals (17 with normal glucose tolerance - NGT, 11 with impaired glucose tolerance – IGT and 6 type 2 diabetic - OB-T2D) aged 37.3 ± 1.4 , BMI $50.0 \pm 1.5 \text{ kg/m}^2$, from a waiting list for bariatric surgery at University Hospital of UNICAMP were evaluated. As a control group, CT, 11 normal weight subjects, matched for age and sex and with normal glucose tolerance (5M/5F, BMI $22.3 \pm 0.6 \text{ kg/m}^2$, 35 ± 4 years) were included. Exclusion criteria were cardiovascular, hepatic and renal disease and psychiatric disorders. The investigation was approved by the Institutional Review Board of the School of Medical Sciences (State University of Campinas), and all subjects gave informed consent before the study began.

Each subject underwent an OGTT, an IVGTT and a clamp study after an overnight fasting, with one week apart, before the surgery. Two subjects of the CT group, 1 NGT and 1 IGT did not accept to participate in the clamp study, but were included in the other evaluations.

Bariatric Surgery - the obese volunteers were submitted to a Roux-en-Y Gastric bypass with silastic ring surgery, which is based on a combination of restrictive plus malabsorptive mechanisms (24). This surgery technique consists of a 30-ml pouch vertically constructed on the lesser curvature of the stomach and separated from the rest of the stomach by stapling. A silastic ring band is placed loosely around the pouch $\sim 2.0 \text{ cm}$ from its distal point. Reconstruction was by Roux-en-Y gastro-enterostomy with the jejunal limb measuring 150 cm and a biliopancreatic limb of 60 cm from the ligament of Treitz.

Fourteen patients (11 NGT and 3 IGT) participated in the follow-up studies including the IVGTT, the clamp study and the anthropometric measurements after achieve weight stabilization (~ 18 months post surgery) (groups OB-pre and OB-post).

Anthropometric measurements and metabolic studies – in each subject weight and height were evaluated and waist circumference was measured at the umbilicus level. Body composition was measured by electrical bioimpedance with a Biodynamics monitor (Biodynamics 310 - Biodynamics Corp, Seattle, WA, USA).

A 75g *OGTT* was performed in the morning after an overnight fast (12 to 14hs). Venous blood was sampled at 30-minutes intervals for 2 hours for determination of glucose and insulin. Glucose tolerance status was defined according to the revised American Diabetic Association criteria (25).

Each subject underwent an intravenous glucose tolerance test, *IVGTT*: IV bolus of 0.5g of glucose/kg body weight infused in 3 minutes. Blood samples were drawn at 30 and 0 minutes before and 1,3,5,7,10,30 e 60 minutes after the end of glucose infusion (26) for glucose, insulin and C- peptide measurements.

Each subject underwent a *euglycemic-hyperinsulinemic clamp* (3 hours insulin infusion at a rate of $240 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ of body surface) together with indirect calorimetry for the measurement of substrate oxidation carried out on a separate day after an overnight fast (27). A polyethylene catheter was inserted into an antecubital vein for the infusion of insulin and glucose. Another catheter was inserted retrograde into a wrist vein, and the hand was placed in a heated box ($\sim 60^\circ \text{C}$) to allow the sampling of arterialized blood (28). During the insulin infusion, glucose was measured at 5 to 10min intervals, and plasma glucose was maintained with a variable glucose infusion. Venous samples for insulin and free fatty acids were obtained before and at 30-minutes intervals during insulin infusion. Glucose oxidation was evaluated by indirect calorimetry during the basal period and during the insulin clamp, using a computerized, continuous open-circuit system with a canopy (Metabolic Cart Horizon; Vmax; SensorMedics; Yorba Linda; CA). Urine was collected throughout the basal and clamp periods for the measurement of non-protein urinary nitrogen excretion.

Analytical procedures - Plasma glucose was measured by the glucose oxidase technique (Beckman Glucose Analyzer). Plasma concentrations of insulin and C-peptide were measured by radioimmunoassay (Linco Research, St.Louis, MO, USA), using specific kits for human insulin (less than 0.2% cross-reactivity with proinsulin) and C-peptide.

Data Analysis - Whole-body insulin-mediated glucose disposal (M value) was calculated from the infusion rate of exogenous glucose from 150 to 180 minutes of insulin clamp, after correction for changes in the glucose levels considering a distribution volume of 250ml/kg. The M value was normalized per kilogram of fat free mass

($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kgFFM}^{-1}$). Glucose oxidation (GOx) was calculated from the carbon dioxide release and oxygen consumption, measured by the calorimetry and nitrogen urinary excretion and non-oxidative glucose disposal (NOGD) was calculated as the difference between the whole body glucose uptake and net glucose oxidation (29). Post hepatic insulin clearance was calculated from the clamp as the ratio of the exogenous insulin infusion rate to the difference of steady-state plasma and fasting insulin concentration (Ins Clear=IR/(SSPI-FPI*0.5)).

Insulin secretion (ISR) was evaluated during intravenous glucose tolerance tests using the deconvolution of C peptide (31). Using the model we calculated fasting insulin secretion rate (f-ISR), first phase (acute ISR- AIR) and total insulin secretion (T-ISR). The total area under time concentration curve (AUC) was calculated by trapezoidal rule; the insulinogenic index as the ratio of the insulin concentration increment to the glucose concentration increment at 30 min into the OGTT. The acute phase response, AIR, to intravenous glucose, IVGTT, was considered from 0 to 10 minutes after glucose bolus (30). The second phase was calculated as the mean of total insulin concentration at 10, 30 and 60 minutes. The β -cell glucose sensitivity (β -GS) was calculated as the mean slope of the dose-response insulin secretion to glucose concentration curve. The β -cell ability to compensate for insulin resistance was estimated by calculating the product of the M-value by the insulinogenic index or by incremental_AUC-I/incremental_AUC-G ratio from the OGTT and, by M-value multiplied by AIR or by T-ISR from the IVGTT (analogous of the adaptation index AI and the disposition index, DI) (5,6).

Statistical Analysis - All data are given as mean $\pm$ SE. When a Kruskal Wallis test demonstrated statistical significance among all groups, the Mann-Whitney test was used for nonparametric evaluation of differences between 2 groups. Wilcoxon signed rank test was used to test treatment-induced changes and ANOVA for repeated measures analysis. Simple and multiple regressions were carried out by standard techniques, and the results were expressed as partial correlation coefficients (r). Statistical significance was considered when p value ≤ 0.05 .

Results

Baseline studies Obese subjects were grouped according to glucose tolerance (OB-NGT, OB-IGT, OB-T2D) and compared to NGT non obese subjects (controls, CT). The three obese subgroups were paired for sex, BMI and body composition, fat and fat free mass, which were widely higher than those of control subjects (**Table 1**). As expected, the obese subjects compared to the controls were hyperinsulinemic both at fasting state and after oral or IV glucose stimulus (**Table 2**). Among the obese groups, the highest fasting serum insulin was measured in OB-T2D, while the insulin response during the OGTT was similarly increased in all obese subgroups. As expected fasting plasma glucose was similar in OB-NGT and -IGT, but higher in OB-T2D. After glucose ingestion the glycaemia rose progressively from CT through OB-NGT, -IGT and -T2D subgroups.

The insulin secretion rate (ISR), calculated by C-peptide deconvolution of the IVGTT data, demonstrates different patterns of insulin secretion: while fasting ISR was twice higher in OB-NGT and -IGT and 4 times in OB-T2D as compared to the CT group (Table 2), a progressive reduction of the first phase and an increase of the second phase was evident from controls to NGT, IGT and diabetic obese subjects. In particular, as glucose tolerance deteriorated AIR was blunted in OB-IGT and in OB-T2D the insulin response was even delayed (**Fig 1A-B**). The β -cell glucose sensitivity resulted increased in OB-NGT, decreased in the OB-IGT group and near 0 in the OB-T2D (**Fig 1C**).

During the euglycemic-hyperinsulinemic clamp studies, steady state plasma glucose and insulin concentrations were similar in all groups (glucose: CT=5.1 $\pm$ 0.2; NGT=4.9 $\pm$ 0.1; IGT=5.1 $\pm$ 0.2 and OB-T2D=5.7 $\pm$ 0.2 mmol/l, p=ns; insulin: CT=835 $\pm$ 50; NGT=1033 $\pm$ 77; IGT=858 $\pm$ 79 and OB-T2D=1176 $\pm$ 148 pmol/l, p=ns). The obese subjects were strongly insulin resistant, for both, GOx and NOGD with the lowest values observed in the diabetics (**Fig 2A**). The post hepatic insulin clearance was reduced only in the OB-T2D group: CT=308 $\pm$ 2; NGT=274 $\pm$ 16; IGT=330 $\pm$ 30 and OB-T2D=253 $\pm$ 24ml $\cdot$ min⁻¹ $\cdot$ m⁻². In contrast, the insulinogenic index and the incremental AUC-I/AUC-G ratio were increased in NGT subjects and normal in IGT and OB-T2D (Table 2). Regarding the ability of insulin secretion to compensate for the insulin resistance, the disposition indexes calculated using

the AIR and T-ISR were reduced in OB-IGT and OB-T2D but not in OB-NGT, as well as both, the insulinogenic index and incremental AUC-I/AUC-G ratio, multiplied by M value (**Fig. 2 B-C**).

OB-post – studies after bariatric surgery and body weight reduction

Fourteen non-diabetic subjects out of 28 participated to the follow-up. Eighteen months (mean) after surgery, body weight was significantly reduced (~40%), mainly due to a fat mass reduction (~38%) but also to a fat free mass loss (~18%). However, the patients were still obese (BMI = $30.2 \pm 1.2 \text{ kg m}^{-2}$) (**Table 3**). The FPG, FPI and the fasting ISR decreased to levels similar to those. The ISR time-course evidenced a significant decrease particularly of the second phase, with intermediate results between CT and OB-pre (**Fig 3A-B**). The acute insulin secretion that was higher than CT was unchanged. However, β -cell glucose sensitivity increased to levels higher than CT (**Fig 3C**). At the same time insulin sensitivity, both as GOx and NOGD, improved reaching values similar or slightly lower than those measured in the CT group (**Fig. 4A**) and the post hepatic insulin clearance became higher than CT (OB-post = 433 ± 48 , $p=0.005$ vs. OB-pre = 281 ± 19 and $p=0.04$ vs. CT = $308 \pm 21 \text{ ml min}^{-1} \text{ m}^{-2}$). In this way, we observed an improvement of the disposition index (**Fig. 4B**). Fasting FFA decreased (CT = 0.74 ± 0.17 ; OB-pre = 1.08 ± 0.18 ; $p=0.03$ vs. CT; OB-post = $0.96 \pm 0.07 \text{ mol/l}$; $p=0.02$ vs. CT; $p=\text{ns}$ vs. OB-pre) while the FFA suppression under insulin infusion was similar.

Relationships

In the pooled baseline data of obese and CT subjects, the expected relationships of M-value with other metabolic variables were observed: BMI, waist, % body fat, fasting and stimulated insulin secretion, 2-h plasma glucose and AUC-G ($r=-0.61$, -0.66 , -0.33 , -0.77 , -0.77 , -0.63 , -0.71 and -0.66 respectively; all $p<0.001$). The β -cell glucose sensitivity was indirectly related only to fasting (-0.31 ; $p=0.05$) and stimulated plasma glucose concentrations, both during OGTT ($r=-0.47$) and IVGTT ($r=-0.50$), but not to the M-value or anthropometric measures. The 2h plasma glucose, as an indicator of glucose tolerance, was directly related to BMI ($r=0.40$) and waist ($r=0.57$), and inversely related to M-value

and β -cell glucose sensitivity (all $p < 0.05$). In a multiple regression model including the above parameters, the age, M-value and β -GS remained independently associated to 2h-glucose ($r = 0.87$; $p < 0.0001$). In the follow-up studies the variation of f-ISR *vs.* baseline studies was related to variations of both β -GS and BMI (both $p < 0.05$). In addition, the variations of AIR and of T-IS were related only to the variations of β -GS ($p < 0.01$).

Discussion

The present study evaluated the contribution of insulin resistance and impaired β -cell function to glucose tolerance in severely obese subjects and, the effect of massive weight loss (~40%; about 18 months later) induced by gastric bypass on these parameters and on the adaptation of insulin secretion to insulin resistance. The results demonstrated an interruption of the cross talk of β -cell and peripheral tissues of subjects with severe obesity inducing a progressive deterioration of glucose homeostasis until type 2 diabetes that was, at least in part, restored after weight loss. Of note is that the improvement of β -cell function was mainly explained by an improvement of the β -cell glucose sensitivity. The novelties of this study were the large cohort analyzed, before and after weight loss induced by gastric bypass and the evaluation of insulin resistance and insulin secretion using gold standard methods.

According to our findings, at baseline all severely obese subjects displayed a greater fasting and post-load insulin response in both OGTT and IVGTT studies compared to controls. However, despite the high insulin secretion, as glucose tolerance decrease from NGT to IGT and diabetes there was a lower first phase insulin response, a rise in second phase and a decrease in β -cell glucose sensitivity, that characterizes a disruption of β -cell ability to compensate for insulin resistance especially in IGT and diabetic obese patients. In OB-T2D insulin secretion was increased at fasting and despite a reduced posthepatic insulin clearance, the total response to the IVGTT was similar to the other obese groups. In addition, the AIR was markedly reduced compared to OB-NGT and -IGT. This is in accordance with the results previously reported in less obese subjects (13,14) showing that it is not important the total amount of insulin secreted rather the ability of beta-cell to compensate for the overcoming hyperglycemia. The β -cell defect in our study was further demonstrated in OB-IGT and OB-T2D subjects by the decreased insulinogenic index and the ratio insulin/glucose incremental areas from OGTT and AIR from IVGTT, all of them corrected by actual insulin resistance. In fact, OB-NGT individuals maintained insulinogenic and disposition indexes similar to controls due their increased AIR. The failure of compensation was observed even after oral glucose when the release of incretin hormones like GLP-1 and

GIP could be stimulated and compensate for. In this way, it is important to remember that GLP-1 and GIP release has been reported as reduced in OB-T2D and even in OB-IGT subjects (32-34).

The obese volunteers also displayed insulin resistance with reduced M-value compared to CT subjects, and reduced oxidative but particularly non-oxidative glucose disposal.

The follow-up studies demonstrated that a massive weight loss was associated to improvement in insulin sensitivity and reduction of fasting insulin secretion to normal levels even if the mean BMI was still around 30kg/m². The AIR before weight loss was higher than CT and did not change after surgery, while the second phase insulin secretion decreased to values similar to the CT group. The insulin sensitivity improvement was mainly due to an increase of non-oxidative glucose disposal as well of insulin clearance, that is in agreement with a previous study of our group and others (21,35).

Our follow-up group study was composed of non-diabetic subjects, mainly by NGT and a few IGT subjects. The small group of IGT showed, after weight loss, an improvement in first phase insulin secretion (data not shown), to levels similar to those observed in NGT subjects before surgery, this increase in insulin secretion despite a better insulin sensitivity is probably related to an improved β -cell glucose sensitivity. These results in IGT subjects are in agreement with those of Polyzogopoulou et al in type 2 diabetics subjects (36). Similar changes of insulin secretion were reported by Letiexhe et al (37), using Bergman's model, in non-diabetic women reaching normal BMI after gastropasty. In our study the initial BMI was higher (~50 vs. 38kg.m⁻²) and the final one was in the obese range. The type of bariatric surgery also can influence the IS through different mechanisms.

The modification of β -cell glucose sensitivity was important and reached values higher than those of the lean subjects: it added to the improved insulin sensitivity, explaining the improvement of the disposition index. In this way, the weight loss seems to be associated to both, improved insulin sensitivity and β -cell glucose sensitivity and, in

addition to a maintained high AIR (in NGT group), explaining the increase of the disposition index. The maintained high AIR after weight loss could be attributed to inherent hyperactivity of β -cell function (10).

The mechanisms by which insulin resistance, insulin secretion and the adaptive β -cell glucose response improved after massive weight loss were not investigated in the present study. While at baseline studies insulin resistance was associated and mainly determined by obesity, impaired insulin secretion was independent of obesity and waist circumference (a proxy of central body fat distribution). In this way, the impairment of insulin secretion and the disruption of the cross-talk between β -cell and peripheral tissues, at the baseline studies, seem to be determined by other factors than the amount of obesity itself. In the severe obese patients evaluated, the deterioration of glucose tolerance seems to be dependent and worsened by both insulin resistance and impaired β -cell function, as seen by Mari et al (38). Glucose toxicity does not seem to be important in these subjects since before surgery all they had AUC-G near normal.

An increase in the incretin hormones was described in obese subjects after BPD (39) and GB (40) and is related to the reversibility of type 2 diabetes. One mechanism by which these hormones increase insulin secretion is through an improvement of β -cell glucose sensitivity (41). So the increased incretin effect can be one possible explanation to the improved glucose sensitivity and consequently insulin secretion if this effect is maintained over time.

A harmful effect of FFA on insulin resistance and secretion has been described in experimental studies and also in humans (42,43). In this particular group, the fasting plasma FFA concentration was higher and was less suppressed under insulin infusion than in CT. These alterations were reduced by weight loss, but did not until normalization. In this way, an effect of the FFA reduction on both insulin resistance and secretion cannot be excluded.

In conclusion, our study demonstrates that deterioration of glucose tolerance (2h-glucose) is related to both impaired β -cell glucose sensitivity and insulin resistance also in severe obesity despite elevated insulin secretion rates and, that the improvement after weight loss is related to reduced fasting and post load insulin levels and that the β -cell ability to compensate for insulin resistance is restored.

Acknowledgements – Financial support: FAPESP, SP, Brazil.

References

1. Ashley FW, Kannel WB. Relation of weight change to changes in atherogenic traits: the Framingham study. *J Chronic Dis*. 1974;27:103–14.
2. Mokdad, Ford ES, Bowman BA et al. Prevalence of obesity, diabetes and obesity-related health risk factors *JAMA* 2003; 289(1):76-9.
3. Perley MJ, DM. Kipnis. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *Gun. Invest*. 1967;46: 1954-62.
4. DeFronzo RA, Bonadonna RG, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. 1992;151:318-68.
5. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. *Diabetes*. 1993; 42:1663-72.
6. Ahrén B, Pacini G. Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta-cell function in clinical studies. *Eur J Endocrinol*. 2004;150:97-104.
7. Bergman RN, Ader M, Huecking K, Van Citters G. Accurate assessment of beta-cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes*. 2002; 51 (S1):S212-20.
8. Mari A, Ahrén B, Pacini G. Assessment of insulin secretion in relation to insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005; 8:529-33.
9. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KGMN. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabet Med*. 2002; 19:708-23.

10. Ferrannini E, Camastra S, Gastaldelli A et al. Beta-Cell function in obesity. Effects of weight loss. *Diabetes*. 2004; 53(S3):S26-33.
11. Kitabchi AE, Tempresa M, Knowler WC et al. The Diabetes Prevention Program Research Group. Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin. *Diabetes*. 2005;54:2404-14.
12. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care*. 2006;29:1130-39.
13. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, DeFronzo RA. San Antonio Metabolism study: beta-cell dysfunction and glucose intolerance: results from the San Antonio Metabolism (SAM) study. *Diabetologia*. 2004;47:31-39.
14. Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. β -cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(1):493-500.
15. Efendic S, Cerasi E, Luft R. Quantitative study on the potentiating effect of arginine on glucose-induced insulin response in health, prediabetic, and diabetic subjects. *Diabetes*. 1974;23:161-71.
16. Novoa FJ, Boronat M, Saavedra P et al. Differences in cardiovascular risk factors, insulin resistance, and insulin secretion in individuals with normal glucose tolerance and in subjects with impaired glucose regulation: the Telde Study. *Diabetes Care*. 2005;28:2388-93.

17. UK prospective diabetes study 7: Response of fasting plasma glucose to diet therapy in newly presenting type II diabetic patients. UKPDS Group. *Metabolism*. 1990;39(9):905-12.
18. Sjöström CD, Lissner L, Wedel H, Sjöström L. Reduction in incidence of diabetes, hypertension and lipid disturbances after intentional weight loss induced by bariatric surgery: the SOS Intervention Study. *Obes Res*. 1999;7:477–84.
19. Reduction in the Incidence of Type2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. Diabetes Prevention Program Research Group. *N Engl J Med*. 2002;346:393-403.
20. Muscelli E, Mingrone G, Camastra S et al. Differential effect of weight loss on insulin resistance in surgically treated obese patients. *Am J Med*. 2005;118(1):51-7.
21. Pereira JA, Lazarin MACT, Pareja JC, Souza AL, Muscelli E. Insulin resistance in nondiabetic morbidly obese patients: effect of bariatric surgery. *Obes Res*. 2003;11:1495-501.
22. Korner J, Bessler M, Cirilo LJ et al. Effects of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on Fasting and Postprandial Concentrations of Plasma Ghrelin, Peptide YY, and Insulin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:359–65.
23. Shah M, Simha V, Garg A. Long-term impact of bariatric surgery on body weight, comorbidities and nutritional status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4223-31.
24. Fobi MAL, Lee H, Igwe D, et al. Revision of failed gastric bypass to distal Roux-en-Y gastric bypass: a review of 65 cases. *Obes Surg*. 2001;11:190-5.
25. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20: 1183-97.

26. Hansen BC, Bodkin NL. Standardization of IVGTT. Importance of method used to calculate glucose disappearance. *Diabetes Care*. 1993;16(5): 847.
27. DeFronzo, RA, Tobin, JD, Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance *Am J Physiol*. 1979;237:E214-23.
28. McGuire EAH, Heldermaun, JH, Tobin, JD, Andres, R, Berman, M. Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man *J Appl Physiol*. 1976; 41:1312-18.
29. Ferrannini, E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism*. 1988;37/3:287-301.
30. Chen M, Porte D Jr. The effect of rate and dose of glucose infusion on the acute insulin response in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976;42:1168-75.
31. Polonsky KS, Rubenstein AH. C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin: pitfalls and limitation. *Diabetes*. 1984;33: 486-94.
32. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W: Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1986;29:46 –54.
33. Vilsboll T, Holst JJ: Incretins, insulin secretion and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2004;47:357-66.
34. Muscelli E, Mari A, Natali A et al. Impact of incretin hormones on β -cell function in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 291: E1144-50.
35. Franssila-Kallunki A, Rissanen A, Ekstrand A, Ollus A, Groop L. Effects of weight loss on substrate oxidation, energy expenditure, and insulin sensitivity in obese individuals. *Am J Clin Nutr*. 1992;55:356-61.

36. Polyzogopoulou EV, Kalfarentzos F, Vagenakis AG, Alexandrides TK. Restoration of euglycemia and normal acute insulin response to glucose in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery. *Diabetes*. 2003;52:1098-103.
37. Letiexhe MR, Scheen AJ, Gérard PL, Desai C, Lefévre PJ. Postgastroplasty recovery of ideal body weight normalizes glucose and insulin metabolism in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:364-69.
38. Mari A, Manco M, Guidone C et al. Restoration of normal glucose tolerance in severely obese patients after bilio-pancreatic diversion: role of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia*. 2006;49(9):2136-43.
39. Guidone C, Manco M, Valera-Mora E et al. Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. *Diabetes*. 2006;55:2025-31.
40. Patrìti A, Facchiano E, Sanna A, Gulla N, Donini A. The enteroinsular axis and the recovery from type 2 diabetes after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2004;14:840-48.
41. Ahren B, Holst JJ, Mari A. Characterization of GLP-1 effects on β -cell function after meal ingestion in humans. *Diabetes Care*. 2003;26:2860-64.
42. Boden G. Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997;46(1): 3-10.
43. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW et al. Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance Is Associated With Activation of Protein Kinase C and Alterations in the Insulin Signaling Cascade. *Diabetes*. 1999;48: 1270-74.

Table 1 – Anthropometric characteristics at baseline.

	CT	OB-NGT	OB-IGT	OB-T2D	<i>p</i> ¹ <i>IGT vs NGT</i>	<i>p</i> ² <i>DM vs NGT</i>	<i>p</i> ³ <i>DM vs IGT</i>
Number (M/F)	10 (5/5)	17 (6/11)	11 (3/8)	6 (2/4)	ns	ns	ns
Age (yr)	35±4	35±2	38±2	41±2	ns	0.05	ns
BMI (kg m ⁻²)	22.3±0.6	50.1±1.9*	48.3±2.4*	51.0±3.0*	ns	ns	ns
Waist (cm)	80±3	130±6*	129±6*	140±6*	ns	ns	ns
Body fat (%)	18.1±1.6	44.4±0.9*	43.8±1.2*	43.4±1.8*	ns	ns	ns
Free fat mass (kg)	51.2±2.8	79.0±5.4*	71.8±5.4*	75.0±6.8*	ns	ns	ns

* – p≤0.01 vs. CT – nonparametric Mann-Whitney test;

*p*¹, *p*² and *p*³ - comparison between obese subgroups - nonparametric Mann-Whitney test.

Table 2 – Metabolic characteristics of the CT group and OB groups at baseline

	CT	OB-NGT	OB-IGT	OB-T2D	p^1 IGT vs NGT	p^2 DM vs NGT	p^3 DM vs IGT
OGTT							
FPG (mmol·l ⁻¹)	4.8±0.1	5.0±0.2	5.6±0.3	6.7±0.5 *	ns	0.001	0.007
FPI (pmol·l ⁻¹)	61±4	221±56 *	154±19 *	357±94 *	ns	ns	0.03
PG _{120min} (mmol·l ⁻¹)	5.2±0.3	6.4±0.2 *	9.2±0.4 *	13.8±0.4 *	<0.0001	0.0004	0.0009
AUC-G (mmol·l ⁻¹ ·2h ⁻¹)	684±42	817±29 *	1084±45 *	1500±87 *	0.0003	0.0004	0.002
AUC-I (mmol·l ⁻¹ ·2h ⁻¹)	45.7±5.8	130.1±27.7 *	120.5±20.1 *	128.9±35.1 *	ns	ns	ns
Insulinogenic Index (pmol·mmol ⁻¹)	295±110	459±77 #	257±42	170±68	ns	0.01	ns
ΔAUC-I/ΔAUC-G (pmol·mmol ⁻¹)	-152±774	555±121 *	237±36	152±58	(0.06)	0.02	ns
IVGTT							
f-ISR (pmol·min ⁻¹ ·m ⁻²)	75.7±8.5	159.2±16.4 *	199.7±20.0 *	305.9±36.2 *	ns	0.004	0.03
AIR (pmol·m ⁻²)	5378±590	9274±845 *	6225±597	3893±622	0.02	0.002	0.01
T-ISR (nmol·m ⁻²)	20.2±1.95	39.2±3.6 *	39.2±2.5 *	37.1±4.5 *	ns	ns	ns

OGTT – oral glucose tolerance test; IVGTT – intravenous glucose tolerance test; FPG, FPI – fasting plasma glucose and fasting plasma insulin; ΔAUCG and ΔAUCI – incremental areas under the glucose and insulin curves; f-ISR – fasting insulin secretion rate; AIR – acute insulin secretion rate (0 to 10 min); T-ISR – Total insulin secretion rate (0-60min).

* - $p \leq 0,05$ vs. CT – nonparametric Mann-Whitney test; # $p = 0.06$ vs. CT

p^1 , p^2 and p^3 - comparisons between obese subgroups - nonparametric Mann-Whitney test.

Table 3 – Anthropometric and metabolic characteristics after weight loss.

	CT	OB pre	OB post	p ¹ <i>pre vs. CT</i>	p ² <i>post vs. CT</i>	p ¹ <i>post vs. pre</i>
Number (M/F)	10(5/5)	14(4/10)	14(4/10)			
NGT/IGT/D	10/0/0	11/3/0				
Age (yr)	35±4	37±2	40±2	ns	ns	0.0005
BMI (kg m ⁻²)	22.3±0.6	49.6±2.2	30.1±1.2	0.0001	0.0005	0.0007
Waist (cm)	80±3	130±6	91±4	0.0002	0.07	0.02
Body fat (%)	18.1±1.6	44.7±1.1	27.7±1.9	0.0001	0.004	0.0007
Fat free mass (kg)	51.2±2.8	76.2±5.1	60.3±3.8	0.0006	ns	0.0007
FPG (mmol l ⁻¹)	5.1±0.2	4.8±0.1	4.5±0.1	0.04	0.03	0.001
FPI (pmol l ⁻¹)	59±3	181±24	54±7	0.0002	ns	0.001
IVGTT						
f-ISR (pmol min ⁻¹ m ⁻²)	75.7±8.5	148.1±11.8	83.0±11.8	0.0003	ns	0.001
AIR (pmol m ⁻²)	5378±590	8674±940	7889±1007	0.01	0.06	ns
T-ISR (nmol m ⁻²)	20.23±1.95	37.98±3.72	29.63±3.17	0.001	ns	0.03

p¹ and p² - nonparametric Mann-Whitney test; p³ – Wilcoxon signed rank test;

IVGTT – intravenous glucose tolerance test; FPG, FPI – fasting plasma glucose and fasting plasma insulin; f-ISR – fasting insulin secretion rate; AIR – acute insulin secretion rate (0 to 10 min); T-ISR – total insulin secretion rate (0-60min).

p¹ and p² - nonparametric Mann-Whitney test; p³ – Wilcoxon signed rank test.

Figure legends

Fig 1 – Baseline IVGTT. **A:** ISR curves; OB-NGT, OB-IGT and OB-T2D vs. CT - $p=0.04$; $p<0.0001$ and $p<0.0001$ (interaction group/time course by ANOVA for repeated measures). **B:** Areas under AIR and T-ISR curves. **C:** β -cell glucose sensitivity. * - $p<0.05$ vs. CT; # - $p<0.05$ vs. OB-NGT group.

Fig 2 – Baseline Euglycemic hyperinsulinemic clamp. **A:** M value; Glucose oxidation (GOx) and Non-oxidative glucose disposal. **B:** Disposition index first phase $=AIR_{ivgtt} * M\text{-value}_{clamp}$ and $total_{ivgtt}=T\text{-ISR} * M\text{-value}$. **C:** Y_1 axis - Insulinogenic $index_{ogtt} * M\text{-value}$ and Y_2 axis - incremental $AUC\text{-I}/AUC\text{-G}_{ogtt} * M\text{-value}$. * - $p<0.05$ vs. CT; # - $p<0.05$ vs. OB-NGT group; + - $p<0.05$ vs. OB-IGT group.

Fig 3 – IVGTT after weight loss induced by gastric bypass. **A:** ISR curves of CT group and OB-pre and Ob-post weight loss. **B:** Areas under AIR and T-ISR curves. **C:** β -cell glucose sensitivity. * - $p<0.05$ vs. CT; § - $p<0.05$ – OB-post vs. OB-pre.

Fig 4 –Euglycemic hyperinsulinemic clamp after weight loss induced by gastric bypass. **A:** M value; Glucose oxidation (GOx) and Non-oxidative glucose disposal. **B:** Disposition index first phase $=AIR_{ivgtt} * M\text{-value}_{clamp}$ and $Total_{ivgtt}=T\text{-ISR} * M\text{-value}$. § - $p<0.05$ – OB-post vs. OB-pre.

Fig 1

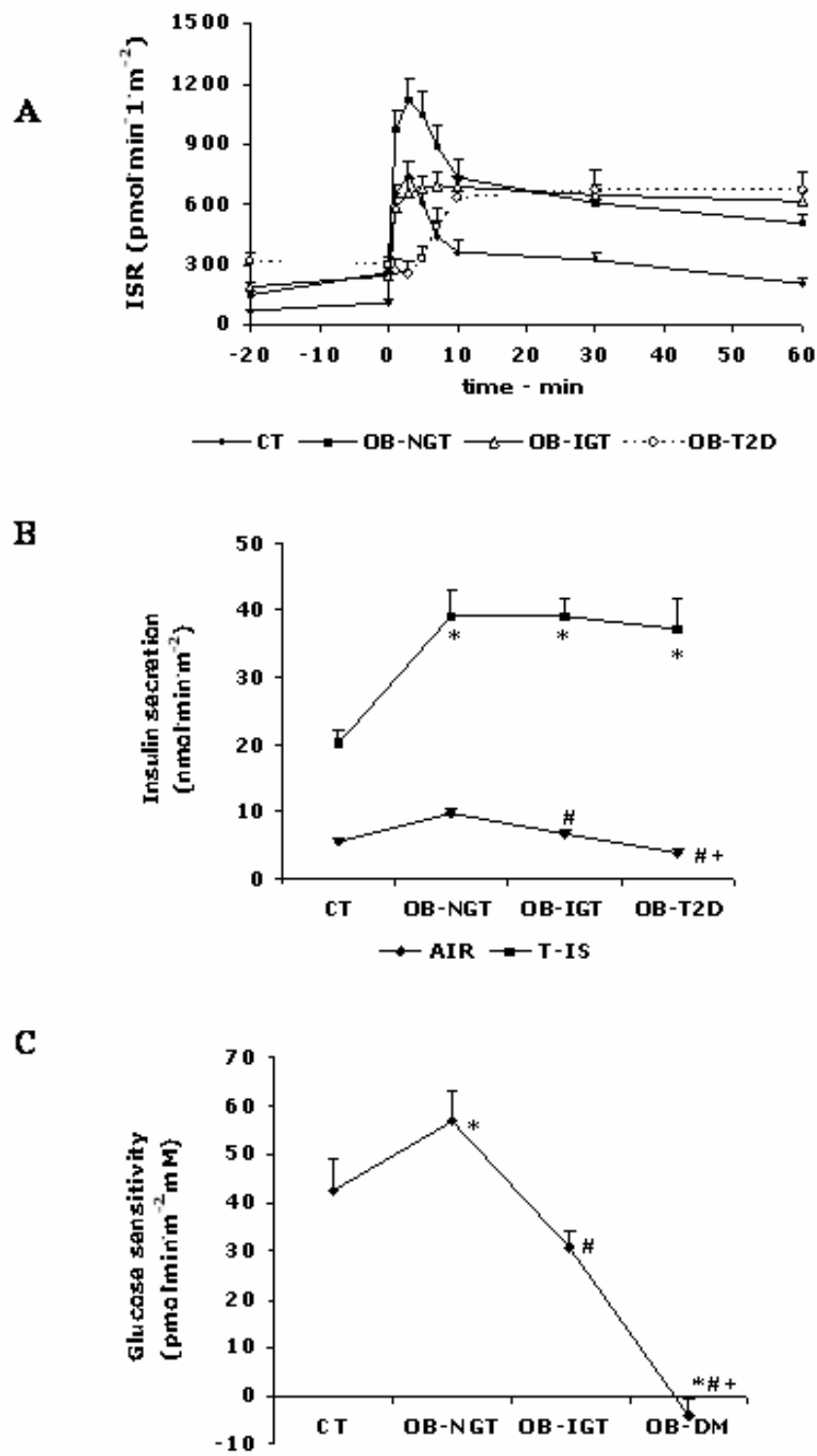


Fig 2

A

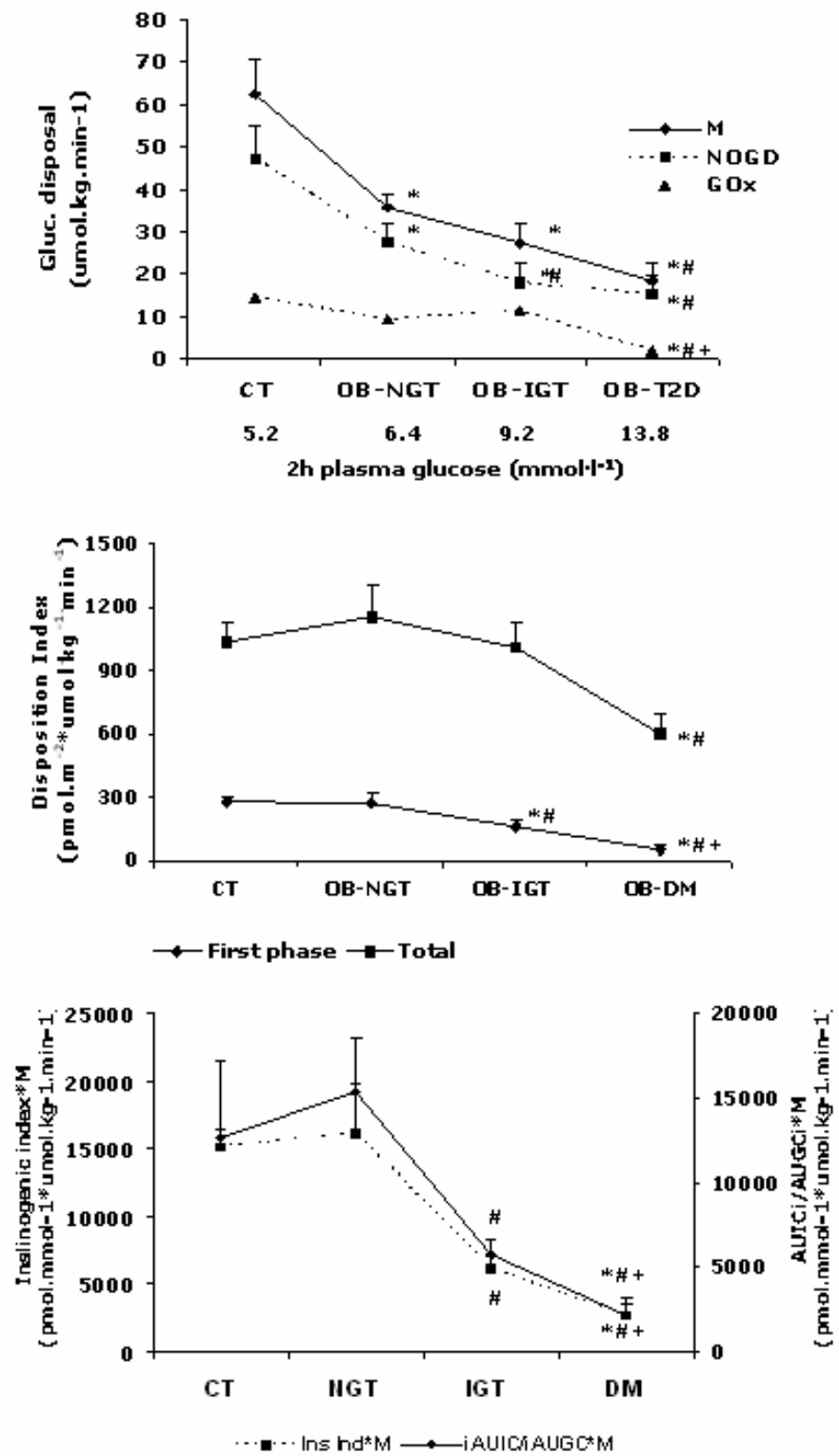
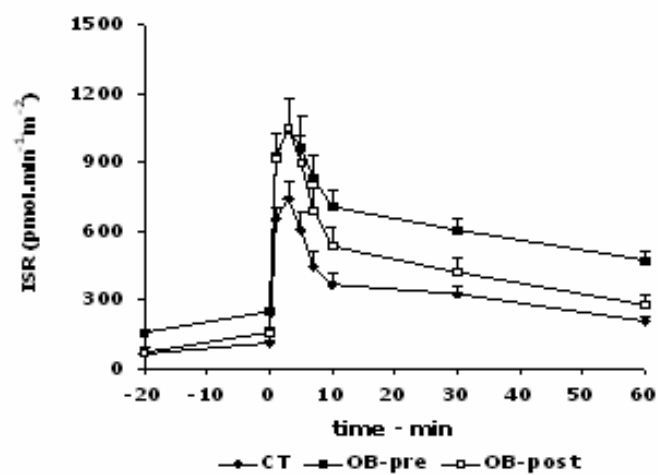
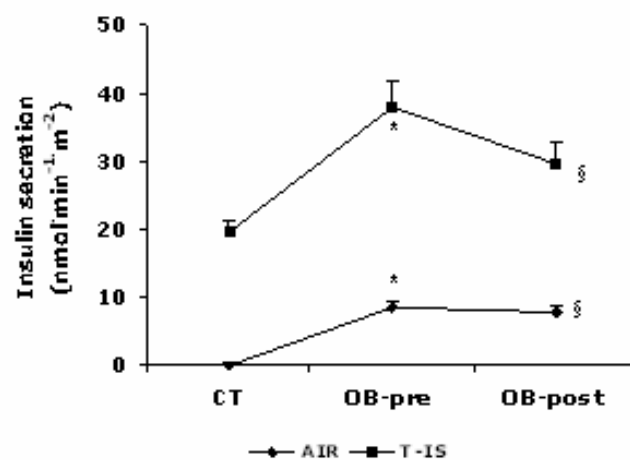


Fig. 3

A



B



C

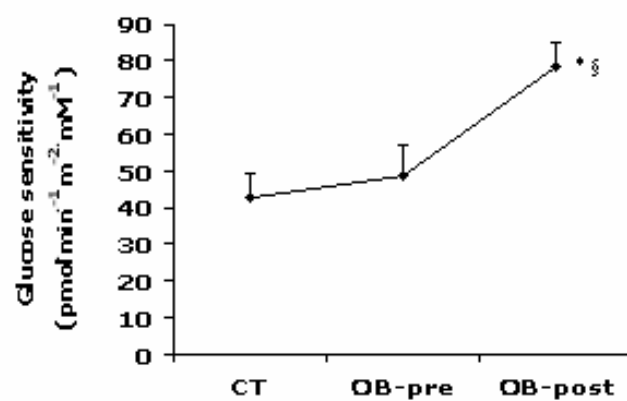
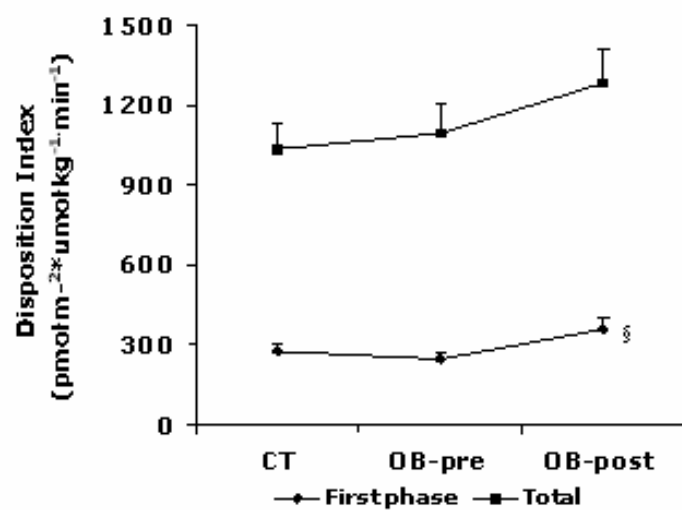
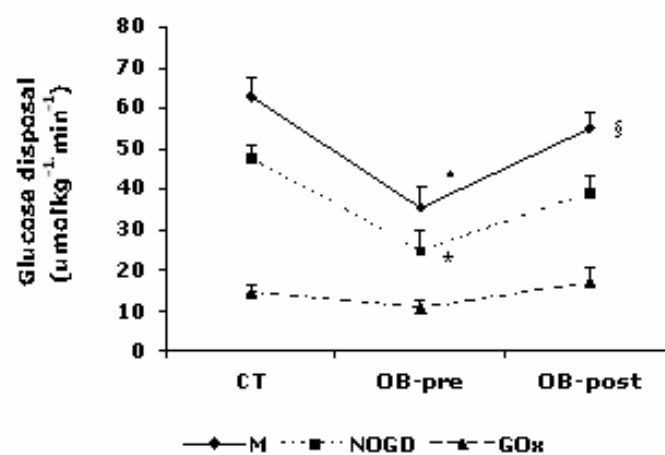


Fig. 4

A





FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 15/10/02
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 392/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PRÓJETO: “EFEITO DO EMGRECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE ADIPONECTINA, SENSIBILIDADE À INSULINA E UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS - UMA COMPARAÇÃO ENTRE DUAS TÉCNICAS DE CIRURGIA BARIÁTRICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Daniela Miguel Marin

INSTITUIÇÃO: Departamento de Clínica Médica/Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/09/2002

II - OBJETIVOS

Trata-se um estudo do tipo longitudinal prospectivo acompanhando adultos entre 18 e 60 anos portadores de obesidade mórbida, atendidos no ambulatório de cirurgia de obesidade do HC UNICAMP sujeitos à cirurgia bariátrica pela técnica de Capella e pela técnica da derivação bilio digestiva. O objetivo geral do estudo é avaliar o efeito de emagrecimento induzido pelas diferentes técnicas cirúrgicas sobre os níveis plasmáticos de adiponectina, citocinas inflamatórias e sensibilidade à insulina, além de verificar a correlação entre variáveis.

III - SUMÁRIO

A amostra será constituída por cerca de 20 pacientes com obesidade mórbida que serão comparados a 10 indivíduos de peso normal. Dentre os 20 pacientes selecionados, 10 serão submetidos à cirurgia e gastroplastia vertical com bandagem e derivação gástrica em Y de Roux (técnica de Capello) e os outros 10 serão submetidos à cirurgia bariátrica por derivação BPD. Os pacientes de cada grupo cirúrgico deverão ser pareados quanto a sexo, idade e IMC. Os indivíduos magros deverão ser pareados aos obesos quanto à sexo e idade. Os pacientes agendados em cada mês para realização da cirurgia bariátrica serão convidados a participar do estudo, devendo ser acompanhados em dois momentos: pré-operatório e 12 meses após a cirurgia quando a perda de peso é equivalente entre as duas técnicas cirúrgicas. O estudo prevê critérios de inclusão: aceitação para participar, idade

entre 18 e 60 anos, IMC entre 40 e 55 kg/m². São critérios de exclusão: diabetes, hipertensão grave, uso de reposição hormonal, uso de corticóides, apnéia do sono, insuficiência renal e hepática. A glicemia de jejum será utilizada para identificação de voluntários diabéticos, antes do início do estudo completo. Os pacientes serão classificados de acordo com os critérios revisados da American Diabetes Association. Será objeto de estudo as seguintes variáveis: medidas antropométricas, de composição corporal, distribuição da gordura corporal, gasto calórico, utilização de substratos energéticos, sensibilidade e secreção de insulina, pressão arterial e frequência cardíaca e dosagens bioquímicas, além de: idade, sexo, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, regularidade de atividade física, antecedentes familiares. A metodologia é adequada para responder às questões que o estudo levanta. O termo de consentimento livre e esclarecido está formulado de modo claro, informando o paciente quanto aos procedimentos que serão utilizados, os riscos (que no caso são inexistentes), os benefícios, a liberdade de deixar de participar sem prejuízo para o seu tratamento, o sigilo quanto à identidade e divulgação dos resultados da pesquisa. Os pacientes não deverão receber pagamento por sua participação. As condições para a realização do estudo são adequadas, uma vez que fazem parte da rotina da clínica de Obesidade do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Em função dos aspectos destacados no item anterior, considere-se que o protocolo cumpre com as disposições principais das deliberações sob exame. Seria, entretanto interessante que o pesquisador informasse quanto ao critério para decidir a que técnica cirúrgica cada paciente será submetido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de outubro de 2002.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Tabela 12- Citocinas e marcadores inflamatórios no período pré operatório (M±EP)

	CT	OB-NT	OB-IT	OB-DM	p^1 <i>IT vs NT</i>	p^2 <i>DM vs NT</i>	p^3 <i>DM vs IT</i>
Adiponectina _{basal} (ug/ml)	11,6±1,4	7,5±1,3 *	5,5±0,9 *	3,3±0,7 *	<i>ns</i>	<i>0,04</i>	<i>ns</i>
Proteína C _{basal} (mg/dl)	0,06±0,01	0,88±0,14 *	0,99±0,62 *	1,02±0,23 *	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
IL-6 _{basal} (pg/ml)	1,28±0,27	4,07±0,76 *	3,29±0,89 *	3,20±0,37 *	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
TNF- α _{basal} (pg/ml)	2,08±0,73	3,77±1,02 *	2,37±0,48	3,59±1,03	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
			-	-			

* - $p \leq 0,05$ vs. CT - Mann Whitney.

p^1 p^2 p^3 comparação intergrupo - Mann Whitney.

Tabela 13– Citocinas e marcadores inflamatórios após o emagrecimento (M±EP).

	CT	PRÉ	PÓS	p^1 <i>Pré vs. CT</i>	p^2 <i>Pos vs. CT</i>	p^3 <u><i>Pos vs. Pré</i></u>
Adiponectina _{basal} (ug/ml)	11,6±1,4	7,1±1,1	18,7±2,8	<i>ns</i>	<i>0,05</i>	<i>0,002</i>
Proteína C _{basal} (mg/dl)	0,06±0,01	1,06±0,17	0,16±0,05	<i><0,0001</i>	<i>ns</i>	<i>0,002</i>
IL-6 _{basal} (pg/ml)	1,28±0,27	3,81±0,54	1,64±0,13	<i>0,001</i>	<i>ns</i>	<i>0,01</i>
TNF- α _{basal} (pg/ml)	2,08±0,73	3,08±0,66	1,71±0,33-	<i>0,04</i>	<i>ns</i>	<i>0,004</i>

p^1 p^2 comparação intergrupo - Mann Whitney; p^3 comparação intragrupo pré e pós emagrecimento (Wilcoxon signed rank test).